



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MESTRADO PROFISSIONAL EM
PESQUISA E DESENVOLVIMENTO – BIOTECNOLOGIA MÉDICA

Aline Aki Tanikawa

**AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA PRIMÁRIA AOS
INIBIDORES DE INTEGRASE EM PACIENTES
SOROPOSITIVOS PARA O HIV-1**

BOTUCATU

2011

Aline Aki Tanikawa

**AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA PRIMÁRIA AOS
INIBIDORES DE INTEGRASE EM PACIENTES
SOROPOSITIVOS PARA O HIV-1**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, Programa de Pós-Graduação em Pesquisa e Desenvolvimento - Biotecnologia Médica (Mestrado Profissional), para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Inês de Moura Campos Pardini

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Rejane Maria Tommasini Grotto

Botucatu

2011

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
Divisão Técnica de Biblioteca e Documentação - Campus De Botucatu - UNESP
Bibliotecária responsável: *Sulamita Selma Clemente Colnago* - CRB 8/4716

Tanikawa, Aline Aki.

Avaliação da resistência primária aos inibidores de integrase em pacientes soropositivos para o HIV-1 / Aline Aki Tanikawa. - Botucatu, 2011

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011

Orientador: Maria Inês de Moura Campos Pardini

Co-orientador: Rejane Maria Tommasini Grotto

Capes: 20804008

1. HIV (Virus). 2. AIDS (Doença) - Tratamento. 3. Biotecnologia médica.

Palavras-chave: HIV-1; Integrase; Genotipagem; Resistência primária.

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais e a todos os pacientes HIV positivos, que demonstram muita fortaleza perante situações em que desistir é a coisa mais fácil a se fazer.

Agradecimientos

Agradeço ao meu Deus. Por guiar minhas escolhas, meu caminho, minha vida. Por me proporcionar situações que requerem fortaleza, perseverança, humildade e serenidade. Por me auxiliar a praticá-las e a ser sempre confiante na Sua vontade.

Aos meus pais, Fátima e Toshimasa. Pessoas que sempre apoiaram minhas decisões, que estiveram presentes em cada momento de dúvida, de “desespero”, de alegria e tristeza... Que fizeram da minha chegada até aqui possível e que, com frases simples e diretas, me ensinaram e me ensinam a melhor maneira de viver!

Agradeço também aos meus irmãos, Addison e Arianna, e cunhada, Lucimara. Que me apoiam e que torcem sinceramente pelo meu êxito.

À minha orientadora, Dra. Maria Inês de Moura Campos Pardini. Por todas as oportunidades proporcionadas, pela confiança no meu potencial e por toda a formação que adquiri em seu laboratório.

À coorientadora, Dra. Rejane Maria Tommasini Grotto. Obrigada por sempre estar disposta a ajudar e auxiliar. Também agradeço pela confiança depositada, pelo estímulo ao crescimento profissional, pelos conselhos e por todos os ensinamentos.

Ao Programa de Pós-Graduação “Pesquisa e Desenvolvimento - Biotecnologia Médica” da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP.

Aos docentes do Programa de Mestrado Profissionalizante pelos ensinamentos.

Ao Programa de Aprimoramento Profissional em Inovação Tecnológica em Diagnóstico e Pesquisa Laboratorial.

A todos do Laboratório de Rotinas Diagnósticas em HIV e HCV: Regina, Sílvia, Rosângela e Maércio. Obrigada pelos ensinamentos, pela paciência, pelas risadas e pelos conselhos. Obrigada pela ajuda proporcionada e pelas amostras cedidas! Minha sincera gratidão por todo o carinho demonstrado!

Às “meninas” do Laboratório de Biologia Molecular: Lú, Sarita, Lílian, Ná, Bete, Tainara, Priscila e Jovita. Estas foram responsáveis pelas risadas, momentos de descontração e também pelas discussões mais produtivas. Agradeço pela ajuda, pelas conversas, por cederem qualquer tempo para me auxiliarem nesta pesquisa.

À Juliana (Jaú), que sempre foi solícita em relação ao sequenciamento das amostras.

Aos aprimorandos que cooperaram com o meu trabalho.

À Lú... minha grande companheira e amiga de aprimoramento e mestrado. Obrigada pelos momentos engraçadíssimos, pela ajuda sincera, pelos almoços gordos no Mc, pelas voltas na Rua Amando, por tudo! Sou realmente muito grata pelo tempo que disponibilizou para me ajudar no trabalho, principalmente no sequenciamento das amostras, e por ter dividido tantos momentos de alegria e desespero. Torço imensamente pelo seu sucesso!

À Juliane... pessoa que me fez rir em muitos momentos tensos e que me influenciou com sua fé firme e inabalável.

À Juliana, que sempre me animou com suas frases otimistas e que é uma pessoa de uma bondade enorme.

À Regina, que sempre esteve disposta a me ajudar no desenvolvimento da pesquisa e também na rotina, separando amostras, auxiliando na extração, me encorajando a sempre continuar...

Ao Maércio, que foi paciente e solícito com o meu pedir incessante por amostras; que sempre esteve disposto a ajudar e a dar conselhos.

Muito obrigada a todos os pacientes que cooperaram para a realização deste trabalho. Com eles aprendi muito sobre a maneira de levar a vida, de encarar as situações e de seguir em frente.

À Dra. Lenice, Dr. Meira, Dr. Alexandre e Dr. Ricardo. Por permitirem que eu tivesse contato com os pacientes, que me auxiliaram em qualquer dúvida e informação clínica.

A todos do Hospital Dia, que foram solícitos, me ajudaram muitíssimo e que estavam dispostos a fazer o que era possível para facilitar a coleta de dados.

Obrigada a todos do Hemocentro que torceram por mim e que proporcionaram dias mais agradáveis. O otimismo de alguns é contagiante e, com certeza, inspirador.

À secretária do programa, Janisse, pelas informações, pelo auxílio e por qualquer ajuda cedida.

Agradeço imensamente aos meus amigos que me acompanham há anos, que me apoiam e que estão sempre dispostos a entender minhas decisões. Aos “amigos de Botucatu”, que foram e são parte da minha família “botucuda”.

Especial agradecimento às companheiras de república, Michele (Kyoto) e Taticia (Bu), pois aguentaram as crises, o “stress” e as reclamações. Que me fizeram rir em várias ocasiões e que estiveram dispostas a ouvir, a dar conselhos e que sempre foram positivas em relação ao meu futuro.

À grande amiga Sú. Pessoa que tenho um enorme carinho e que mesmo longe apoia minhas escolhas, acompanha minha vida e me auxilia com qualquer problema.

Às amigas Ana e Gláucia, que presenciaram todo o meu esforço e que nunca duvidaram da minha capacidade.

À Perla, minha professora de espanhol e amiga. Sempre muito solícita e que nunca permitiu que eu me acomodasse nos estudos.

A todos que, de alguma maneira, estiveram presentes no meu caminhar e que influenciaram na minha chegada até aqui.

Ao meu amigo Barbosa, que enquanto estive “aqui” foi um ótimo amigo.

*À vó Flor... que até hoje está “presente” na minha vida.
Saudades...*

Epígrafe

“Enquanto estiver vivo, sinta-se vivo. Se sentir saudades do que fazia, volte a fazê-lo. Não viva de fotografias amareladas... Continue, quando todos esperam que desistas. Não deixe que enferruje o ferro que existe em você. Faça com que em vez de pena, tenham respeito por você. Quando não conseguir correr através dos anos, trote. Quando não conseguir trotar, caminhe. Quando não conseguir caminhar, use uma bengala. Mas nunca se detenha.”

Madre Teresa de Calcutá

Prefácio

Biomédica de formação, ainda durante a graduação no Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, tive a oportunidade de conviver em diferentes áreas profissionais, nos laboratórios de genética, fisiologia, embriologia, morfologia e bacteriologia.

Na rotina da bacteriologia iniciei minhas atividades de pesquisa, realizando nesta fase um projeto de iniciação científica, o qual representou minha primeira experiência prática com tecnologias de biologia molecular, área que sempre me interessei.

No último semestre da graduação, sentia a necessidade de aprimorar conhecimentos e adquirir vivência prática em biologia molecular. Desta forma, minha opção após a formatura foi o Aprimoramento Profissional em Inovação Tecnológica e Pesquisa Laboratorial oferecido pelo Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro de Botucatu e o Departamento de Clínica Médica, da Faculdade de Medicina, Unesp.

O referido Laboratório participa como ponto executor das Redes Nacionais de Carga Viral e Genotipagem do HIV-1 do Departamento de DST/Aids e Hepatites Virais do Ministério da Saúde e da Rede Estadual de Hepatites Virais. Gradativamente, fui me inserindo em todas as atividades desenvolvidas no laboratório e consegui aprimorar meus conhecimentos práticos e teóricos durante este período.

Depois de uma fase inicial, ainda na qualidade de aprimoranda, tive a oportunidade de atuar mais ativamente na rotina de Genotipagem do HIV-1, participando da realização e liberação dos exames sempre sob a supervisão de um profissional, responsável pela rotina laboratorial.

A rotina da Genotipagem do HIV-1 exige amplos conhecimentos em biologia molecular e, com esta experiência tive a oportunidade de aprofundar, também, meus conhecimentos teóricos orientada por pessoas mais experientes que estavam dispostas a ensinar. Aprendi muito e foi uma oportunidade grandiosa para quem tem tanto interesse na área de biologia molecular.

Seguindo esta linha, desenvolvi meu projeto de mestrado estudando a resistência primária do HIV-1 frente a uma nova classe de medicamentos antirretrovirais, os inibidores de integrase, os quais, diferentemente dos inibidores de transcriptase reversa e de protease, não contam ainda, no Brasil, com a disponibilidade de um teste de genotipagem comercial que detecte resistência.

Assim, o conteúdo apresentado neste volume é resultado de minha formação durante estes dois anos e se insere em uma linha de pesquisa pela qual muito me identifiquei.

O modelo escolhido para apresentação de meu trabalho foi uma sucessão de capítulos que refletem esta fase de meu crescimento profissional.

O **Capítulo I** constitui uma introdução versando sobre o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) no contexto dos novos medicamentos e da resistência como um obstáculo à eficácia terapêutica com o objetivo de introduzir o leitor ao tema nos capítulos subsequentes.

O **Capítulo II** consiste em um artigo intitulado “Genotipagem *in house* da região da integrase do HIV-1 para avaliação de resistência: uma alternativa metodológica”, o qual se será submetido à Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical e visou a padronização de uma metodologia para determinação da resistência aos inibidores de integrase na falta de um kit comercial com este objetivo. Trata-se de uma abordagem ainda inédita no Brasil.

O **Capítulo III** refere-se ao artigo o qual será submetido ao periódico *AIDS Research and Human Retroviruses*, intitulado “Avaliação da resistência primária aos inibidores de integrase na infecção pelo HIV-1 em pacientes da região de Botucatu, SP, Brasil” e que consiste nos resultados obtidos no presente estudo.

O **Capítulo IV** refere-se à experiência adquirida durante a execução dos exames de Genotipagem do HIV-1 como produto de minha inserção no Laboratório de Rotinas Diagnósticas.

Aline Aki Tanikawa

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo I

Figura 1: Estrutura do HIV.....	19
Figura 2: Organização genômica do HIV-1.....	20
Figura 3: Ciclo replicativo do HIV.....	22
Figura 4: Esquema ilustrativo do ciclo replicativo do HIV, evidenciando as diferentes etapas que constituem alvos para intervenção terapêutica	25
Figura 5: Domínios estruturais da IN do HIV-1.....	28
Figura 6: Arquitetura do <i>intasome</i> do <i>Prototype Foamy Virus</i>	29
Figura 7: Processo de integração.....	31
Figura 8: Estruturas químicas dos inibidores de integrase	37

Capítulo IV

Figura 1: Distribuição geográfica no território nacional dos laboratórios de genotipagem integrantes da Rede Nacional de Genotipagem do HIV (RENAGENO)....	97
Figura 2: Fluxograma do funcionamento da Renageno.....	97

LISTA DE TABELAS

Capítulo II

Tabela 1: Sequência de *primers* utilizados nas reações de amplificação para a região genômica da integrase do HIV-1..... 63

Tabela 2: Sequência de *primers* utilizados no sequenciamento da região genômica da integrase do HIV-1..... 64

Capítulo III

Tabela 1: Características demográficas e imunoviológicas dos pacientes HIV-1 positivos incluídos no estudo..... 80

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

μL	Microlitro
Aids	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ARV	Antirretroviral
AZT	Zidovudina
CA	Capsídeo
CCD	Domínio Catalítico Central ou <i>Catalytic Core Domain</i>
cDNA	DNA complementar
CTD	Domínio C-terminal ou <i>carboxy-terminal domain</i>
CV	Carga Viral
DKA	Ácido diqueto ou <i>Diketo Acid</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DTT	Dietiltreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
EVG	Elvitegravir
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HAART	Terapia altamente ativa ou <i>Highly Active Antiretroviral Therapy</i>
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IBD	Domínio de ligação à integrase ou <i>Integrase Binding Domain</i>
IN	Integrase
INI	Inibidor de Integrase
LEDGF/p75	<i>Lens epithelium-derived Growth Factor</i>
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i>
mA	Mili âmper
MA	Matriz
mg	miligrama
MLV	Vírus da leucemia murina ou <i>Murine Leukemia Virus</i>
mM	Milimolar
MRG	Médico de Referência em Genotipagem
MS	Médico Solicitante
NC	Nucleocapsídeo
ng	Nanograma

NTD	Domínio N-terminal ou <i>Amino-terminal Domain</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PFV	<i>Prototype foamy virus</i>
PIC	Complexo de pré-integração ou <i>Pre-integration Complex</i>
PR	Protease
RAL	Raltegravir
RENAGENO	Rede Nacional de Genotipagem
RNA	Ácido ribonucleico ou <i>ribonucleic acid</i>
S-GSK	Shionogi-GlaxoSmithKline
Ta	Temperatura de anelamento
TR	Transcriptase Reversa
V	Volts
VDW	Van der Waals

SUMÁRIO

Capítulo I.....	18
Introdução.....	19
Capítulo II.....	57
Artigo: Genotipagem <i>in house</i> da região da integrase do HIV-1 para avaliação de resistência: uma alternativa metodológica.....	58
Capítulo III.....	74
Artigo: Avaliação da resistência primária aos inibidores de integrase na infecção pelo HIV-1 em pacientes da região de Botucatu, SP, Brasil.....	75
Capítulo IV.....	95
Rede Nacional de Genotipagem.....	96
Anexo.....	102
Anexo 1: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.....	103
Anexo 2: Justificativa de Alteração no Título do Projeto de Pesquisa.....	104

Capítulo I

Introdução

A aids constitui a fase sintomática de um processo de imunossupressão resultante da infecção por um retrovírus denominado Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), que infecta células do sistema imunológico humano como linfócitos e macrófagos, além de outros tipos celulares (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 1998).

Atualmente são conhecidos dois tipos de HIV: o HIV-1, que vem estabelecendo uma epidemia global e o HIV-2, restrito a nações do oeste da África. Com base na análise filogenética de sequências moleculares, o HIV-1 foi classificado em três grupos: M (*major*), O (*outlier*) e N (*new*), que divergem em média 30% nas sequências de aminoácidos da região *gag* e 47% no *env*. O grupo M, o mais prevalente atualmente, é composto por nove subtipos distintos (A, B, C, D, F, G, H, J, K), que diferem 15% a 22% no *gag*, e de 20% a 30% no *env* (ROBERTSON et al., 1999).

O HIV é um retrovírus que apresenta 100 nm de diâmetro, cuja estrutura é constituída por um núcleo proteico contendo duas cópias de RNA idênticas de, aproximadamente, 9,8 kb que constituem o genoma viral, e enzimas virais (transcriptase reversa, integrase e protease), envolvidos por um envelope lipoproteico no qual se inserem as glicoproteínas do envelope (gp120 e gp41) (CONNOR; HO, 1992) (Figura 1).

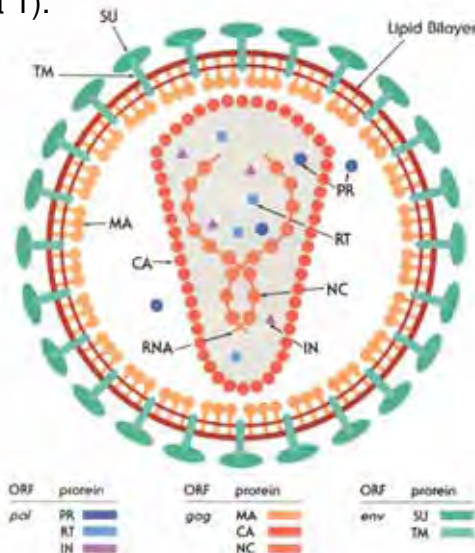


Figura 1: Representação esquemática da estrutura do HIV, evidenciando glicoproteínas gp120 (SU) e gp41(TM), codificadas pelo gene *env*; proteínas que dão origem à matriz (MA), capsídeo (CA) e nucleocapsídeo (NC), codificadas pelo gene *gag*; enzimas virais protease (PR), transcriptase reversa (RT) e integrase (IN) codificadas pelo gene *pol*, além das duas fitas de RNA, material genético do HIV-1 (Adaptado de <http://www.chm.tcu.edu/reinecke.htm>).

O genoma viral codifica genes estruturais (*gag*, *pol*, *env*), acessórios (*nef*, *vpu*, *vif* e *vpr*) e regulatórios (*tat* e *rev*) (BARRÉ-SINOUSI, 1996; WANG et al., 2000). O gene *gag* codifica proteínas da matriz, capsídeo e nucleocapsídeo virais, o gene *env* codifica as glicoproteínas do envelope (gp120 e gp41), enquanto os produtos do gene *pol* são as enzimas transcriptase reversa, protease e integrase essenciais ao ciclo replicativo viral (SWANSTROM; WILLS, 1997). O genoma viral é flanqueado por sequências não traduzidas denominadas *Long Terminal Repeats* (LTRs), essenciais para o início do processo transcricional (VARMUS; BROWN, 1989) (Figura 2).

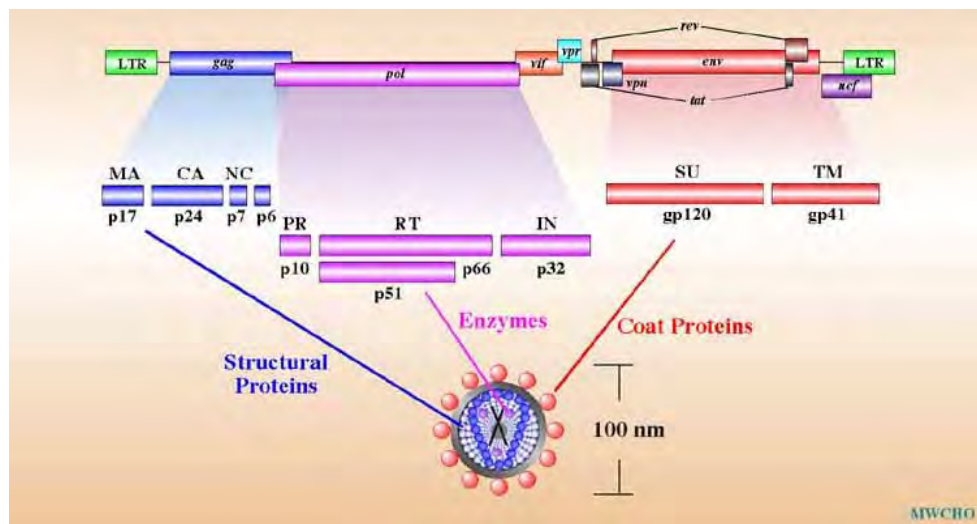


Figura 2: Organização genômica do HIV-1 representada pelas duas regiões não-traduzidas (LTR) que flanqueiam os principais genes *gag*, *pol* e *env* que codificam as proteínas estruturais, as enzimas virais e as glicoproteínas do envelope, respectivamente. Além destes, estão indicados os genes que codificam proteínas acessórias (*vif*, *vpr*, *vpu*, *nef*) e regulatórias (*rev*, *tat*) (Adaptado de <http://www.stanford.edu/>).

O processo de replicação do HIV (Figura 3) tem início mediante a ligação da glicoproteína do envelope viral gp120 com o receptor de membrana CD4 (SATTENTAU; WEISS, 1988), expresso na superfície celular de linfócitos T, monócitos/macrófagos, eosinófilos, células dendríticas e células microgliais do sistema nervoso. Depois desta interação inicial, o complexo do envelope viral sofre uma mudança conformacional, expondo um domínio específico da gp120 capaz de ligar-se com receptores de quimiocina, CCR5 e/ou CXCR4, presentes na membrana celular (DENG et al., 1996; DORANZ et al., 1996; ECKERT; KIM, 2001). O CXCR4 é

expresso em muitas células, incluindo linfócitos T, enquanto que o CCR5 está presente em monócitos/macrófagos, células dendríticas e linfócitos T ativados. A dupla ligação da gp120 com CD4 e com um dos receptores de quimiocina garante uma estabilidade maior na ligação do vírus, o que, por sua vez, permite com que o peptídeo de fusão da gp41 penetre na membrana celular (BERGER; MURPHY; FARBER, 1999; FANALES-BELASIO et al., 2010). As sequências repetitivas, HR1 e HR2, da gp41 interagem, levando ao colapso da porção extracelular da gp41 em um *hairpin*. Esta estrutura em *loop* aproxima o envelope viral e a membrana celular, permitindo a fusão destas estruturas e a subsequente entrada do capsídeo viral no citoplasma da célula hospedeira (WYATT; SODROSKI, 1998; ECKERT; KIM, 2001).

Com a fusão, o *core* viral sofre desencapsidação no citoplasma, liberando o RNA viral, o qual sofre transcrição reversa originando uma molécula de DNA em dupla hélice, processo mediado pela enzima transcriptase reversa viral (FUENTES; FAY; BAMBARA, 1996). O DNA viral sintetizado no citoplasma celular mantém-se associado a proteínas virais e celulares originando um grande complexo proteico denominado complexo de pré-integração, do inglês *pre-integration complex* (PIC) (STEVENSON, 1996; BOWERMAN et al., 1989).

A etapa seguinte do ciclo replicativo consiste na transferência do PIC associado ao DNA viral ao núcleo celular, local onde a enzima integrase catalisa a integração do genoma viral ao genoma do hospedeiro, originando o denominado provírus (FUJIWARA; MIZUUCHI, 1988; CRAIGIE, 2001). Uma vez integrado ao genoma celular, a transcrição gênica viral pode ser ativada e desencadear a síntese de novos vírus. Inicialmente, a transcrição resulta em várias moléculas de RNA, as quais, depois do processamento, irão originar as proteínas regulatórias do HIV-1, como Tat e Rev. As proteínas estruturais são sintetizadas a partir da tradução do RNA viral na forma de poliproteínas, as quais são posteriormente clivadas pela enzima protease, passo essencial para a geração de partículas virais infectantes. A formação da partícula viral é um processo em que duas fitas de RNA associadas com enzimas de replicação são envoltas por proteínas do *core* constituindo, então, o capsídeo viral (FANALES-BELASIO et al., 2010).

Estas partículas imaturas migram em direção à superfície celular e, em seu interior, moléculas precursoras sofrem processamento mediado pela protease do

HIV-1, conduzindo à formação de partículas virais infectantes, as quais brotam da superfície celular do hospedeiro podendo infectar novas células (FANALES-BELASIO et al., 2010). Neste momento, quando a replicação viral é ativa, o exame de carga viral do HIV-1 pode mensurar milhões de vírus por mililitro de sangue, permitindo a inferência sobre a dinâmica da infecção.

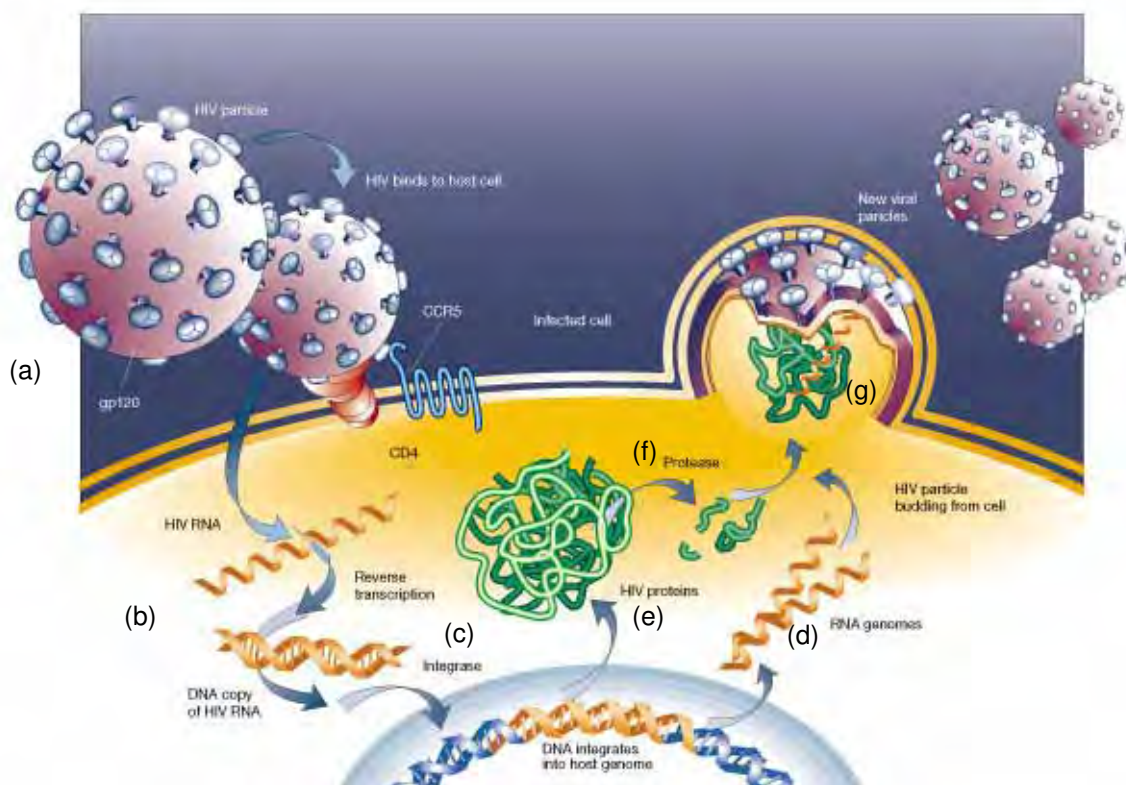


Figura 3: Ciclo replicativo do HIV evidenciando as diferentes fases: (a) entrada, interação da gp120 com o receptor de superfície celular CD4 e correceptor CCR5; (b) síntese da cadeia de DNA mediada pela enzima transcriptase reversa; (c) integração do DNA viral ao genoma celular com a participação da enzima integrase; (d) transcrição e (e) tradução formando os constituintes dos novos vírus; (f) processamento das poliproteínas pela enzima protease e, (g) brotamento dos novos vírus ainda imaturos da célula hospedeira (Adaptado de Weiss, 2001).

Na tentativa de controlar a infecção pelo HIV e melhorar a sobrevivência do paciente, a terapêutica antirretroviral busca bloquear as diferentes etapas do ciclo replicativo do HIV e, conseqüentemente, controlar a carga viral do paciente. Nesta linha, foram propostos e desenvolvidos medicamentos que atuam em fases distintas da replicação viral.

Os inibidores da transcriptase reversa (TR) constituíram a primeira classe de drogas disponíveis para a utilização clínica e, durante muito tempo, foram utilizados em esquema de monoterapia (WELLER; WILLIAMS, 2001). Em 1996, com o advento dos inibidores da protease observou-se um avanço no tratamento clínico. Mais tarde, estudos mostraram a superioridade da terapia altamente ativa, do inglês *Highly Active Antiretroviral Therapy* (HAART), em comparação aos outros esquemas terapêuticos que vinham sendo utilizados (WERNER et al., 2001; PERNO et al., 2001; GALLANT, 2002).

As drogas antirretrovirais aprovadas, que têm como alvo a TR do HIV-1, podem ser classificadas em dois grupos principais: inibidores análogos de nucleosídeos e os inibidores de TR não-nucleosídeos. No interior da célula, os inibidores de TR análogos de nucleosídeos são fosforilados para formar metabólitos ativos que são reconhecidos como substratos na elongação da cadeia de DNA pela TR viral. No entanto, estes substratos não possuem 3'OH e quando incorporados ao DNA viral promovem o término da cadeia. Os não-nucleosídeos agem pela ligação a um sítio hidrofóbico adjacente ao sítio ativo da enzima, inibindo a síntese de DNA alostericamente (REN; STAMMERS, 2008).

A protease (PR) viral é a enzima responsável por clivar as poliproteínas traduzidas durante a replicação viral em proteínas funcionais menores. Os inibidores de PR foram desenvolvidos para ligarem-se à protease viral com alta afinidade, no entanto, tendem a ocupar mais espaço do que os substratos naturais. Atualmente, há nove inibidores aprovados para o uso clínico: Saquinavir, Ritonavir, Indinavir, Nelfinavir, Amprenavir, Lopinavir, Atazanavir, Tipranavir e Darunavir (WENSING; VAN MAARSEVEEN; NIJHUIS, 2010; FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - FDA, 2010).

No entanto, a combinação dos inibidores de TR e inibidores PR vem mostrando-se insuficiente na redução da carga viral plasmática de muitos pacientes (RICHMAN, 2000; WEISSBRICH; HEINKELEIN; JASSOY, 2002), sendo a emergência de variantes resistentes um obstáculo ao sucesso terapêutico (ESTÉ; TELENTI, 2007).

O HIV exibe ampla diversidade genética, com muitas implicações na patogenicidade, no desenvolvimento de vacinas, no diagnóstico e na suscetibilidade a drogas antirretrovirais. A variabilidade do HIV é consequência: a) da rápida replicação viral que resulta em um alto número de partículas virais por dia (estimado em 10^{10}) no indivíduo infectado; b) da ausência de atividade de reparo da enzima transcriptase reversa, incapaz de corrigir erros que ocorrem com frequência, devido a intensa atividade replicativa viral (em média, uma substituição por genoma, por ciclo de replicação); c) e da ocorrência do processo de recombinação entre dois ou mais vírus presentes em um mesmo indivíduo infectado (HO, 1997; SARAFIANOS et al., 2009).

A emergência de variantes resistentes a drogas e a preocupação crescente com os efeitos tóxicos dos antirretrovirais tornaram aparente a necessidade de desenvolvimento de novas classes de drogas (ESTÉ; TELENTI, 2007). Apesar da replicação viral ser suprimida fortemente pela combinação de terapia com múltiplas drogas potentes, os vírus mantêm a capacidade de replicarem-se lentamente em muitos compartimentos do corpo. Assim, eles são capazes de mutar e, eventualmente, escapar da pressão seletiva da droga. Consequentemente, o arsenal de drogas e os regimes de tratamento existentes tornaram-se insuficientes para o controle da replicação viral a longo prazo (MENÉNDEZ-ARIAS, 2002).

Desta forma, tornou-se necessária a utilização de novas classes de antirretrovirais (RICHTMAN, 2000; WEISSBRICH; HEINKELEIN; JASSOY, 2002), o que levou ao desenvolvimento de 25 drogas aprovadas pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para o tratamento da infecção pelo HIV, sendo que 13 delas têm como alvo a replicação viral (transcriptase reversa), 9 agem na maturação (protease), uma na fusão viral, uma na entrada viral (antagonista de CCR5) e uma na integração. A figura 4 ilustra as diferentes etapas do ciclo replicativo do HIV-1 passíveis de intervenção terapêutica. O inibidor de integrase Raltegravir e o antagonista de CCR5 Maraviroque foram ambos aprovados pelo FDA em 2007. A inibição simultânea de diferentes alvos virais continua sendo a melhor maneira de contornar a resistência às drogas, uma vez que múltiplas mutações são necessárias para a resistência, sendo algumas prejudiciais para a replicação e crescimento viral (MARCHAND et al., 2009).

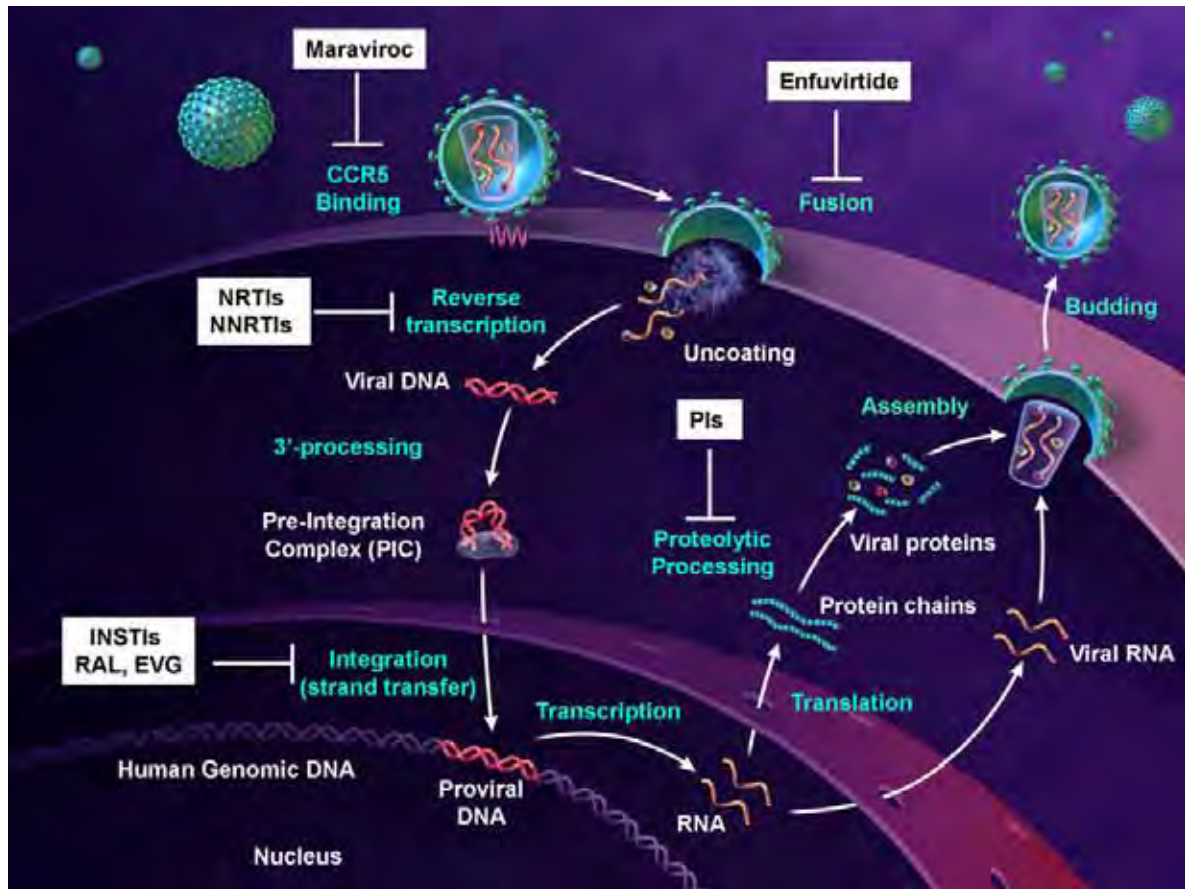


Figura 4: Esquema ilustrativo do ciclo replicativo do HIV, evidenciando as diferentes etapas que constituem alvos para intervenção terapêutica. O Maraviroque é um inibidor de ligação ao correceptor CCR5, a Enfuvirtida inibe a fusão do envelope viral e membrana celular do hospedeiro. Entre os inibidores de enzimas virais estão os inibidores de transcriptase reversa, inibidores de protease e inibidores de integrase (Adaptado de McColl e Chen, 2010).

Os inibidores de fusão exploram a transição conformacional da gp41, seguinte à ligação da gp120 ao CD4 e ao correceptor e precede a formação do poro. Um passo fundamental no processo de fusão envolve a interação entre dois motivos peptídicos distintos (HR1 e HR2) da proteína gp41. O inibidor de fusão mimetiza o peptídeo natural HR2, ligando-se a região HR1 da gp41, bloqueando interações necessárias para a entrada viral (WILD; GREENWELL; MATTHEWS, 1993; WILD et al., 1994; CHEN et al., 1995; MOORE; DOMS, 2003), sendo que o único medicamento licenciado pelo FDA é a Enfuvirtida (MOORE; DOMS, 2003; FLETCHER, 2003; FUNG; GUO, 2004).

Nas fases iniciais do ciclo de replicação do HIV ainda estão disponíveis os inibidores de entrada. Sabe-se que a interação da proteína viral gp120 com o correceptor CCR5 ou CXCR4 é fundamental para que ocorra a infecção da célula do hospedeiro. Segundo o correceptor utilizado (BERGER et al., 1998), o HIV pode ser classificado em R5, que são os que utilizam somente o CCR5 como correceptor, ou X4 para descrever vírus que utilizam o CXCR4. Há também a terminologia R5X4, que é reservada para clones genuinamente capazes de ligarem-se a ambos os correceptores (WHITCOMB et al., 2007). Os inibidores de correceptor, como o Maraviroque, agem ligando-se no interior da cavidade das hélices transmembranas do CCR5 estabilizando os domínios extracelulares em uma conformação que não é reconhecida eficientemente pela gp120 selvagem; eles inibem a entrada via mecanismos não-competitivos ou alostéricos (KUHMAN; HARTLEY, 2008).

Nesta nova linha terapêutica, entre as novas drogas desenvolvidas para o tratamento antirretroviral, a integrase (IN) vem sendo um alvo de grande interesse, uma vez que esta enzima atua em estágios precoces da replicação viral e não existe processo semelhante na célula hospedeira (LATAILLADE; KOZAL, 2006; AL MAWSAWI; AL SAFI; NEAMATI, 2008). Por constituir um alvo terapêutico distinto é esperado que o inibidor de integrase atue na supressão da replicação viral de variantes resistentes a outras classes de antirretrovirais (ESPESETH et al., 2000; HAZUDA et al., 2000; HAZUDA et al., 2004). A ausência de conhecimento de uma homóloga humana da IN provavelmente explica a baixa toxicidade e a alta seletividade do Raltegravir, primeiro inibidor de integrase liberado para utilização clínica, e dos próximos inibidores de IN (MARCHAND et al., 2009).

A enzima IN é o produto de uma poliproteína precursora, codificada pela região C-terminal do gene *pol*, a qual é clivada pela protease durante a maturação viral gerando o polipeptídeo IN que é, então, empacotado no interior de novos vírions. A IN é constituída por 288 aminoácidos (32 kDa), organizados em três domínios (GOLDGUR et al., 1998). O domínio N-terminal (1-49), altamente conservado entre os retrovírus, é constituído por duas histidinas e duas cisteínas (motivo proteico HHCC), as quais se ligam à íons Zn^{+2} , promovendo a multimerização protéica e a atividade catalítica (ZHENG; JENKINS; CRAIGIE, 1996; LEE ET AL., 1997). O domínio catalítico central, do inglês *Catalytic Core Domain*

(CCD) (50-212), é constituído por endonuclease e polinucleotidil transferase, com seus três resíduos conservados, sendo dois aspartatos e um glutamato, D₆₄, D₁₁₆ e E₁₅₂, formando o sítio ativo enzimático e envolvido no reconhecimento do substrato de DNA (ENGELMAN; CRAIGIE, 1992; DRELICH; WILHELM; MOUS, 1992; CHIU; DAVIES, 2004). O CCD também contém outros domínios e resíduos, como o sinal de localização nuclear, uma sequência crítica envolvida na importação nuclear da integrase no contexto do complexo de pré-integração (BOUYAC-BERTOIA et al., 2001); o motivo lisina – arginina – lisina, nas posições 186, 187 e 188 respectivamente (K₁₈₆R₁₈₇K₁₈₈), de multimerização; e vários outros resíduos importantes (histidina na posição 12, leucina na 102, e duas alaninas nas posições 128 e 129, entre outros) envolvidos na ligação química e contatos hidrofóbicos com o fator de crescimento LEDGF/p75, do inglês *Lens epithelium-derived growth factor*, o qual é um cofator essencial para a integração do HIV, ligando a IN à cromatina da célula hospedeira (BUSSCHOTS et al., 2007; RAHMAN et al., 2007). O domínio C-terminal (213-288) contém resíduos de aminoácidos básicos e é responsável pela ligação inespecífica ao DNA, estando envolvido principalmente na estabilidade do complexo IN-DNA (GOLDGUR et al., 1998) (Figura 5). Também está envolvido na oligomerização da proteína e nas interações com a TR (LUTZKE; PLASTERK, 1998).

Na IN do HIV, um par de cátions metálicos divalentes (Mg²⁺ ou Mn²⁺) é coordenado por três carboxilatos do motivo invariante D, D-35-E no interior do domínio catalítico central. Para funcionar, a IN também requer seu domínio amino-terminal, do inglês *amino-terminal domain* (NTD), um pacote de três helicoidais estabilizadas pela ligação ao átomo de Zn, e o domínio carboxi-terminal, *carboxy-terminal domain* (CTD), que adota uma dobra semelhante a SH3 (EIJKELENBOOM et al., 1995; CAI et al., 1997).

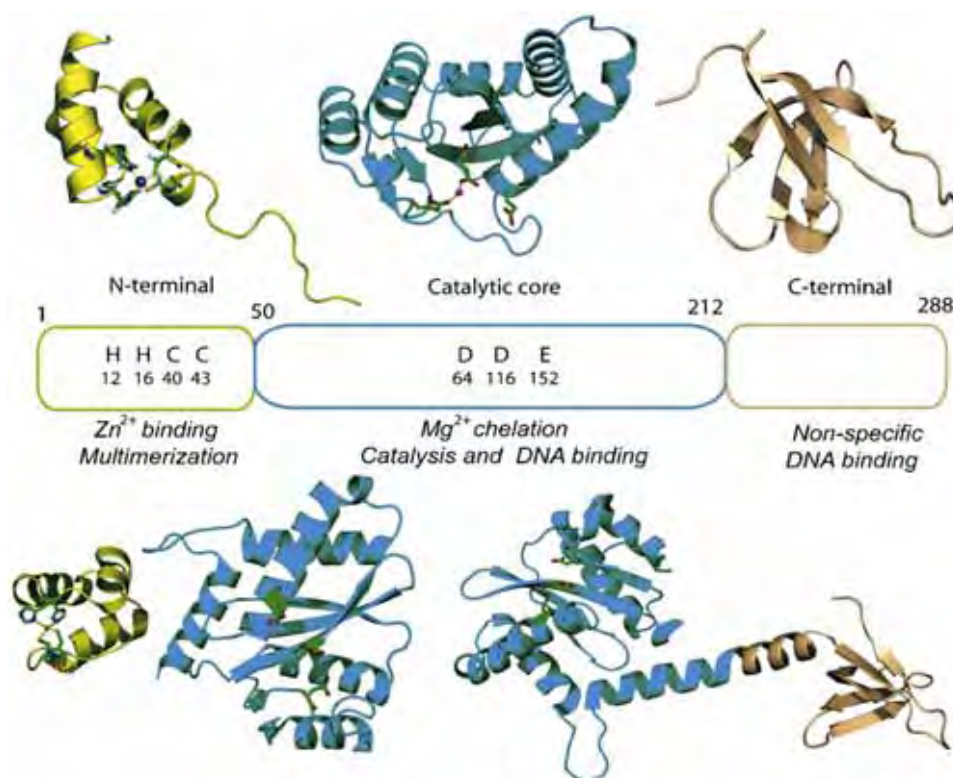


Figura 5: Domínios estruturais da IN do HIV-1. (Superior) Domínios N-terminal (amarelo), catalítico (azul) e C-terminal (marrom); (Inferior) à esquerda, domínio N-terminal com o domínio catalítico central (IN1-212) e à direita, domínio catalítico central com o fragmento do C-terminal (IN52-288). As estruturas são mostradas como desenhos com as cadeias laterais dos motivos HHCC e DDE nos domínios N-terminal e catalítico apresentados nos quadros coloridos correspondentes e os cátions Zn^{2+} e Mg^{2+} abaixo das mesmas (Adaptado de Mouscadet et al., 2010).

A estrutura de toda a extensão da integrase retroviral, tanto sozinha como complexada com DNA, não havia sido esclarecida até 2010. No trabalho de Hare et al. (2010), utilizando a IN do *prototype foamy virus* (PFV), a estrutura completa da IN em complexo com o DNA foi determinada. A descoberta mostrou a organização do *intasome* retroviral, compreendendo um tetrâmero de integrase fortemente associado com finais do DNA viral (Figura 6), auxiliando no entendimento do mecanismo de ação dos inibidores de integrase e, possivelmente, no desenvolvimento da próxima geração destes inibidores.

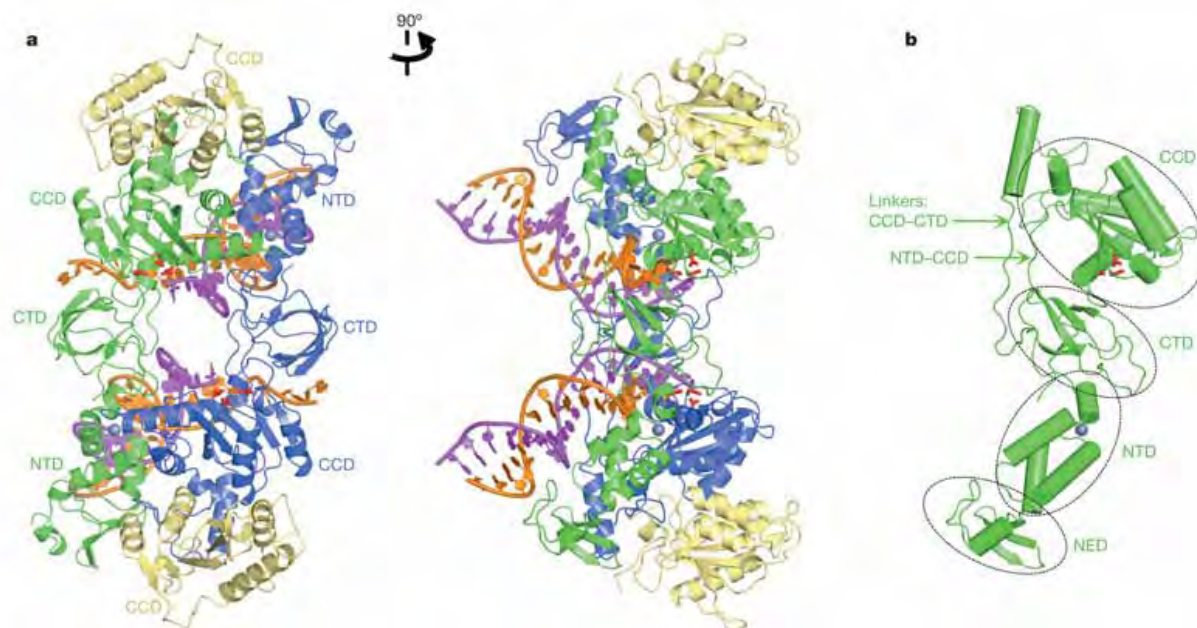


Figura 6: Arquitetura do *intasome* do *Prototype Foamy Virus*. (a) Panoramas ao longo (esquerda) e perpendicular (direta) ao eixo duplo cristalográfico. As subunidades internas do tetrâmero de IN, ocupadas com o DNA viral, estão em azul e verde; as cadeias externas da IN estão em amarelo. As fitas de DNA reativas e não transferidas estão em magenta e laranja, respectivamente. As cadeias laterais dos resíduos de sítio ativo Asp 128, Asp 185 e Glu 221 são os *sticks* (varetas) vermelhos; átomos de Zn são as esferas verde. As localizações dos domínios canônicos da IN (NTD, CCD e CTD) estão indicadas. (b), Interior (verde) da cadeia da IN com os domínios e os *linkers* (vinculadores) indicados (Adaptado de Hare et al., 2010).

Aproximadamente 40-100 partículas de integrase (IN) são empacotadas dentro de cada partícula do HIV. A primeira função da integrase é a de catalisar a inserção do cDNA viral ao genoma de células infectadas, embora ela também possa agir como cofator da transcriptase reversa (TSURUTANI et al., 2000; ZHU, DOBARD, CHOW, 2004).

A integração é necessária para a replicação viral, uma vez que a transcrição do genoma viral e a produção de proteínas virais requerem que o cDNA viral esteja totalmente integrado ao cromossomo (BROWN, 1990). Para que esta integração seja realizada, a IN é responsável por catalisar duas reações principais: o processamento 3' e o passo de transferência de fita (Figura 7) (ENGELMAN;

MIZUUCHI; CRAIGIE, 1991). Após a transcrição reversa, o cDNA viral é preparado para a integração pelo processamento 3' (Figura 7a). Para que este ocorra no citoplasma é necessário tanto o total funcionamento da integrase, como a integridade dos últimos 10-20 pares de base de ambos os finais do cDNA viral. O processamento 3' consiste de uma clivagem endonucleolítica que ocorre imediatamente 3' a um motivo conservado de dinucleotídeo CA (5'-GCAGT-3') nos finais de cada terminal de repetição longa (LTR). Alterações nesta sequência previnem com que a integrase catalise o processamento 3'. Esta reação gera finais de DNA 3'-OH, os quais são reativos intermediários necessários para o próximo passo, a transferência de fita (BROWN, 1990; ELLISON; BROWN, 1994; POMMIER; JOHNSON; MARCHAND, 2005).

Depois do processamento 3', a integrase permanece ligada ao cDNA viral como um complexo multimérico que liga ambos os finais do DNA viral dentro de partículas intracelulares chamadas complexos de pré-integração (PICs). Tanto proteínas virais como celulares foram encontradas em PICs isolados, além do complexo DNA-integrase. As proteínas virais transcriptase reversa, matriz (MA), nucleocapsídeo (Nc) e Vpr podem contribuir para o transporte dos PICs pelo envelope nuclear. Algumas proteínas celulares presentes nos PICs podem ligar-se à integrase e estimular as atividades enzimáticas desta, como o LEDGF (CHEREPANOV et al., 2003). Em contraste com outros lentivírus, como os oncorretrovírus murinos, vírus Moloney e vírus do sarcoma de Rous, os quais requerem a lise do envelope nuclear mitótico para "acessar" os cromossomos da célula hospedeira, os PICs do HIV-1 são capazes de atravessar o envelope nuclear. A propriedade cariofílica dos PICs permite com que o HIV se replique em células não proliferativas, como os macrófagos (BUKRINSKY et al., 1992).

No núcleo, a IN catalisa a inserção do cDNA viral ao cromossomo do hospedeiro (Figura 7b). Esta reação de transferência de fita consiste na ligação dos finais 3'-OH do DNA viral (gerado pelo processamento 3') ao fosfato 5' do DNA do cromossomo hospedeiro pela reação de transesterificação. A IN também pode catalisar a reação reversa, referida como desintegração (CHOW et al., 1992). A integração fisiológica requer a união combinada de ambos os finais do cDNA viral às fitas opostas de DNA do cromossomo alvo do hospedeiro, com um deslocamento de

cinco pares de base entre os dois pontos opostos de inserção. A completa integração requer a ligação do final 5' do DNA viral. Este último passo de integração somente pode ocorrer após o corte dos dois últimos nucleotídeos dos finais 5' do DNA pró-viral e a extensão (preenchimento da fenda) do final 3'-OH do DNA genômico. É provável que enzimas/vias celulares estejam envolvidas neste processamento 5', apesar de suas identidades permanecerem incertas (YODER; BUSHMAN, 2000; DANIEL et al., 2004).

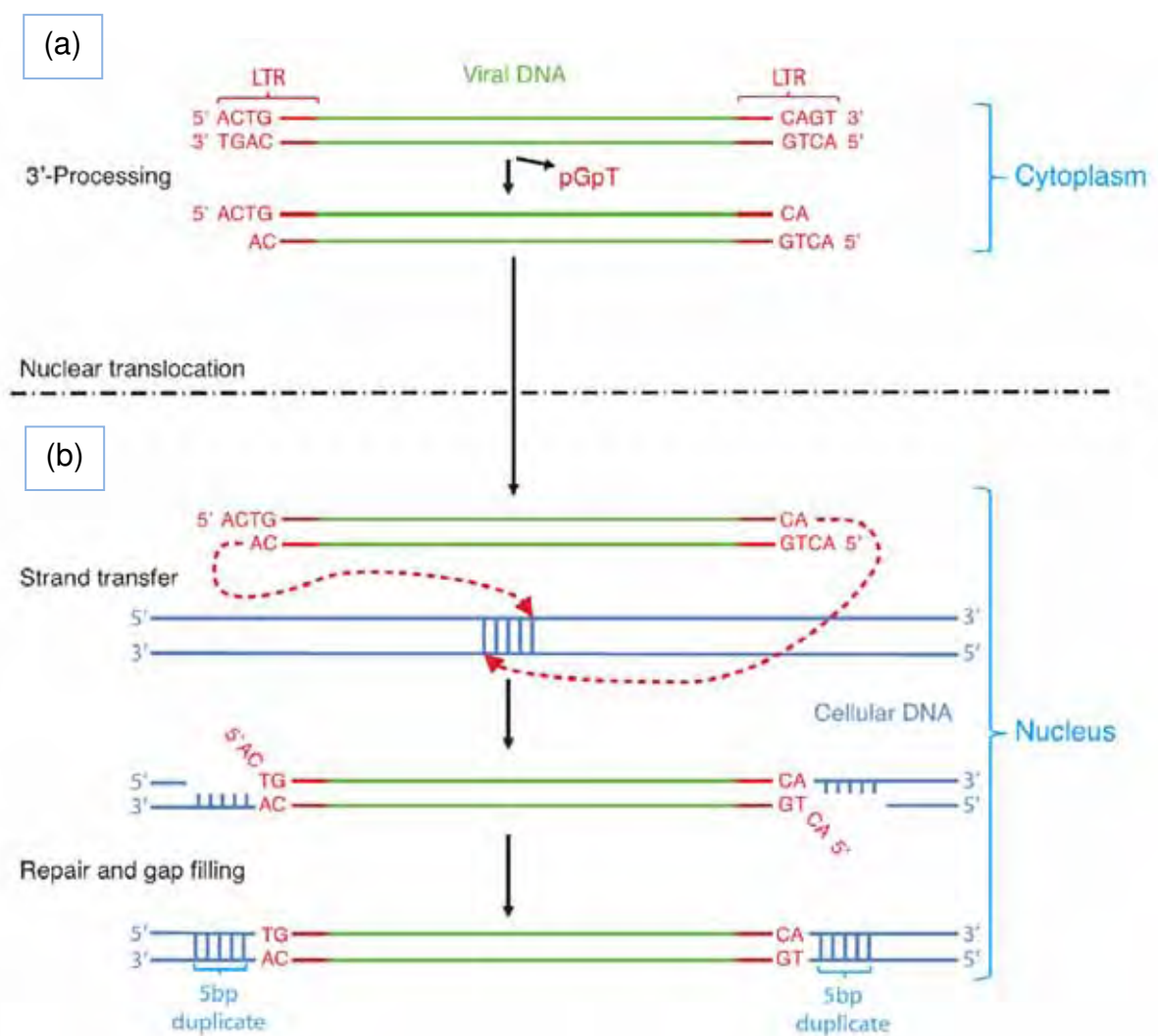


Figura 7: Processo de integração. A IN catalisa a integração do DNA viral ao DNA celular em dois passos distintos. (a) Primeiramente, a IN cliva o dinucleotídeo GT de ambas as extremidades 3' do DNA viral (vermelho) através do processamento 3'. (b) Após a importação nuclear, a reação de transferência de fita leva à integração do DNA viral (verde) ao DNA celular (azul). Proteínas celulares posteriormente reparam as junções recém-criadas (Adaptado de Métifiot et al., 2010).

A seleção do sítio de integração do HIV demonstra mínima seletividade em relação à sequência cromossomal na qual ocorre a integração (CARTEAU; HOFFMANN; BUSHMAN, 1998; SCHRÖDER et al., 2002). No entanto, o HIV integra preferencialmente em regiões enriquecidas por unidades transcricionais ativas (SCHRODER et al., 2002; WU et al., 2003; MITCHELL et al., 2004). Já os sítios de integração do vírus da leucemia murina ou MLV, do inglês *murine leukemia virus*, são regiões próximas as de início de transcrição e ilhas CpG (WU et al., 2003); sítios de integração do vírus do sarcoma aviário estão distribuídos de forma quase aleatória, mostrando somente um pequeno favorecimento para unidades transcricionais e não favorecimento para sítio de início de transcrição (MITCHELL et al., 2004; NAREZKINA et al., 2004). É plausível que fatores celulares, como o remodelamento da cromatina e complexos de transcrição, como aqueles ligados à integrase nos PICs, estejam implicados na seleção do sítio de integração do HIV dentro de genes transcritos (POMMIER; JOHNSON; MARCHAND, 2005).

O LEDGF/p75 interage com a IN através de seu domínio de ligação à integrase (*Integrase Binding Domain*, IBD) (resíduos 341-429) (CHEREPANOV et al., 2005; VANEGAS et al., 2005). Os sítios de ligação para o LEDGF/p75 na IN estão localizados principalmente dentro do CCD e ao redor dos aminoácidos W₁₃₁, W₁₃₂ e I₁₆₁-E₁₇₀ (CHEREPANOV et al., 2005; EMILIANI et al., 2005; RAHMAN et al., 2007; BUSSCHOTS, 2007). O LEDGF/p75 apresenta múltiplas funções durante a infecção do HIV-1 pelas interações com a enzima IN, como a proteção desta contra degradação proteossomal (LLANO et al., 2004), afetando potencialmente o transporte nuclear da IN (MAERTENS et al., 2003; LLANO et al., 2004); estabilizando a enzima como um tetrâmero (MCKEE et al., 2008); potencializando as atividades enzimáticas da IN (TURLURE et al., 2006; MICHEL et al., 2009) e, mais interessadamente, atuando como fator de ligação entre a IN e a cromatina, levando os PICs a regiões transcricionais ativas dos cromossomos do hospedeiro (MAERTENS et al., 2003; LLANO et al., 2004). A interação desta proteína celular com a proteína viral integrase é uma proposta a um novo alvo da terapia antirretroviral (ENGELMAN; CHEREPANOV, 2008; ARHEL; KIRCHHOFF, 2010).

Desde o final dos anos 90, diversos inibidores com atividade antiviral foram identificados e desenvolvidos, como os inibidores de integrase. Foram descritas

duas classes de inibidores: os que interferem no processamento do final 3' no citoplasma e os que agem na transferência de fita no núcleo. Apesar de ambas as classes serem capazes de bloquear a replicação do HIV em cultura celular, somente a segunda classe demonstrou atividade antirretroviral *in vivo* (EGBERTSON, 2007; SEMENOVA; MARCHAN; POMMIER, 2008).

Utilizando ensaios bioquímicos, diversas classes de inibidores de IN foram descobertas durante os últimos 17 anos (DELELIS et al., 2008; MARCHAND et al., 2009; RAMKUMAR et al., 2010). Produtos naturais hidroxilados como dihidroxinaftoquinonas, isoflavonas, ácido chicórico e ácido caféico foram reportados nos estudos bioquímicos iniciais (FESEN et al., 1993, ROBINSON et al., 1996). Derivados foram desenvolvidos (CAPE, 5-CITEP, V-165) e a família mais importante de inibidores que emergiu foi a dos ácidos diquetos (*diketo acids*, DKA) (HAZUDA et al., 2000). L-870, 810 (Merck & Co.) e S-1360 (Shionogi & Co. Ltd. E GlaxoSmithKline) foram os primeiros inibidores de IN semelhantes ao DKA que alcançaram os ensaios clínicos. Os derivados do DKA são inibidores seletivos do processo de transferência de fita, com alta especificidade pelo complexo IN-DNA e atividade antiviral. Ensaios clínicos com S-1360 e L-870, 810 foram finalizados na fase I/II e II devido à eficácia limitada e toxicidade em cachorros, respectivamente (MARCHAND et al., 2009; RAMKUMAR et al., 2010).

O Raltegravir (RAL) (Figura 8) foi o primeiro e ainda é o único inibidor de IN aprovado pelo FDA para o tratamento de pacientes que possuem falha à HAART. Ele foi desenvolvido pela Merck e Co. depois de anos de estudos e é comercialmente conhecido como Isentres[®]. Como para o DKA, o mecanismo de inibição do RAL é específico para o passo de transferência de fita da integração e propõe-se que envolva a quelatação de um ou dois metais dentro do sítio ativo da IN após o processamento dos finais do DNA viral (GROBLER et al., 2002; SEMENOVA; MARCHAND; POMMIER, 2008).

Estruturas cristalinas obtidas com o RAL ligado a toda extensão da IN do PFV confirmou o modo de ligação aos dois metais (HARE et al., 2010). A ligação do RAL também induz o deslocamento do DNA viral dentro do sítio ativo da IN, movendo o terminal 3'-A do CA conservado da sua posição original (HARE et al., 2010). O RAL também interage por forças de Van Der Waals (VDW) com o

dinucleotídeo conservado CA e com a quarta guanina do final da fita não clivada (pareada com o C conservado). Além disso, o RAL liga-se a diversos aminoácidos por interações de VDW, por interações hidrofóbicas e de empilhamento. Ligações polares também ocorrem com a tríade DDE e com os dois Mg^{2+} . Este modo de ligação está consistente com o paradigma de inibição interfacial (POMMIER; JOHNSON; MARCHAND, 2005; POMMIER; CHERFILS, 2005) no qual foi proposto que o RAL se liga à interface da IN e do seu substrato de DNA após o processamento 3´.

O RAL possui uma toxicidade notavelmente baixa, apresenta uma alta potência e farmacocinética favorável. É administrado oralmente na dose de 400 mg duas vezes ao dia, levando a níveis de RNA viral abaixo do detectável antes de 48 semanas de tratamento (MARKOWITZ et al., 2007). A principal via de degradação do RAL envolve a glucuronidação (CORRELL; KLIBANOV, 2008) e sua meia-vida apresenta duas fases: a primeira de uma hora, seguida pela segunda de 7-12 horas.

O RAL foi primeiramente aprovado para uso em combinação com regimes antirretrovirais para pacientes previamente submetidos a tratamento e que apresentavam resistência a múltiplas drogas antirretrovirais (ARVs). No entanto, o FDA aprovou o uso desta droga para pacientes virgens de tratamento baseado nos resultados do estudo de fase III (STARTMRK) (LENNOX et al., 2009), que mostrou que o RAL é tão eficiente como o Efavirenz na supressão da carga viral. O painel de orientação dos Estados Unidos, *Guidelines for the Use of Antiretroviral in HIV-1 Infected Adults and Adolescents*, recomenda o início do tratamento de pacientes virgens com a combinação Raltegravir + Tenofovir + Emcitabina, devido a sua eficácia virológica ideal e durável e por possuir perfis de tolerabilidade e toxicidade favoráveis (DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 2009). No Brasil, o RAL é utilizado somente em esquemas de resgate, ou seja, quando o paciente apresenta falha virológica, não sendo aprovada sua utilização para pacientes virgens de tratamento (BRASIL, 2008a).

No entanto, da mesma forma que para os inibidores de TR e PR, a alta variabilidade genética do HIV, associada à ausência de atividade de reparo da TR, e a pressão seletiva do medicamento, podem conduzir a emergência de variantes virais resistentes, as quais são viáveis e podem ser transmissíveis. Assim, a

resistência aos inibidores de integrase também pode ser um obstáculo ao sucesso terapêutico.

As mutações primárias que conduzem à falência terapêutica ao RAL já foram descritas e envolvem três vias genéticas independentes e não sobrepostas: mutação N155H, mutações Q148H/R/K e mutações menos frequentes Y143R/C/H (COOPER et al., 2008; FRANSEN et al., 2009). Estas mutações também afetam a atividade da IN e a replicação viral (MARINELLO et al., 2008; FRANSEN et al., 2009; DELELIS et al., 2009; DELELIS et al., 2010). Algumas mutações podem envolver mecanismos independentes da integração, como a mutação Y143G que interfere na realização da transcrição reversa (TSURUTANI et al., 2000; DELELIS et al., 2010).

Mutações adicionais foram relatadas, como a V72I, L74M, E92Q, T97A, E138A/K, G140S/A, V151I, E157Q, G163R/K, D232N (MALET et al., 2008; LOW et al., 2009; LOIZIDOU et al., 2009; SICHTIG et al., 2009). Estas aparecem especificamente para cada mutação primária, ou seja, mutações secundárias na posição E92 estão relacionadas tanto com N155 ou Y143; mutação secundária na posição T97 com Y143; e mutação secundária na posição G140 com Q148 (QUERCIA et al., 2009). Estas mutações secundárias provavelmente aumentam a resistência ao RAL (E92) e/ou restabelecem a atividade defeituosa da IN e o *fitness* viral (G140) resultantes das mutações primárias (FRANSEN et al., 2009; DELELIS et al., 2009). A mutação dupla nas posições 140 e 148 é a combinação mais comum (FRANSEN et al., 2009; QUERCIA et al., 2009). Nos pacientes, G140A tende a estar associada com Q148R, e G140S com Q148H/K. Estudos bioquímicos de IN recombinante demonstraram que somente a combinação G140S-Q148H dentro do mesmo polipeptídeo de IN pode resgatar a atividade bioquímica da IN e conferir alta resistência ao RAL (MÉTIFIOT et al., 2010). Para a mutação primária N155H, a mutação secundária E92Q aumenta significativamente a resistência (de 15-30 vezes para o N155H a cerca de 500 vezes para a mutação dupla) (FRANSEN et al., 2009; QUERCIA et al., 2009). A terceira via de mutação, envolvendo a posição Y143, tem sido menos investigada e parece diminuir acentuadamente a atividade da IN e o *fitness* viral. Tanto a mutação Y143R, como a Y143C afetam o processamento 3', porém a atividade de transferência de fita do mutante Y143R é menos afetada do que a do Y143C. Embora tais vírus mutantes possam apresentar alta resistência ao

RAL, a baixa capacidade de replicação pode explicar o aparecimento tardio nos pacientes (DELELIS et al., 2010).

O Elvitegravir (EVG = GS-9137 = JTK-303) (Figura 8) é, após o RAL, o inibidor de IN mais avançado nos estudos clínicos (fase III) e ainda não foi aprovado pelo FDA. Este ácido carboxílico derivado de quinolona foi originalmente desenvolvido pela *Japan Tobacco Inc.* sob o nome JTK-303 (SATO et al., 2006). JTK-303 foi subsequentemente licenciado pela *Gilead Sciences* sob o nome GS-9137 para o desenvolvimento em todos os países, exceto Japão. O EVG é levemente mais potente do que o RAL *in vitro* e *ex vivo* (MARINELLO et al., 2008; KOBAYASHI et al., 2008), mas apresenta uma citotoxicidade potencialmente maior em células não infectadas (SATO et al., 2006). Uma limitação do EVG é que, diferentemente do RAL, é metabolizado pelo citocromo P450 (CYP3A4/5) e secundariamente por glucuronidação (UGT1A1/3) para produção de metabólitos que são menos potentes do que a droga original (RAMANATHAN et al., 2007). A coadministração com Ritonavir, inibidor de PR, aumenta as concentrações sistêmicas do EVG em torno de 20 vezes (RAMANATHAN et al., 2007), o que pode possibilitar o uso da droga uma vez ao dia (DELELIS et al., 2009).

A resistência ao EVG está associada com mutações primárias específicas, como a T66I e S147G, além das mutações de resistência comuns ao RAL (E92Q, Q148H/R/K e N155H) (SHIMURA et al., 2008; LOW et al., 2009; CECCHERINI-SILBERSTEIN et al., 2009). Como para o RAL, mutações secundárias são selecionadas sob a exposição ao EVG. As mutações H51Y, T66A/K, L68I/V, S119R/G, G140C, S153Y, K160N, R166S, E170A, S230R e R263K são selecionadas especificamente, além das E138K, G140S, E157Q e D232N, as quais são comuns ao RAL (CECCHERINI-SILBERSTEIN et al., 2009). O fator de resistência induzido pela mutação dupla G140S-Q148H é maior com EVG do que com RAL (MARINELLO et al., 2008, MÉTIFIOT et al., 2010) e estudos comparativos das estruturas cristalinas dos dois medicamentos demonstrou que a mutação Y143, que abriga uma interação com o anel oxadiazol do RAL, não possui tal interação forte com o EVG, levando a pesquisas que visam determinar se o EVG permanece ativo contra mutantes Y143 que são selecionadas pela exposição ao RAL (DA SILVA et al., 2010).

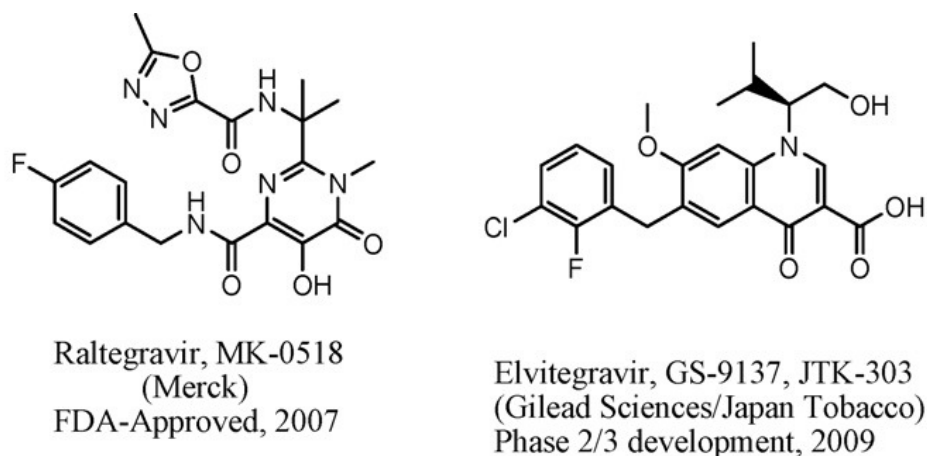


Figura 8: Estruturas químicas dos inibidores de integrase Raltegravir e Elvitegravir (Adaptado de McColl, Chen, 2010).

O S/GSK1349572 representa a próxima geração de inibidores de integrase em investigação que preferencialmente bloqueia o processo de transferência de fita e está sendo desenvolvido pela *Shionogi-GlaxoSmithKline (S-GSK) Pharmaceuticals, LLC* (USA) com a finalidade de manter a atividade contra variantes resistentes ao RAL e EVG (KOBAYASHI et al., 2010). O mecanismo proposto de inibição envolve a ação quelante da droga sobre os dois íons Mg^{2+} presentes no sítio ativo catalítico D,D(35)E da integrase. O S/GSK1349572 foi selecionado para os testes clínicos devido aos estudos não-clínicos que demonstraram um perfil de segurança favorável, farmacocinética que suporta uma dose única diária e a potencial atividade contra HIV resistente ao RAL e EVG. A primeira via de metabolização envolve glucuronidação e o composto não demonstra indução ou inibição das isoenzimas do citocromo P450 *in vitro* (MIN et al., 2010).

A interação e o efeito antirretroviral de inibidores de integrase com ARVs de outras classes foram estudados e demonstrou-se que a utilização do RAL em combinação com Tenofovir e Lamivudina apresenta uma rápida, potente e durável eficácia antirretroviral e um perfil favoravelmente seguro, quando comparado com o tratamento com Efavirenz, Tenofovir e Lamivudina (MARKOWITZ et al., 2007). Além disso, estudo da interação entre RAL e Tenofovir indicou que a coadministração

destes antirretrovirais é, geralmente, bem tolerada e não altera a farmacocinética de ambos os medicamentos, indicando que podem ser coadministrados sem ajuste de dose (WENNING et al., 2008).

No entanto, apesar dos grandes avanços na terapêutica antirretroviral um grande obstáculo ao sucesso terapêutico é a seleção de vírus resistentes. Além da resistência secundária, induzida pela pressão seletiva do esquema terapêutico nos pacientes em tratamento, conduzindo à emergência de variantes resistentes a determinadas drogas, há também a resistência primária, que ocorre devido à transmissão dessas variantes previamente selecionadas e resistentes, comprometendo o tratamento de indivíduos recentemente infectados e não tratados (YERLY et al., 1999).

A transmissão de variantes resistentes a drogas está aumentando ao longo do tempo, com uma prevalência global em torno de 9,1-14,5%, e prevalência de mutações de resistência ao inibidor de TR não-nucleosídeo entre 2,6 e 8,4% na América do Norte e na Europa (BENNETT et al., 2005; WENSING et al., 2006; CUZIN et al., 2008). O uso generalizado de regimes ARVs potentes entre os pacientes infectados tanto na fase inicial como na posterior, pode aumentar o número de indivíduos em que a resistência à droga é selecionada durante a terapia e, talvez, intensificar o risco da população para transmissão de HIV resistente. A resistência primária e secundária ao HIV é uma das principais preocupações em um país como o Brasil, onde há o acesso generalizado à terapia antirretroviral. De fato, 44,8% de indivíduos que apresentam falha ao tratamento ARV no Brasil irão ter resistência a duas classes de drogas ARVs e 34% apresentarão resistência às três classes de ARVs (MUNERATO et al., 2010). No Brasil, a frequência de resistência primária é considerada baixa, variando entre 1,4 e 8,3% (DE MEDEIROS et al., 2006; BRÍGIDO et al., 2007; INOCÊNCIO et al., 2009).

Com o objetivo de monitorar a transmissão de variantes resistentes a drogas e o perfil de subtipos circulantes no Brasil, uma Rede Nacional para a Vigilância de Resistência à Droga foi estabelecida em 2000. A pesquisa conduzida em 2007/8 relatou que, entre as 210 amostras estudadas de indivíduos no estágio inicial da infecção, 17 (8,1%) carregavam mutações primárias de resistência. As mutações mais prevalentes foram as relacionadas com inibidores de TR não-análogos a

nucleosídeos (K103N e Y188L/I), seguidas das associadas com inibidores análogos à nucleosídeos e com os inibidores de protease. A principal mutação encontrada para os inibidores de PR foi a M46I, seguida da L90M (INOCÊNCIO et al., 2009). Interessantemente, a mutação K103N obteve um aumento significativo quando comparada com a pesquisa realizada em 2002. Provavelmente, este fato reflete o uso generalizado do Efavirenz no primeiro regime ARV no Brasil (INOCÊNCIO et al., 2009).

Terapias subótimas podem acelerar a emergência de variantes multidrogas resistentes pelo acúmulo de mutações específicas inibitórias. No entanto, a combinação de terapias também pode selecionar outros padrões mutacionais conferindo resistência a múltiplas drogas. Por exemplo, a aquisição da resistência através da via Q151M foi primeiramente observada em vírus isolados de pacientes que recebiam Zidovudina e Didanosina (SHIRASAKA et al., 1995), e não foram previamente detectadas em indivíduos sob monoterapia com Zidovudina ou Didanosina.

Substituições de um único aminoácido (Y181C, K103N, G190A) que surgem da mudança de um único nucleotídeo são frequentemente suficientes para conferir resistência de alto nível à Nevirapina, Delavirdina e a outros inibidores de TR não-nucleosídeos. A mutação K103N confere resistência ao Efavirenz, mas também à Nevirapina e Delavirdina (MENÉNDEZ-ARIAS, 2010).

A resistência aos inibidores de PR é alcançada pela aquisição de mutações que resultam em mudanças conformacionais no interior e ao redor do sítio ativo, levando à redução da incorporação ou ligação do inibidor. Em geral, a barreira genética – número de mutações requeridas para superar a pressão seletiva da droga – para os inibidores de protease é relativamente alta, requerendo duas ou mais mudanças de aminoácidos para conferir resistência significativa (MENÉNDEZ-ARIAS, 2010).

Em 2009, Sichtig et al. sequenciaram 209 amostras de pacientes para estudo da evolução de resistência ao RAL durante a terapia com este antirretroviral. A princípio, nenhuma mutação primária foi detectada. Mutações secundárias foram observadas em uma frequência inferior a 4% e as mutações principais N155H,

Q148R/H ou Q143R somente foram detectadas durante a terapia. Já a mutação Y143R foi observada após uso prolongado de RAL. Este inibidor de integrase demonstrou atividade antiviral em cultura celular contra um largo painel de HIV isolados, incluindo isolados primários de vários subtipos, isolados resistentes aos inibidores de PR, de TR análogos de nucleosídeos e aos não-análogos (MILLER et al., 2006). Apesar do sucesso do RAL, a baixa barreira genética da IN do HIV-1 compromete a suscetibilidade dos vírus a este antirretroviral. Uma única mutação nos códon 143, 148 ou 155 da integrase viral é suficiente para induzir a falha virológica (COOPER et al., 2008), no entanto essas mutações também prejudicam a replicação viral. Há relatos que mutações adicionais podem aumentar a resistência e/ou recuperar a replicação viral (MILLER et al., 2008; NAKAHARA et al., 2009).

O desenvolvimento de resistência é causa frequente de falência terapêutica e gera dificuldades para a opção de tratamento e controle da viremia, pois a resistência antirretroviral pode levar à resistência cruzada (PERRIN; TELENTI, 1998). Uma determinada mutação que confere resistência a uma droga acaba por gerar resistência a mais de uma droga de uma determinada classe ou a toda uma classe de drogas. Desta forma, os testes de resistência vêm mostrando-se bastante úteis, sendo indicados nos casos de falência terapêutica de um determinado esquema ARV (CHAIX-COUTURIER et al., 2000) e, mais recentemente, para a indicação de um esquema terapêutico, quando se considera o contexto da resistência primária. Assim, há duas principais aplicações para os testes de resistência: avaliar as drogas que podem ser empregadas na terapia e o acompanhamento do paciente durante o tratamento (RICHMAN, 2000).

Nos últimos anos o desenvolvimento de tecnologias para a realização de ensaios automatizados para a rápida caracterização do genótipo (genotipagem) e fenótipo (fenotipagem) do HIV em amostras de plasma tornou possível a utilização de tais tecnologias para avaliação e monitoramento do tratamento antirretroviral (HIRSCH et al., 2000). A genotipagem consiste na pesquisa de mutações de ponto em códons específicos que revelam se houve troca de aminoácidos em regiões determinadas que estão relacionadas com a resistência às drogas (RICHMAN, 2000; CHAIX-COUTURIER et al., 2000), enquanto que a fenotipagem consiste na determinação de suscetibilidade às drogas *in vitro* em um ensaio que envolve cultura

viral (BALLARD; CANE; PILLAY, 1998). Neste sentido, os testes de resistência às drogas tornaram-se parte integral do acompanhamento de um paciente infectado com o HIV (RICHMAN, 2000).

No Brasil, o teste de resistência aos antirretrovirais é disponível pela Rede Nacional de Laboratórios de Genotipagem (RENAGENO) do Programa Nacional DST/AIDS, e utiliza teste de resistência genotípica para inibidores da transcriptase reversa e protease (BRASIL, 2008b). No entanto, um grande número de pacientes vem se mostrando resistente a estas duas classes de antirretrovirais, demonstrando uma tendência à introdução dos inibidores de integrase no cenário brasileiro.

No entanto, embora os inibidores de integrase sejam utilizados hoje no esquema antirretroviral de alguns pacientes com falha terapêutica a esquemas anteriores, ainda não existe um teste disponível que avalie a resistência à esta nova classe de drogas no Brasil.

Neste contexto, a finalidade deste estudo foi padronizar uma metodologia *in-house* para análise do gene da integrase do HIV-1 na falta de uma metodologia comercial com este objetivo e, conseqüentemente, determinar a presença de mutações de resistência em amostras isoladas de pacientes virgens de tratamento com inibidores de integrase no Brasil.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. Citocinas. In:_____. **Imunologia: celular e molecular**. Rio de Janeiro: Revinter, 1998. p.253-76.

AL MAWSAWI L.Q.; AL SAFI R.I.; NEAMATI, N. Anti-infectives clinical progress of HIV-1 integrase inhibitors. **Expert Opin Emerg. Drugs.**, v.13, n.2, p. 213-225, jun. 2008.

ARHEL, N.; KIRCHHOFF, F. Host proteins involved in HIV infection: new therapeutic targets. **Biochim. Biophys Acta.**, v.1802, n.3, p.313-21, mar. 2010.

BALLARD, A.L.; CANE, P.A.; PILLAY D. HIV drug resistance: genotypic assays and their possible applications. **Sex. Transm. Infect.**, v.74, n.4, p.243-248, aug. 1998.

BARRÉ-SINOUSSE, F. HIV as the cause of AIDS. **Lancet**, v.348, n.9010, p.31-5, jul. 1996.

BENNETT, D. et al. U.S. Surveillance of HIV drug resistance at diagnosis using HIV diagnostic sera. In: XII CONFERENCE ON RETROVIRUSES & OPPORTUNISTIC INFECTIONS, 2005, Boston, Massachusetts, Abstract no. 674.

BERGER, E.A. et al. A new classification for HIV-1. **Nature**, v.391, n.6664, p.240, jan. 1998.

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

BOUYAC-BERTOIA, M. et al. HIV-1 infection requires a functional integrase NLS. **Mol Cell.**, v.7, n.5, p.1025-35, may 2001.

BOWERMAN, B. et al. A nucleoprotein complex mediates the integration of retroviral DNA. **Genes Dev.**, v.3, n.4, p.469-78, apr. 1989.

BRASIL. Ministério da Saúde. Tratamento de HIV e aids. **Recomendações para terapia antirretroviral em adultos infectados pelo HIV – 2008b – Versão final.** Brasília. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pagina/recomendacoes-de-tratamento>>. Acesso em: 15 abr 2009b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Tratamento de HIV e Aids. **Recomendações para terapia antirretroviral em adultos infectados pelo HIV – 2008a. Suplemento I – Manejo da Falha Terapêutica.** Brasília. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pagina/recomendacoes-de-tratamento>>. Acesso em: 12 nov. 2010.

BRÍGIDO, L.F. et al. HIV type 1 subtype C and CR Pol recombinants prevail at the cities with the highest AIDS prevalence rate in Brazil. **AIDS Res. Retroviruses**, v.23, n.12, p.1579-86, dec. 2007.

BROWN, P.O. Integration of retroviral DNA. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v.157, p.19-48, 1990.

BUKRINSKY, M.I. et al. Active nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.89, n.14, p.6580-4, jul. 1992.

BUSSCHOTS, K. et al. Identification of the LEDGF/p75 binding site in HIV-1 integrase. **J. Mol. Biol.**, v.365, n.5, p.1480-92, feb., 2007.

CAI, M. et al. Solution structure of the N-terminal zinc binding domain of HIV-1 integrase. **Nat. Struct. Biol.**, v.4, n.7, p.567-77, jul. 1997.

CARTEAU, S.; HOFFMANN, C.; BUSHMAN, F. Chromosome structure and human immunodeficiency virus type 1 cDNA integration: centromeric alphoid repeats are a disfavored target. **J. Virol.**, v.72, n.5, p.4005-14, may 1998.

CECHERINI-SILBERSTEIN, F. et al. Characterization and structural analysis of HIV-1 Integrase conservation. **AIDS Rev.**, v.11, n.1, p.17-29, jan-mar 2009.

CHAIX-COUTURIER, C. et al. HIV-1 drug resistance genotyping: a review of clinical and economic issues. **Pharmacoeconomics**, v.18, n.5, p.425-433, nov. 2000.

CHEN, C.H. et al. A molecular clasp in the human immunodeficiency virus (HIV) TM protein determines the anti-HIV activity of gp41 derivatives: implication for viral fusion. **J. Virol.**, v.69, n.6, p.3771-7, jun. 1995.

CHEREPANOV, P. et al. HIV-1 integrase forms stable tetramers and associates with LEDGF/p75 protein in human cells. **J. Biol. Chem.**, v.278, n.1, p.372-81, jan. 2003.

CHEREPAVOV, P. et al. Structural basis for the recognition between HIV-1 integrase and transcriptional coactivator p75. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.102, n.48, p.17308-13, nov. 2005.

CHIU, T.K.; DAVIES, D.R. Structure and function of HIV-1 integrase. **Curr. Top. Med. Chem.**, v.4, n.9, p.965-977, 2004.

CHOW, S.A. et al. Reversal of integration and DNA splicing mediated by integrase of human immunodeficiency virus. **Science**, v.255, n.5045, p.723-6, feb. 1992.

CONNOR, R.I.; HO, D.D. Etiology of AIDS: biology of human retroviruses. In: DEVITA, V.T. Editor. **AIDS etiology, diagnosis, treatment and prevention**. Philadelphia: J.B. Lippincott Company; 1992. p. 13-85.

COOPER, D.A. et al. Subgroup and resistance analyses of raltegravir for resistant HIV-1 infection. **N. Engl. J. Med.**, v.359, n.4, p.355-65, jul.2008.

CORRELL, T.; KLIBANOV, O.M. Integrase inhibitors: a new treatment option for patients with human immunodeficiency virus infection. **Pharmacotherapy**, v.28, n.1, p.90-101, jan. 2008.

CRAIGIE, R. HIV integrase, a brief overview from chemistry to therapeutics. **J. Biol. Chem.**, v.276, n.26, p.23213-6, jun. 2001.

CUZIN, L. et al. Boosted protease inhibitor-based or nonnucleoside reverse transcriptase-based HAART: is there a best choice for antiretroviral-naïve HIV-1 infected patients?. **AIDS Rev.**, v.10, n.4, p.205-11, oct-dec. 2008.

DA SILVA, D. et al. HIV-1 resistance patterns to integrase inhibitors in antiretroviral-experienced patients with virological failure on raltegravir-containing regimens. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.65, n.6, p.1262-9, jun. 2010.

DANIEL, R. et al. Evidence that stable retroviral transduction and cell survival following DNA integration depend on components of the nonhomologous end joining repair pathway. **J. Virol.**, v.78, n.16, p.8573-81, aug. 2004.

DE MEDEIROS, L.B. et al. Primary resistance of human immunodeficiency virus type 1 in a reference center in Recife, Pernambuco, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.101, n.8, p.845-9, dec. 2006.

DELELIS, O. et al. Impact of Y143 HIV-1 integrase mutations on resistance to raltegravir in vitro and in vivo. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.54, n.1, p.491-501, jan. 2010.

DELELIS, O. et al. Integrase and integration: biochemical activities of HIV-1 integrase. **Retrovirology**, v.17, n.114, dec. 2008.

DELELIS, O. et al. The G140S mutation in HIV integrases from raltegravir-resistant patients rescues catalytic defect due to the resistance Q148H mutation. **Nucleic Acids Res.**, v.37, n.4, p.1193-201, mar. 2009.

DENG, H. et al. Identification of a major coreceptor for primary isolates of HIV-1. **Nature**, v.381, n.6584, p.661-6, jun. 1996.

DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents. **Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents – December 2009**. Disponível em: <<http://www.aidsinfo.nih.gov/ContentFiles/AdultandAdolescentGL.pdf>>. Acesso em: 05 dez. 2010.

DORANZ, B.J. et al. A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. **Cell**. V.85, n.7, p.1149-58, jun. 1996.

DRELICH, M.; WILHELM, R.; MOUS, J. Identification of amino acid residues critical for endonuclease and integration activities of HIV-1 IN protein in vitro. **Virology**, v.188, n.2, p.459-468, jun. 1992.

ECKERT, D.M.; KIM, P.S. Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition. **Annu. Rev. Biochem.**, v.70, p.777-810, 2001.

EGBERTSON, M.S. HIV integrase inhibitors: from diketoacids to heterocyclic templates: a history of HIV integrase medicinal chemistry at Merck West Point and Merck Rome (IRBM). **Curr. Top. Med. Chem.**, v.7, n.13, p.1251-1272, 2007.

EIJKLENBOOM, A.P. et al. The DNA-binding domain of HIV-1 integrase has an SH3-like fold. **Nat. Struct. Biol.**, v.2, n.9, p.807-10, sep. 1995.

ELLISON, V.; BROWN, P.O. A stable complex between integrase and viral DNA ends mediates human immunodeficiency virus integration in vitro. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.91, n.15, p.7316-20, jul. 1994.

EMILIANI, S. et al. Integrase mutants defective for interaction with LEDGF/p75 are impaired in chromosome tethering and HIV-1 replication. **J. Biol. Chem.**, v.280, n.27, p.25517-23, jul. 2005.

ENGELMAN, A.; CHEREPANOV, P. The lentiviral integrase binding protein LEDGF/p75 and HIV-1 replication. **PLoS Pathog.**, v.4, n.3, p.e1000046, mar. 2008.

ENGELMAN, A.; CRAIGIE, R. Identification of conserved amino acid residues critical for human immunodeficiency virus type 1 integrase function in vitro. **J. Virol.** v.66, n.11, p.6361-6369, nov. 1992.

ENGELMAN, A.; MIZUUCHI, K.; CRAIGIE, R.. HIV-1 DNA integration: mechanism of viral DNA cleavage and DNA strand transfer, **Cell**, v.67, n.6, p.1211-1221, dec. 1991.

ESPESETH, A.S. 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 USA.**, v.97, n.21, p.11244-11249, oct. 2000.

ESTÉ, J.A.; TELENTI, A. HIV entry inhibitors. **Lancet**, v.370, n.9581, p.81-8, jul. 2007.

FANALES-BELASIO, E. et al. HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. **Ann Ist. Super Sanita**, v.26, n.1, p. 5-14, 2010.

FESSEN, M.R. et al. Inhibitors of human immunodeficiency virus integrase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.90, n.6, p.2399-403, mar. 1993.

FLETCHER, C.V. Enfuvirtide, a new drug for HIV infection. **Lancet**, v.361, n.9369, p.1577-8, may 2003.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Antiretroviral drugs used in the treatment of HIV infection: drugs used in the treatment of HIV infection**. Estados Unidos, 2010. Disponível em: <<http://www.fda.gov/ForConsumers/ByAudience/ForPatientAdvocates/HIVandAIDSactivities/ucm118915.htm>>. Acesso em: 13 jun 2010.

FRANSEN, S. et al. Loss of raltegravir susceptibility by human immunodeficiency virus type 1 is conferred via multiple nonoverlapping genetic pathways. **J. Virol.**, v.83, n.22, p.11440-6, nov. 2009.

FUENTES, G.M; FAY, P.J.; BAMBARA, R.A. Relationship between plus strand DNA synthesis removal of downstream segments of RNA by human immunodeficiency virus, murine leukemia virus and avian myeloblastoma virus reverse transcriptases. **Nucleic. Acids Res.**, v.24, n.9, p.1719-26, may 1996.

FUNG, H.B.; GUO, Y. Enfuvirtide: a fusion inhibitor for the treatment of HIV infection. **Clin. Ther.**, v.26, n.3, p.352-78, mar 2004.

GALLANT, J.E. Initial therapy of HIV infection. **J. Clin. Virol.**, v.25, n.3, p.317-333, dec. 2002.

GOLDGUR, Y. et al. Three new structures of the core domain of HIV-1 integrase: an active site that binds magnesium. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.95, n.16, p.9150-9154, aug. 1998.

GROBLER, J.A. et al. Diketo acid inhibitor mechanism and HIV-1 integrase: implications for metal binding in the active site of phosphotransferase enzymes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.99, n.10, p.6661-6, may 2002.

HARE, S. et al. Retroviral intasome assembly and inhibition of DNA strand transfer. **Nature**, v.464, n.7286, p.232-6, mar. 2010.

HAZUDA, D.J. et al. Inhibitors of strand transfer that prevent integration and inhibit HIV-1 replication in cells. **Science**, v.287, n.5453, p.646-650, jan. 2000.

HAZUDA, D.J. et al. Integrase inhibitors and cellular immunity suppress retroviral replication in rhesus macaques. **Science**, v.305, n.5683, p.528-532, jul. 2004.

HIRSCH, M.S. et al. Antiviral drug resistance testing in adults HIV infection Recommendations of an International AIDS Society – USA Panel. **J. Am. Med. Assoc.**, v.283, n.18, p.2417-26, may 2000.

HO, D.D. Perspectives series: host/pathogen interactions. Dynamics of HIV-1 replication in vivo. **J. Clin. Invest.**, v.99, n.11, p.2565-7, jun. 1997.

INOCENCIO, L.A. et al. Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance: a survey of individuals recently diagnosed with HIV. **J. Int. AIDS Soc.**, v.12, v.1, p.1-6, sep. 2009.

KOBAYASHI, M. et al. In vitro virology of S/GSK1349572, a next-generation HIV integrase inhibitor. **Antimicrob. Agents Chemother.** (Epub ahead of print), nov. 2010.

KOBAYASHI, M. et al. Selection of diverse and clinically relevant integrase inhibitor-resistant human immunodeficiency virus type 1 mutants. **Antiviral Res.**, v.80, n.2, p.213-22, nov. 2008.

KUHMANN, S.E.; HARTLEY, O. Targeting chemokine receptors in HIV: a status report. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v.48, p.425-61, 2008.

LATAILLADE, M.; KOZAL, M.J. The hunt for HIV-1 integrase inhibitors. **AIDS Patient Care STDS.**, v.20, n.7, p.489-501, jul. 2006.

LEE, S.P. et al. Zn²⁺ promotes the self-association of human immunodeficiency virus type-1 integrase in vitro. **Biochemistry**, v.36, n.1, p.173-80, jan. 1997.

LENNOX, J.L. et al. Safety and efficacy of raltegravir-based versus efavirenz-based combination therapy in treatment-naive patients with HIV-1 infection: a multicentre, double-blind randomised controlled trial. **Lancet**, v.374, n.9692, p.796-806, sep. 2009.

LLANO, M. et al. LEDGF/p75 determines cellular trafficking of diverse lentiviral but not murine oncoretroviral integrase proteins and is a component of functional lentiviral preintegration complexes. **J. Virol.**, v.78, n.17, p.9524-37, sep.2004.

LOIZIDOU, E.Z. et al. Implications of HIV-1 M group polymorphisms on integrase inhibitor efficacy and resistance: genetic and structural in silico analyses. **Biochemistry**, v.48, n.1, p.4-6, jan. 2009.

LOW, A. et al. Natural polymorphisms of human immunodeficiency virus type 1 integrase and inherent susceptibilities to a panel of integrase inhibitors. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.53, n.10, p.4275-82, oct. 2009.

LUTZKE, R.A.; PLASTERK, R.H. Structure-based mutational analysis of the C-terminal DNA-binding domain of human immunodeficiency virus type 1 integrase: critical residues for protein oligomerization and DNA binding. **J. Virol.**, v.72, n.6, p.4841-8, jun. 1998.

MAERTENS, G. et al. LEDGF/p75 is essential for nuclear and chromosomal targeting of HIV-1 integrase in human cells. **J. Biol. Chem.**, v.278, n.35, p.33528-39, aug. 2003.

MALET, I. et al. Mutations associated with failure of Raltegravir treatment affect integrase sensitivity to the inhibitor in vitro. **Antimicrob. Agents and Chemother.**, v.52, n.4, p.1351-1358, apr. 2008.

MARCHAND, C. et al. HIV-1 IN inhibitors: 2010 update and perspectives. **Curr. Top. Med. Chem.**, v.9, n.11, p.1016-37, 2009.

MARINELLO, J. et al. Comparison of raltegravir and elvitegravir on HIV-1 integrase catalytic reactions and on a series of drug-resistant integrase mutants. **Biochemistry**, v.47, n.36, p.9345-54, sep. 2008.

MARKOWITZ, M. et al. Rapid and durable antiretroviral effect of the HIV-1 integrase inhibitor Raltegravir as part of combination therapy in treatment-naive patients with HIV-1 infection. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr.**, v.46, n.2, p.125-133, oct. 2007.

MCCOLL, D.J., CHEN, X. Strand transfer inhibitors of HIV-1 integrase: Bringing IN a new era of antiretroviral therapy. **Antiviral Res.**, v.85, n.1, p.101-18, jan. 2010.

MCKEE, C.J. et al. Dynamic modulation of HIV-1 integrase structure and function by cellular lens epithelium-derived growth factor (LEDGF) protein. **J. Biol. Chem.**, v.283, n.46, p.31802-12, nov. 2008.

MENÉNDEZ-ARIAS, L. Molecular basis of human immunodeficiency virus drug resistance: An update. **Antiviral Res.**, v.85, n.1, p.210-31, jan. 2010.

MENÉNDEZ-ARIAS, L. Targeting HIV: antiretroviral therapy and development of drug resistance. **Trends Pharmacol. Sci.**, v.23, n.8, p.381-8, aug. 2002.

MÉTIFIOT, M. et al. Resistance to Integrase Inhibitors. **Viruses**, v.2, n.7, p.1347-1366, jun. 2010.

MICHEL, F. et al. Structural basis for HIV-1 DNA integration in the human genome, role of the LEDGF/P75 cofactor. **EMBO J.**, v.28, n.7, p.980-91, apr. 2009.

MILLER, M.D. et al. Biochemical and antiviral activity of MK-0518, a potent HIV integrase inhibitor. In: XVI INTERNATIONAL AIDS CONFERENCE, 2006, Toronto, Canada, Abstract No. ThAa0302.

MILLER, M.D. et al. Longitudinal analysis of resistance to the HIV-1 integrase inhibitor raltegravir: results from P005 a phase 2 study in treatment experienced

patients. In: XVII INTERNATIONAL HIV DRUG RESISTANCE WORKSHOP, 2008, Sitges, Spain, **Antivir. Ther.** 13 (Suppl. 3): A8.

MIN, S. et al. Pharmacokinetics and safety of S/GSK1349572, a next-generation HIV integrase inhibitor, in healthy volunteers. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.54, n.1, p.254-8, jan. 2010.

MITCHELL, R.S. et al. Retroviral DNA integration: ASLV, HIV, and MLV show distinct target site preferences. **PLoS Biol.**, v.2, n.8, p.E234, aug. 2004.

MOORE, J.P.; DOMS, R.W. The entry of entry inhibitors: a fusion of science and medicine. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.100, n.19, p.10598-602, sep. 2006.

MOUSCADET, J.F. et al. Resistance to HIV-1 integrase inhibitors: a structural perspective. **Drug Resist. Updat.**, v.13, n.4-5, p.139-50, aug.-oct. 2010.

MUNERATO, P. et al. HIV-1 Antiretroviral resistance mutations in subtypes B, C and F in the city of São Paulo. **AIDS Res. Hum. Retroviruses**, v.26, n.3, p.265-73, mar. 2010.

NAKAHARA, K. et al. Secondary mutations in viruses resistant to HIV-1 integrase inhibitors that restore viral infectivity and replication kinetics. **Antiviral Res.**, v.81, n.2, p.141-6, feb. 2009.

NAREZKINA, A. et al. Genome-wide analyses of avian sarcoma virus integration sites. **J. Virol.**, v.78, n.21, p.11656-63, nov. 2004.

PERNO, C.F. et al. Secondary mutations in the protease region of human immunodeficiency virus and virologic failure in drug-naïve patients treated with protease inhibitor-based therapy. **J. Infect. Dis.**, v.184, n.8, p.983-991, oct. 2001.

PERRIN, L.; TELENTI, A. HIV treatment failure: testing for resistance in clinical practice. **Science**, v.280, n.5371, p.1871-1873, jun. 1998.

POMMIER, Y.; CHERFILS, J. Interfacial protein inhibition: a nature's paradigm for drug discovery. **Trends Pharmacol. Sci.**, v.26, n.3, p.138-45, mar. 2005.

POMMIER, Y.; JOHNSON, A.A.; MARCHAND, C. Integrase inhibitors to treat HIV/Aids. **Nature Rev. Drug Disc.**, v.4, n.3, p.236-248, mar. 2005.

QUERCIA, R. et al. Selective-advantage profile of human immunodeficiency virus type 1 integrase mutants explains in vivo evolution of raltegravir resistance genotypes. **J. Virol.**, v.83, n.19, p.10245-9, oct. 2009.

RAHMAN, S. et al. Structure-based mutagenesis of the integrase-LEDGF/p75 interface uncouples a strict correlation between in vitro protein binding and HIV-1 fitness. **Virology**, v.357, n.1, p.79-90, jan. 2007.

RAMANATHAN, S. et al. Pharmacokinetics of coadministered ritonavir-boosted elvitegravir and zidovirine, didanosine, stavudine or abacavir. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr.**, v.46, n.2, p.160-6, oct. 2007.

RAMKUMAR, K. et al. HIV-1 integrase inhibitors: 2007-2008 update. **Med. Res. Rev.**, v.30, n.6, p.890-954, nov. 2010.

REN, J.; STAMMERS, D.K. Structural basis for drug resistance mechanisms for non-nucleoside inhibitors of HIV reverse transcriptase. **Virus Res.**, v.134, n.1-2, p.157-70, jun. 2008.

RICHMAN, D.D. Principles of HIV resistance testing and overview of assay performance characteristics. **Antivir. Ther.**, v.5, n.1, p.27-31, mar. 2000.

ROBERTSON, D.L. HIV-1 nomenclature proposal. In: KUIKEN, C.L. et al. **Human Retroviruses and AIDS 1999: A Compilation and Analysis of Nucleic Acid and Amino Acid Sequences**. Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM, 1999, p.492-505.

ROBINSON, W.E. Jr. et al. Inhibitors of HIV-1 replication [corrected; erratum to be published] that inhibit HIV integrase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.93, n.13, p.6326-31, jun. 1996.

SARAFIANOS, S.G. et al. Structure and function of HIV-1 reverse transcriptase: molecular mechanisms of polymerization and inhibition. **J. Mol. Biol.**, v.385, n.3, p.693-713, jan. 2009.

SATO, M. et al. Novel HIV-1 integrase inhibitors derived from quinolone antibiotics. **J. Med. Chem.**, v.49, n.5, p.1506-8, mar. 2006.

SATTENTAU, Q.J.; WEISS, R.A. The CD4 antigen: physiological ligand and HIV receptor. **Cell**, v.52, n.5, p.631-3, mar. 1988.

SCHRÖDER, A.R. et al. HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. **Cell**, v.110, n.4, p.521-9, aug. 2002.

SEMENOVA E.A.; MARCHAND, C.; POMMIER, Y. HIV-1 integrase inhibitors: update and perspectives. **Adv. Pharmacol.**, v.56, p.199-228, 2008.

SHIMURA, K. et al. Broad antiretroviral activity and resistance profile of the novel human immunodeficiency virus integrase inhibitor elvitegravir (JTK-303/GS-9137). **J. Virol.**, v.82, n.2, p.764-74, jan. 2008.

SHIRASAKA, T. et al. Emergence of human immunodeficiency virus type 1 variants with resistance to multiple dideoxynucleosides in patients receiving the therapy with dideoxynucleosides. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.92, n.6, p.2398-402, mar. 1995.

SICHTIG, N. et al. Evolution of raltegravir resistance during therapy. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.64, n.1, p.25-32, jul. 2009.

STEVENSON, M. Portals of entry: uncovering HIV nuclear transport pathways. **Trends Cell Biol.**, v.6, n.1, p.9-15, jan. 1996.

SWANSTROM, R.; WILLS, J.W. Retroviral gene expression: synthesis, assembly and processing of viral proteins. In: VARMUS, H.E.; COFFIN, J.M.; HUGHES, S.H. (Eds.). **Retroviruses**. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press; 1997. p. 263-334.

TSURUTANI, N. et al. Identification of critical amino acid residues in human immunodeficiency virus type 1 IN required for efficient proviral DNA formation at

steps prior to integration in dividing and nondividing cells. **J. Virol.**, v.74, n.10, p.4795-806, may 2000.

TURLURE, F. et al. A tripartite DNA-binding element, comprised of the nuclear localization signal and two AT-hook motifs, mediates the association of LEDGF/p75 with chromatin in vivo. **Nucleic Acids Res.**, v.34, n.5, p.1653-65, mar. 2006.

VANEGAS, M. et al. Identification of the LEDGF/p75 HIV-1 integrase-interaction domain and NLS reveals NLS-independent chromatin tethering. **J. Cell Sci.**, v.118, n.Pt8, p.1733-43, apr. 2005.

VARMUS, H; BROWN, P. Retroviruses. In: BERG, D.E.; HOWE, M.M. (ed.). **Mobile DNA**. Washington, American Society for Microbiology, 1989. p.53-108.

WANG, W.K. et al. Molecular biology of human immunodeficiency virus type 1. **J. Microbiol. immunol. Infect.**, v.33, n.3, p.131-40, sep. 2000.

WEISS, R.A. Gulliver's travels in HIVland. **Nature**, v.410, n.6831, p.963-7, apr. 2001.

WEISSBRICH, B.; HEINKELEIN, M.; JASSOY, C. Evaluation of drug resistance in HIV infection. **Adv. Virus Res.**, v.58, p.157-202, 2002.

WELLER, I.V.; WILLIAMS, I.G. ABC of AIDS. Antiretroviral drugs. **BMJ**, v.322, n.7299, p.1410-2, jun. 2001.

WENNING, L.A. et al. Lack of a significant drug interaction between Raltegravir and Tenofovir. **Antimicrob. Agents and Chemother.**, v.52, n.9, p.3253-3258, sep. 2008.

WENSING, A.M. et al. Prevalence of drug-resistant HIV-1 variants in untreated individuals in Europe: implications for clinical management. **J. Infect. Dis.**, v.192, n.6, p.958-66, sep. 2005.

WENSING, A.M. et al. Transmission of HIV drug resistance in Europe. In: XVI INTERNATIONAL AIDS CONFERENCE, 2006, Toronto, Canada, Abstract No. TUAB0101.

WENSING, A.M.; VAN MAARSEVEEN, N.M.; NIJHUIS, M. Fifteen years of HIV protease inhibitors: raising the barrier to resistance. **Antiviral Res.**, v.85, n.1, p.59-74, jan. 2010.

WERNER, V. et al. Prevalence of HIV drug resistance in antiretroviral-naïve patients: a prospective study. **AIDS**, v.15, n.5, p.647-650, mar. 2001.

WHITCOMB, J.M. et al. Development and characterization of a novel single-cycle recombinant-virus assay to determine human immunodeficiency virus type 1 coreceptor tropism. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.51, n.2, p.566-75, feb. 2007.

WILD, C.; GREENWELL, T.; MATTHEWS, T. A synthetic peptide from HIV-1 gp41 is a potent inhibitor of virus-mediated cell-cell fusion. **AIDS Res. Hum. Retroviruses**, v.9, n.11, p.1051-3, nov. 1993.

WILD, C.T. et al. Peptides corresponding to a predictive alpha-helical domain of human immunodeficiency virus type 1 gp441 are potent inhibitors of virus infections. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.91, n.21, p.9770-9774, oct. 1994.

WU, X. et al. Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. **Science**, v.300, n.5626, p.1749-51, jun. 2003.

WYATT, R.; SODROSKI, J. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. **Science**, v.280, n.5371, p.1884-8, jun. 1998.

YERLY, S. et al. Transmission of antiretroviral-drug-resistant HIV-1 variants. **Lancet.**, v.354, n.9180, p.729-733, aug. 1999.

YODER, K.E.; BUSHMAN, F.D. Repair of gaps in retroviral DNA integration intermediates. **J. Virol.**, v.74, n.23, p.11191-200, dec. 2000.

ZHENG, R.; JENKINS, T.M.; CRAIGIE, R. Zinc folds the N-terminal domain of HIV-1 integrase, promotes multimerization, and enhances catalytic activity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.93, n.24, p.13659-64, nov. 1996.

ZHU, K.; DOBARD, C.; CHOW, S.A. Requirement for integrase during reverse transcription of human immunodeficiency virus type 1 and the effect of cysteine

mutations of integrase on its interactions with reverse transcriptase. **J. Virol.**, v.78, n.10, p.5045-55, may 2004.

Capítulo II

Artigo em fase final de redação

Genotipagem *in house* da região da
integrase do HIV-1 para avaliação de
resistência: uma alternativa metodológica

RESUMO

Introdução: A falta de um kit otimizado para avaliação da resistência aos inibidores de integrase no Brasil conduziu à necessidade da padronização de uma técnica *in-house* para o estudo de mutações no gene da integrase do HIV-1, possibilitando, assim, a avaliação da resistência a esta classe de antirretrovirais recentemente liberada no país. **Métodos:** RNA viral plasmático foi utilizado como fonte para amplificação por RT- Nested PCR e sequenciamento do gene da integrase do HIV-1 de 60 pacientes para análise do padrão de resistência, o qual foi avaliado utilizando o algoritmo proposto pela Universidade de *Stanford*. **Resultados:** Cinquenta e quatro (90%) amostras obtiveram sucesso na amplificação e sequenciamento, sendo que destas dez foram amplificadas por protocolos alternativos que envolveram a utilização de *enhancer*, de enzimas com maior especificidade, RT-PCR *one-step* e alterações nas condições de ciclagem, o que possibilitou com sucesso o estudo da região de interesse e a análise de resistência. **Conclusão:** A metodologia *in-house* mostrou ser uma alternativa metodológica viável para avaliação da resistência aos inibidores de integrase, principalmente nos casos em que há falha terapêutica a esta nova classe de medicamento, uma vez que a técnica permite o estudo completo da região de interesse.

ABSTRACT

Introduction: The absence of an optimized kit to evaluate the resistance to integrase inhibitors in Brazil led to the necessity for standardization of an in-house technique to study the mutations in the HIV-1 integrase gene, thus enabling the evaluation of resistance to these novel antiretroviral agents recently released in the country.

Methods: Plasma viral RNA was obtained from 60 patients and used as source for RT- Nested PCR amplification and automatic sequencing of the HIV-1 IN gene to analysis of the pattern of drug resistance, which was evaluated using the algorithm proposed by Stanford University.

Results: Fifty-four (90%) samples were successfully amplified and sequenced, and ten of these samples were amplified using alternative protocols involving the use of enhancers, enzymes with more specificity, RT-PCR one step and changes in the conditions of cycling, which allowed the successful study of the region of interest and analysis of resistance.

Conclusion: The in-house methodology showed to be a viable alternative to assess resistance to integrase inhibitors, especially in cases when there is therapeutic failure to this new class of antiretroviral, since the technique allows the complete study of the region of interest.

INTRODUÇÃO

Dados epidemiológicos recentes do *Aids Epidemic Update 2010* estimam que, em 2009, aproximadamente 33,3 milhões de pessoas estavam infectadas pelo vírus HIV (UNAIDS, 2010). A crescente disponibilidade da terapia antirretroviral (TARV) proporcionou uma maior sobrevivência e conduziu à uma elevação no número de pessoas vivendo com HIV de 1,1 milhão em 2001 para 1,4 milhões em 2009 (UNAIDS, 2010).

Desde a aprovação do primeiro antirretroviral, a Zidovudina (AZT) em 1987, vários medicamentos foram desenvolvidos com a finalidade de bloquearem as diferentes etapas da replicação viral, entre os quais os antagonistas de correceptor e os inibidores de fusão, que bloqueiam a entrada do vírus na célula; e os inibidores das enzimas virais que interferem na ação da transcriptase reversa, integrase e protease. A maioria das drogas licenciadas atua na inibição da transcriptase reversa e da protease virais, as quais constituem o suporte da terapia altamente ativa (HAART) (HO; BIENIASZ, 2008; MENÉNDEZ-ARIAS, 2010), principal terapêutica utilizada atualmente no Brasil (BRASIL, 2008).

Em 2007, foi liberado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) o primeiro inibidor que bloqueia a ação da enzima integrase (IN), o Raltegravir (RAL). A IN é responsável pela inserção do genoma viral ao DNA da célula hospedeira através de duas etapas, o processamento 3' e a transferência de fita (BUSHMAN, FUJIWARA, CRAIGIE, 1990; ELGELMAN, MIZUUCHI, CRAIGIE, 1991; GOFF, 1992; POMMIER, JOHNSON, MARCHAND, 2005). Este último passo é o principal alvo dos inibidores de integrase, como o RAL e Elvitegravir, sendo este o inibidor mais avançado nos estudos clínicos após a liberação do RAL (HAZUDA et al., 2000; MARCHAND et al., 2009).

Apesar da alta potência do RAL, sua eficiência vem sendo comprometida pela identificação de mutações no gene da integrase que levam à resistência ao medicamento, como as mutações principais Q148H/K/R, N155H e Y143R/H/C (KOBAYASHI et al., 2008; COOPER et al., 2008; FRANSEN et al., 2009), além de mutações acessórias (MALET et al., 2008; CECCHERINI-SILBERSTEIN et al., 2009; DELELIS et al., 2009; LOW et al., 2009; SICHTIG et al., 2009).

Devido à falha terapêutica, consequência da emergência de variantes resistentes, vem tornando-se claro a necessidade do monitoramento da resistência antirretroviral. No Brasil, a Rede Nacional de Genotipagem (RENAGENO) implantada pelo Ministério da Saúde em 2001 e composta, atualmente, por 23 laboratórios, é responsável pela execução dos exames de genotipagem (BRASIL, 2010). O teste de genotipagem tem como objetivo auxiliar os clínicos na escolha de uma estratégia terapêutica correta e individualizada a partir da análise da sequência nucleotídica da protease e da transcriptase reversa do HIV-1. Essa rotina laboratorial utiliza kits otimizados e padronizados que facilitam a execução do exame.

No Brasil, ainda não há um teste de genotipagem disponível pela Renageno para análise da região da integrase do HIV-1 com o objetivo de verificar a resistência aos inibidores desta enzima e, com a introdução desta nova classe de drogas, é evidente a necessidade crescente desta nova abordagem de genotipagem.

Desta forma, a finalidade deste estudo foi a padronização de um teste de genotipagem *in-house* para o gene da integrase como alternativa metodológica para o estudo de mutações de resistência e/ou polimorfismos nesta região genômica viral, abordagem esta ainda não relatada no Brasil em nível de assistência.

CASUÍSTICA E METODOLOGIA

Casuística e Processamento inicial da amostra. Amostras de 5 mL de sangue venoso a partir de 60 pacientes soropositivos para o HIV-1, atendidos no Hospital Dia “Domingos Alves Meira”, Faculdade de Medicina de Botucatu, Unesp, foram coletadas em tubo do tipo *Vacutainer*® (*Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA*) contendo 1,5mg/mL do anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). O plasma foi obtido mediante centrifugação a 1312xg, por 15 minutos e armazenado em dois microtubos do tipo eppendorf (*Axygen Scientific, Union City, CA, USA*) de 1,5mL, os quais foram estocados a -70°C até o momento da utilização. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina de Botucatu (processo 3407-2009).

Extração de RNA. RNA viral a partir do plasma foi utilizado como fonte para extração do RNA utilizando o *QIAamp Viral RNA Mini Kit* (QIAGEN, Valencia, CA, USA), segundo especificações do fabricante.

Transcrição Reversa. O DNA complementar (cDNA) foi obtido a partir do RNA extraído utilizando o *High-Capacity cDNA Archive kit* (Applied Biosystem, CA, USA), segundo as especificações do fabricante.

Nested-PCR. A amplificação da região genômica da integrase do HIV-1 foi realizada por Nested-PCR utilizando uma mistura de reação contendo 1X tampão Tris-HCl; 2,5mM de MgCl₂; 0,4mM de dNTPs; 0,2μM de cada *primer* (Tabela 1) e 2,5U da enzima *Easy Taq DNA Polimerase* (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil), em um volume final de reação 50μL. Na primeira reação de PCR foram utilizados 10μL do cDNA e na Nested-PCR foram utilizados 5μL do produto amplificado na primeira reação. As condições de ciclagem foram uma desnaturação inicial à 94°C por 5 minutos, 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56°C por 45 segundos, 72°C por um minuto; com uma extensão final de 7 minutos à 72°C.

Tabela 1: Sequência de *Primers* utilizados nas reações de amplificação para a região genômica da integrase do HIV-1

Reação	Nome	Sequência de nucleotídeos 5'→3'	Posição*
PCR	IN12**	GCA GGA TTC GGG ATT AGA AG	4007-4026
PCR	IN13**	CTT TCT CCT GTA TGC AGA CC	5251-5270
<i>Nested-PCR</i>	IN1**	AAG GTC TAT CTG GCA TGG GTA	4137-4157
<i>Nested-PCR</i>	BH4**	TCC CCT AGT GGG ATG TGT ACT TC	5200-5222

*Posição relativa à sequência de referência HXB2 (nº de Acesso *GenBank*:K03455).

**Fonte: Herring et al., 2004.

Visualização. Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 2% com 0,25ng/μl de brometo de etídio, a 100V, 4mA por 40 a 60 minutos em tampão Tris-Borato 45mM/EDTA 1mM. A revelação foi realizada por exposição à luz ultra-

violeta e foram consideradas positivas amostras que exibiam uma banda de aproximadamente, 1000 pares de bases (pb) correspondente a região da integrase do HIV-1, usando como marcador de peso molecular o *DNA Ladder 1Kb* (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil).

Purificação. A purificação do produto amplificado na Nested-PCR foi realizado utilizando o *Invisorb® Fragment Clean Up* (*Invitex, Berlin, Germany*), segundo especificações do fabricante.

Reação de Marcação Fluorescente. A reação de marcação fluorescente foi realizada utilizando o kit *ABI Prism® Big Dye™ terminator Cycle Sequencing v.3.1.* (*Applied Biosystems, CA, USA*), utilizando um volume de 20µL de reação com 0,5µM de um dos *primers* (Tabela 2), 4µL de *Big Dye* e, de 30ng de produto purificado. As condições de ciclagem foram 95°C por 5 minutos; 40 ciclos de 95°C por 10 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por 4 minutos.

Tabela 2: Sequência de *primers* utilizados no sequenciamento da região genômica da integrase do HIV-1.

Nome	Sequência de nucleotídeos 5'→3'	Posição*
IN1**	AAG GTC TAT CTG GCA TGG GTA	4137-4157
IN4542S***	GCA GGA AGA TGG CCA GT	4542-4558
IN4764AS***	CCA TTT GTA CTG CTG TCT TAA	4743-4764
BH4**	TCC CCT AGT GGG ATG TGT ACT TC	5200-5222

*Posição relativa à sequência de referência HXB2 (nº de Acesso *GenBank*:K03455).

Fonte: Herring et al., 2004. *Fonte: Malet et al., 2008.

Precipitação. Finalizada a reação de marcação fluorescente, procedeu-se a etapa de precipitação com a finalidade de retirar os reagentes não incorporados. À reação foram adicionados 80µL de isopropanol 75% (*Merck S.A.*), deixando a placa em

repouso por 15 minutos envolvida em papel alumínio à temperatura ambiente. Procedeu-se a centrifugação desta mistura a 1700g por 50 minutos à 25°C. Concluída esta fase, o isopropanol foi removido e foram adicionados 200µL de etanol 70% à placa, procedendo-se, então a centrifugação nas mesmas condições anteriores por 20 minutos. Finalizada esta etapa todo o etanol foi removido e, uma incubação final da placa à 94°C por 2 minutos em termociclador foi realizada com o objetivo de eliminar o etanol residual.

Desnaturação. Depois da precipitação procedeu-se a desnaturação do DNA utilizando 2µL de uma mistura contendo 5 partes de formamida deionizada *Hi-Fi* (*Applied Biosystems, CA, USA*) para 1 do tampão de carregamento *blue dextran* (*Applied Biosystems, CA, USA*) e aquecimento à 94°C por 3 minutos.

Sequenciamento. A eletroforese foi conduzida no equipamento *ABI Prism 377* (*Applied Biosystems, CA, USA*) utilizando gel de poliacrilamida desnaturante *Acrigel 29:1* (*LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil*) em uma concentração de 4,75% preparado segundo especificações do fabricante. A duração da eletroforese foi de 7 horas sendo que os parâmetros de corrida e análise dos dados resultantes obedeceram às orientações do fabricante.

Análise do Sequenciamento. A qualidade das sequências obtidas foi analisada com o programa *Phred* (EWING et al., 1998a), adotando-se um escore de 20 para a validação do sequenciamento. O *contig* das quatro regiões sequenciadas foi obtido utilizando o programa *BioEdit* (EWING; GREEN, 1998b) e, a análise de resistência foi realizada segundo o Algoritmo de interpretação de resistência genotípica disponível no site da Universidade de Stanford (*HIVdb: Genotypic Resistance Interpretation Algorithm version 6.0.7*) (STANFORD UNIVERSITY, 2010).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O gene que codifica a enzima integrase está na região genômica *pol* do HIV-1, a qual apresenta uma variabilidade de aproximadamente 13% entre os subtipos virais (ROBERTSON et al., 1999) sendo, portanto, relativamente conservada quando se consideram sequências de nucleotídeos de vírus de RNA. Neste estudo, a amplificação do gene completo da integrase (codificador dos 288 aminoácidos) ocorreu com sucesso em 47 (78,3%) amostras utilizando o protocolo inicialmente proposto.

Fatores limitantes no processo de amplificação foram a qualidade da extração e a concentração do RNA obtida, a qual se encontra na dependência da carga viral plasmática da amostra.

Quanto à qualidade de extração, o kit utilizado é considerado padrão ouro para recuperação de RNA de material isento de células, pela utilização de um carreador de RNA, o qual permite a recuperação de RNA com alta qualidade, minimizando artefatos gerados por etapas necessárias para purificação e concentração do RNA quando o mesmo é obtido por outras metodologias (QIAGEN, 1999).

O sucesso da amplificação foi maior quando amostras com carga viral acima de 1.500 cópias de RNA/mL foram utilizadas. Das 47 amostras inicialmente amplificadas, 45 apresentavam carga viral superior a 1.500 cópias de RNA/mL. Estudos anteriores já demonstraram que quantificações de RNA viral plasmáticas muito baixas, sobretudo inferiores a 1000 cópias de RNA/mL, dificultam a amplificação por PCR impossibilitando o sequenciamento e a conclusão do exame (LEARN et al., 1996; GUNTARD et al., 1998; SCHUURMAN et al., 1999; SHAFER et al., 2001). Do mesmo modo, critérios muito semelhantes são utilizados pela Rede Nacional de Genotipagem (RENAGENO) na seleção dos pacientes indicados ao exame, que preconiza um valor mínimo de carga viral em 2000 cópias de RNA/mL (BRASIL, 2008). Este critério, além de outros, visa não somente priorizar o exame para aqueles que apresentam falha terapêutica, mas também garantir a eficiência do teste perante limitações técnicas.

Uma alternativa em casos de falha na amplificação devido à carga viral muito baixa ou indetectável seria a utilização do DNA próviral. A utilização do DNA próviral como fonte de amplificação alternativa para análise da resistência já foi utilizada anteriormente (CHEW et al., 2005; BON et al., 2006; GUIMARÃES et al., 2008). No entanto, esta abordagem metodológica deve ser avaliada com cautela uma vez que o provírus não reflete a variante viral em atividade replicativa no paciente infectado (KOCH et al., 1999; VENTURI et al., 2002; BI et al., 2003).

Para as amostras que no presente trabalho mostraram insucesso na amplificação pelo protocolo proposto, alterações metodológicas envolvendo a utilização de *enhancer*, enzimas com maior especificidade, RT-PCR *one-step* e alterações nas condições de ciclagem foram realizadas com sucesso. Das 13 amostras que falharam pelo protocolo inicial, dez puderam ser amplificadas mediante as alterações propostas. Sabe-se que a otimização da reação de amplificação envolve diversas variáveis, como a temperatura de anelamento (T_a) do *primer*. A escolha correta da temperatura determina a especificidade da reação, ou seja, a presença de bandas inespecíficas pode indicar uma T_a inferior a adequada (RYCHLIK, SPENCER, RHOADS, 1990; ROUX, 1995; GRUNENWALD, 2003). Além disso, para superar os problemas de amplificação a utilização de substâncias que aumentam a especificidade e/ou rendimento da PCR pode ser necessária, como os *enhancers* dietiltreitol (DTT), glicerol, formamida, entre outros (ROUX, 1995; NAGAI; YOSHIDA; SATO, 1998; GRUNENWALD, 2003). Já as características da enzima DNA polimerase, como taxa de extensão, processabilidade, fidelidade, termoestabilidade e perfil da atividade termal são importantes para a PCR (CLINE; BRAMAN; HOGREFE, 1996; GRUNENWALD, 2003; PAVLOV et al., 2004).

Apesar da grande parte dos problemas técnicos terem ocorrido na fase de amplificação, a fase de sequenciamento também evidenciou algumas limitações. Das 57 amostras amplificadas, 54 puderam ser sequenciadas com sucesso pelo protocolo proposto. Sequências de qualidade inadequada dificultam a montagem de uma sequência consenso e a análise das mutações de resistência. Em muitos casos é recomendada nova coleta, o que pode levar ao sucesso da amplificação e do sequenciamento. Este procedimento é indicado pela RENAGENO para amostras que obtiveram falha na amplificação/sequenciamento possibilitando, assim, a

avaliação do perfil de resistência a partir da nova coleta (MORTENSEN; AZEVEDO; MUNERATO, 2002).

Um ensaio de sequenciamento utilizando o sistema automatizado *Trugene* foi desenvolvido por Paar e colaboradores (2008), com o objetivo de realizar a detecção de mutações de resistência aos inibidores de integrase empregando uma plataforma de análise *OpenGene[®] DNA Sequencing System*, a mesma utilizada para análise da resistência aos inibidores de transcriptase reversa e protease. O ensaio mostrou-se robusto e acurado, além de ter obtido sucesso na amplificação de amostras com carga viral superior a 500 cópias de RNA/ml. No entanto, este ensaio não contemplou toda a região da integrase, excluindo os domínios C-terminal e N-terminal. Devido à finalidade de identificação de mutações e/ou polimorfismos que possam estar associados com a resistência aos inibidores de IN, um estudo mais completo de toda extensão do gene da integrase se faz necessário e indispensável. No entanto, tal ensaio ainda não está registrado no Brasil para uso diagnóstico.

Desta forma, a metodologia *in-house* mostra-se uma alternativa metodológica viável para detectar a presença de variantes resistentes aos inibidores de integrase na falta de um kit comercial para esta finalidade e, que permite um estudo completo da região de interesse.

REFERÊNCIAS

Bl, X. et al. Emergence of protease inhibitor resistance—associated mutations in plasma hiv-1 precedes that in proviruses of peripheral blood mononuclear cells by more than a year. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr.**, v.34, n.1, p.1-6, sep. 2003.

BON, I. et al. Genotypic resistance in plasma and peripheral blood lymphocytes in a group of naive HIV-1 patients. **J. Clin. Virol.**, v.38, n.4, p.313-20, apr. 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Rede Nacional de Laboratórios de Genotipagem. Brasília.** Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pagina/rede-nacional-de-laboratorios-de-genotipagem>>. Acesso em: 12 nov. 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Tratamento de HIV e Aids. **Recomendações para terapia antirretroviral em adultos infectados pelo HIV – 2008.** Brasília. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pagina/recomendacoes-de-tratamento>>. Acesso em: 12 nov. 2010.

BUSHMAN, F.D.; FUJIWARA, T.; CRAIGIE, R. Retroviral DNA integration directed by HIV integration protein in vitro. **Science.**, v.249, n.4976, p.1555-8, sep. 1990.

CECHERINI-SILBERSTEIN, F. et al. Characterization and structural analysis of HIV-1 Integrase conservation. **AIDS Rev.**, v.11, n.1, p.17-29, jan-mar 2009.

CHEW, C.B. et al. Assessment of drug resistance mutations in plasma and peripheral blood mononuclear cells at different plasma viral loads in patients receiving HAART. **J. Clin. Virol.**, v.33, n.3, p.206-16, jul. 2005.

CLINE, J.; BRAMAN, J.C.; HOGREFE, H.H. PCR fidelity of Pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. **Nucleic Acids Res.**, v.24, n.18, p.3546-51, sep. 1996.

COOPER, D.A. et al. Subgroup and resistance analyses of raltegravir for resistant HIV-1 infection. **N. Engl. J. Med.**, v.359, n.4, p.355-65, jul.2008.

DELELIS, O. et al. The G140S mutation in HIV integrases from raltegravir-resistant patients rescues catalytic defect due to the resistance Q148H mutation. **Nucleic Acids Res.**, v.37, n.4, p.1193-201, mar. 2009.

DELWART, E.L. et al. Genetic subtyping of human immunodeficiency virus using a heteroduplex mobility assay. **PCR Methods Appl.**, v.4, n.5, p.S202-16, apr. 1995.

ELGELMAN, A.; MIZUUCHI, K.; CRAIGIE, R. HIV-1 DNA integration: mechanism of viral DNA cleavage and DNA strand transfer. **Cell.**, v.67, n.6, p.1211-21, dec. 1991.

EWING, B. et al. Base-calling of automated sequencer traces using *Phred*. I. Accuracy assessment. **Genome Res.** v.8, n.3, p.175-185, 1998a.

EWING, B; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using *Phred*. II. Error probabilities. **Genome Res.** v.8, n.3, p.186-194, 1998b.

FRANSEN, S. et al. Loss of raltegravir susceptibility by human immunodeficiency virus type 1 is conferred via multiple nonoverlapping genetic pathways. **J., virol.**, v.83, n.22, p.11440-6, nov. 2009.

GOFF, S.P. Genetics of retroviral integration. **Annu. Rev. Genet.**, v.26, p.527-44, dec. 1992.

GRUNENWALD. H. Optimization of polymerase chain reactions. In: BARTLETT, J.M.S.; STIRLING, D. **PCR protocols**. Totowa, New Jersey:Humana Press, 2003. p.89-99.

GUIMARÃES, A.P. et al. Profiling resistance-related mutations in the protease region of the pol gene: single genome sequencing of hiv in plasma and peripheral blood mononuclear cells. **AIDS Res. Hum. Retroviruses.**, v.24, n.7, p.969-71, jul 2008.

GÜNTHARD, H.F. et al. Human immunodeficiency virus replication and genotypic resistance in blood and lymph nodes after a year of potent antiretroviral therapy. **J. Virol.**, v.72, n.3, p.2422-8, mar. 1998.

HAZUDA, D.J. et al. Inhibitors of strand transfer that prevent integration and inhibit HIV-1 replication in cells. **Science.**, v.287, n.5453, p.646-50, jan. 2000.

HERRING, B.L.; CUNNINGHAM, A.L.; DWYER, D.E. Potential drug resistance polymorphisms in the integrase gene of HIV type 1 subtype A. **AIDS Res. Hum. Retrovir.** v.20, n.9, p.1010-4, sep. 2004.

HO, D.D.; BIENIASZ, P.D. HIV-1 at 25. **Cell**, v.133, n.4, p.561-5, may 2008.

KOBAYASHI, M. et al. Selection of diverse and clinically relevant integrase inhibitor-resistant human immunodeficiency virus type 1 mutants. **Antiviral Res.**, v.80, n.2, p.213-22, nov. 2008.

KOCH, N. et al. Comparison of human immunodeficiency virus type 1 (hiv-1) protease mutations in hiv-1 genomes detected in plasma and in peripheral blood mononuclear cells from patients receiving combination drug therapy. **J. Clin. Microbiol.**, v.37, n.5, p.1595-7, may 1999.

LEARN, G.H.Jr. et al. Maintaining the integrity of human immunodeficiency virus sequence databases. **J. Virol.**, v.70, n.8, p.5720-30, aug. 1996.

LOW, A. et al. Natural polymorphisms of human immunodeficiency virus type 1 integrase and inherent susceptibilities to a panel of integrase inhibitors. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.53, n.10, p.4275-82, oct. 2009.

MALET, I. et al. Mutations associated with failure of raltegravir treatment affect integrase sensitivity to the inhibitor in vitro. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.52, n.4, p.1351-8, apr. 2008.

MARCHAND, C. et al. HIV-1 IN Inhibitors: 2010 Update and Perspectives. **Curr. Top. Med. Chem.**, v.9, n.11, p.1016-37.

MENÉNDEZ-ARIAS, L. Molecular basis of human immunodeficiency virus drug resistance: **An update. Antiviral Res.**, v.85, n.1, p.210-31, jul. 2009.

MORTENSEN, C.; AZEVEDO, M.L.; MUNERATO, P. Coleta. In: _____. **Manual de Genotipagem de HIV.** São Paulo: [s.n.], 2002. p.2-3.

NAGAI, M.; YOSHIDA, A.; SATO, N. Additive effects of bovine serum albumin, dithiothreitol, and glycerol on PCR. **Biochem. Mol. Biol. Int.**, v.44, n.1, p.157-63, jan. 1998.

PAVLOV, A.R. et al. Recent developments in the optimization of thermostable DNA polymerases for efficient applications. **Trends Biotechnol.**, v.22, n.5, p.253-60, may 2004.

POMMIER, Y.; JOHNSON, A.A.; MARCHAND, C. Integrase inhibitors to treat HIV/AIDS. **Nat. Rev. Drug. Discov.**, v.4, n.3, p.236-48, mar. 2005.

QIAGEN. **QIAamp® Viral RNA Mini Kit Handbook 1999**. Disponível em <http://www.ebiotrade.com/buyf/productsf/qiagen/1010446_qavrna_mini.pdf>. Acesso em 01 dez. 2010.

ROBERTSON, D.L. HIV-1 nomenclature proposal. In: KUIKEN, C.L. et al. **Human Retroviruses and AIDS 1999: A Compilation and Analysis of Nucleic Acid and Amino Acid Sequences**. Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM, 1999, p.492-505.

ROUX, K.H. **Optimization and Troubleshooting in PCR**. Cold Spring Harb Protoc., n.4, p.S185-S194, apr. 2009.

RYCHLIK, W.; SPENCER, W.J.; RHOADS, R.E. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. **Nucleic Acids Res.**, v.18, n.21, p.6409-12, nov. 1990.

SCHUURMAN, R. et al. Worldwide evaluation of DNA sequencing approaches for identification of drug resistance mutations in the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. **J. Clin. Microbiol.**, v.37, n.7, p.2291-6, jul. 1999.

SHAFER, R.W. et al. High degree of interlaboratory reproducibility of human immunodeficiency virus type 1 protease and reverse transcriptase sequencing of plasma samples from heavily treated patients. **J. Clin. Microbiol.**, v.39, n.4, p.1522-9, apr.2001.

SICHTIG, N. et al. Evolution of raltegravir resistance during therapy. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.64, n.1, p.25-32, jul. 2009.

UNAIDS. **Global Report: UNAIDS Report on the Global AIDS Epidemic 2010.** Disponível em: < <http://unaidstoday.org/>>. Acesso em 02 dez. 2010.

VENTURI, G. et al. Divergent distribution of HIV-1 drug-resistant variants on and off antiretroviral therapy. **Antivir. Ther.**, v.7, n.4, p.245-50, dec. 2002.

Capítulo III

Artigo em fase final de redação

Avaliação da resistência primária aos
inibidores de integrase na infecção pelo
HIV-1 em pacientes da região de
Botucatu, SP, Brasil

RESUMO

Os inibidores de integrase (INIs) representam uma nova classe de antirretrovirais (ARVs) promissora contra variantes resistentes ao esquema terapêutico comumente utilizado. No entanto, já foram descritas mutações associadas com a utilização destes ARVs e a avaliação da resistência em pacientes virgens se faz necessária devido à introdução desta classe na terapêutica atual. O RNA viral foi obtido a partir do plasma de 54 pacientes virgens de tratamento com INI (26 sem tratamento com ARV e 28 em tratamento) e analisado por meio da amplificação do RNA viral por RT-Nested-PCR e sequenciamento do gene da integrase. Mutações principais aos INIs não foram detectadas, no entanto mutações acessórias relacionados ao Raltegravir e/ou Elvitegravir como V151I (14,8%), G163R/K (3,7%) e L68I (1,9%) foram relatadas. As mutações I72I/V (57,4%) e V201I (50%) foram as mais frequentes nas amostras estudadas. Já a mutação M154L, ausente no grupo de pacientes que não fazia uso de ARV e associada com mutações presentes na transcriptase reversa (TR), foi detectada em 7,1% dos pacientes sob tratamento com inibidores de TR e/ou protease. A análise das amostras confirma a ausência de mutações principais que levam à resistência aos INI e a presença isolada de mutações e/ou polimorfismos relacionados à resistência parece não ter efeito significativo na resistência aos ARVs desta classe. No entanto há ainda a necessidade de mais estudos para avaliar a contribuição dessas mutações na resistência aos INIs, principalmente sob pressão seletiva da droga.

ABSTRACT

The integrase inhibitors (INIs) represent a promising new class of antiretroviral (ARV) drugs against variants resistant to commonly used therapeutic regimen. However, mutations associated with the use of these ARVs have been described and the evaluation of resistance in naïve patients is necessary due the introduction of this class in the current therapeutic. Plasma viral RNA obtained from 54 integrase inhibitor-naïve patients (26 without treatment and 28 treated with ARVs) was used as source for RT-Nested-PCR amplification and sequencing of the integrase gene. Primary mutations to INIs weren't detected, however accessory mutations related to Raltegravir and/or Elvitegravir, as V151I (14.8%), G163R/K (3.7%) and L68I (1.9%) have been reported. I72I/V (57.4%) and V201I (50%) mutations were the most frequent in the samples studied. The M154L mutation, absent in the group of patients who did not use ARV therapy and associated with mutations present in reverse transcriptase (RT), was detected in 7.1% of patients under treatment with RT and/or protease inhibitors. The analysis of samples confirms the absence of primary mutations leading to resistance to INI and the isolated presence of mutations and/or polymorphisms related to resistance seems to have no significant effect on drug resistance of this class. However, there's still need for further studies to assess the contribution of these mutations in resistance to INIs, especially under drug selective pressure.

INTRODUÇÃO

A enzima integrase (IN) do HIV-1 é codificada pelo final 3' do gene *pol*, gerando uma proteína de 288 aminoácidos que compreende três domínios funcionais (GOLDGUR et al., 1998). O domínio N-terminal (1-49) contém o motivo conservado HHCC, constituído por duas histidinas e duas cisteínas, no qual o zinco se liga, promovendo a multimerização a tetrâmeros (LEE et al., 1997, DEPREZ et al., 2000; LEH et al., 2000). O domínio catalítico principal (aminoácidos 50-212) contém o motivo catalítico D,D(35)E (aspartato - aspartato - glutamato) em um arranjo espacial altamente conservado (KATZMAN, SUDOL, 1998) formando o sítio ativo enzimático envolvido no reconhecimento do substrato de DNA. Além disso, possui outros resíduos envolvidos na ligação de cofatores celulares para a integração do HIV, como o LEDGF/p75 (ENGELMAN, CHEREPANOV, 2008). O domínio C terminal (213-288) possui atividade de ligação ao DNA (LUTZKE, VINK, PLASTERK, 1994; CANNON et al., 1996), oligomerização da proteína e interações com a transcriptase reversa (LUTZKE, PLASTERK, 1998; WU et al., 1999).

A IN é responsável por duas reações no ciclo viral, as quais incluem o processamento 3' e a transferência de fita. O primeiro ocorre no citoplasma, onde a enzima realiza uma clivagem endonucleolítica imediatamente 3' após um motivo conservado de dinucleotídeo CA nos finais de cada terminal de repetição longa, do inglês *long terminal repeat* (LTR). A reação de transferência de fita ocorre no núcleo e esta consiste na ligação dos finais 3'-OH, gerados pelo processamento 3', ao fosfato 5' do DNA do cromossomo hospedeiro pela reação de transesterificação (ENGELMAN, MIZUUCHI, CRAIGIE, 1991; VINK et al., 1991).

A seleção do sítio de integração do HIV demonstra mínima seletividade em relação à sequência cromossomal na qual ocorre a integração (CARTEAU, HOFFMANN, BUSHMAN, 1998; SCHRÖDER et al., 2002). No entanto, o HIV integra preferencialmente em regiões enriquecidas por unidades transcricionais ativas (SCHRÖDER et al., 2002; WU et al., 2003; MITCHELL et al., 2004).

A emergência de variantes resistentes durante o tratamento antirretroviral na infecção pelo HIV-1 tem sérias implicações clínicas e a inclusão de novas drogas que têm como alvo outras etapas do ciclo replicativo viral, além das de transcrição

reversa e maturação, vêm se tornando essencial para a efetividade da terapêutica (MENÉNDEZ-ARIAS, 2010).

A atividade essencial da IN no ciclo replicativo do vírus e sua ausência na célula hospedeira fizeram com que esta enzima despertasse especial interesse como alvo terapêutico. Desta forma, desde a aprovação do Raltegravir (RAL) em 2007, primeiro inibidor da enzima integrase liberado para utilização clínica, a terapêutica antirretroviral tem disponível uma nova classe de medicamento (POMMIER, JOHNSON, MARCHAND, 2005; MARCHAND et al., 2009) que atua na inserção covalente do DNA viral ao cromossomo de células infectadas.

Os agentes antirretrovirais (ARVs) dessa nova classe são potencialmente valiosos devido ao seu mecanismo de ação e sua atividade contra vírus resistentes às outras classes de ARVs, como os inibidores de transcriptase reversa análogos de nucleosídeos, os inibidores de transcriptase reversa não-análogos de nucleosídeos, inibidores de protease e de entrada. No entanto, já foram descritas mutações que levam à resistência ao Raltegravir e ao Elvitegravir (EVG), sendo este último o inibidor de IN mais avançado nos estudos clínicos (fase III). As mutações primárias que levam à falha terapêutica ao RAL envolvem três vias independentes: mutação N155H, mutações Q148H/R/K ou mutações Y143/R/C/H (COOPER et al., 2008; FRANSEN et al., 2009). A resistência ao EVG está associada com mutações primárias específicas, como a T66I e S147G, além das mutações de resistência comuns ao RAL (E92Q, Q148H/R/K e N155H) (SHIMURA et al., 2008; LOW et al., 2009; CECCHERINI-SILBERSTEIN et al., 2009).

Cada mutação primária tende a estar associada com mutações secundárias que parecem restabelecer o *fitness* viral nesses mutantes primários. Por exemplo, mutações secundárias na posição E92 estão relacionadas com a N155H ou Y143; mutação secundária na posição T97 com Y143; e a G140 com Q148 (QUERCIA et al., 2009).

Uma das principais preocupações da terapia antirretroviral é a seleção de vírus resistentes. No Brasil, a frequência de resistência primária é considerada baixa, variando de 1,4% a 8,3% (DE MEDEIROS et al., 2006; BRÍGIDO et al., 2007; INOCÊNCIO et al., 2009), no entanto a prevalência global da transmissão de

variantes resistentes está aumentando ao longo do tempo (LITTLE et al., 2002; WENSING et al., 2005).

Assim, o objetivo deste estudo foi analisar a frequência de mutações e polimorfismos na região da IN em amostras de pacientes virgens de tratamento com inibidores de IN.

CASUÍSTICA

Foram incluídos neste estudo 54 pacientes atendidos no Hospital Dia “Domingos Alves Meira”, Faculdade de Medicina de Botucatu, Unesp, com sorologia positiva para o HIV. Os pacientes foram divididos em dois grupos de acordo com a utilização ou não de esquema antirretroviral: Grupo 1 (n=26): pacientes virgens de terapia ou que não faziam o uso de esquema antirretroviral por um período de tempo superior a 6 meses e, Grupo 2 (n= 28): pacientes em tratamento com inibidores de protease e/ou transcriptase reversa (TR), mas virgens de tratamento com inibidor de integrase. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina de Botucatu (3407-2009). As características demográficas e imunoviológicas dos pacientes incluídos neste estudo são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1: Características demográficas e imunoviológicas dos pacientes HIV-1 positivos incluídos no estudo.

Características	Grupo 1 (n = 26)	Grupo 2 (n = 28)	Valor de p
Sexo Masculino [n (%)]	13 (50)	14 (50)	ns
Idade (anos)*	38,5 (32-41)	42,5 (36-49)	0,0327
CV (cópias/ml)*	45.328,5 (12.124-56.554)	16.908,0 (7.536,75-47.789,75)	ns
CD4 (cél/m ³)*	302,50 (167,25-544,5)	195 (63,75-355,5)	ns

* Valores expressos em mediana (IQ_{25%} - IQ_{75%})

CV – Carga Viral

ns – não significativo

Valor estatisticamente significativo para p < 0,05

METODOLOGIA

O RNA viral foi isolado do plasma utilizando o *QIAmp Viral RNA Mini Kit* (QIAGEN, Valencia, CA, USA), segundo especificações do fabricante. O DNA complementar (cDNA) foi obtido a partir do RNA extraído utilizando o *High-Capacity cDNA Archive kit* (Applied Biosystem, CA, USA), segundo as especificações do fabricante.

O gene da integrase do HIV-1 foi amplificado por *Nested-PCR* e sequenciado, utilizando o protocolo proposto por Tanikawa e colaboradores (2011) (em fase de elaboração¹). A análise de resistência também seguiu o protocolo proposto no mesmo trabalho. As mutações foram consideradas segundo critérios do *Stanford HIV Drug Resistance Database* e outros trabalhos (CECCHERINI-SILBERSTEIN et al., 2009; PASSAES et al., 2009; SICHTIG et al., 2009).

Para subtipagem das variantes virais presentes nas amostras analisadas foi amplificada a região C2-V3 da gp120 do envelope viral utilizando o mesmo protocolo de reação utilizado na amplificação do gene da integrase, com os *primers* ED5 e ED12 na primeira PCR e ED31 e ED33 na *Nested-PCR* (DELWART et al., 1995). Os produtos amplificados foram sequenciados utilizando o kit *ABI Prism® Big Dye™ terminator Cycle Sequencing v.3.1*. (Applied Biosystems, CA, USA), segundo especificações do fabricante utilizando os *primers* (ED31 e ED33) para o sequenciamento da região C2-V3. A eletroforese foi conduzida no equipamento *ABI Prism 377* (Applied Biosystems, CA, USA) utilizando gel de poliacrilamida desnaturante *Acrigel 29:1* (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil) em uma concentração de 4,75% preparado segundo especificações do fabricante.

A qualidade das sequências obtidas foi analisada com o programa *Phred* (EWING et al., 1998a), adotando-se um *score* 20 para a validação do sequenciamento. O *contig* das quatro regiões sequenciadas foi obtido com o

¹ TANIKAWA, A.A. et al. Genotipagem *in house* da região da integrase do HIV-1 para avaliação de resistência: uma alternativa metodológica. São Paulo: Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, 2011.

programa BioEdit (EWING; GREEN, 1998b). A análise de subtipos foi realizada utilizando o *REGA HIV-1 Subtyping Tool*, versão 2.0 (BIOAFRICA, 2010).

A análise estatística foi realizada utilizando o Programa SAS for Windows versão 9.2. Para o estudo das variáveis carga viral, CD4+ e idade foi ajustado o modelo linear generalizado com erro aleatório assumindo distribuição gama e função de ligação log. Já para o estudo das mutações foi ajustado o modelo linear generalizado com erro aleatório binomial negativo. Para a avaliação dos domínios da enzima, foi ajustado o modelo linear generalizado assumindo erro binomial e função de ligação logística, sendo que o valor de p foi obtido pelo teste de razão de verossimilhança. O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise da amostra estudada demonstrou que no grupo 1 (pacientes virgens de terapia ou que não faziam o uso de esquema antirretroviral por um período de tempo superior a 6 meses) a mediana da carga viral (CV), contagem de células T CD4 e idade foi de 45.328,5 cópias de RNA/mL, 302,50 células/mm³ e 38,5 anos, respectivamente. Já no grupo 2 (pacientes em tratamento com inibidores de protease e/ou transcriptase reversa, mas virgens de tratamento com inibidor de integrase) os valores observados foram 16.908,0 cópias de RNA/mL, 195 células/mm³ e 42,5 anos. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação às variáveis CV, CD4 e sexo, no entanto para a variável idade o grupo 1 apresentou valor inferior àquele apresentado pelo grupo 2, diferença esta que foi significativa ($p = 0,0327$). Estudos indicam que a infecção pelo HIV tende a ser diagnosticada em uma fase mais tardia em pacientes com idade mais avançada do que em pacientes jovens (SKIEST et al., 1996; CASTILLA et al., 2002), além disso uma resposta mais oportuna e efetiva é esperada em crianças e adultos jovens, comparado com indivíduos de maior idade (MANFREDI, 2004). Estes possuem uma resposta imunológica menos efetiva à terapia antirretroviral (GRABAR; WEISS; COSTAGLIOLA, 2006).

Foram subtipadas 47 amostras pela região *env* do HIV-1, sendo que destas 40 (85,1%) correspondiam ao subtipo B, 4 (8,5%) ao subtipo F1 e 3 (6,4%) ao subtipo C. Das 54 amostras subtipadas pela região da integrase, 47 (87%) eram do subtipo B, 4 (7,4%) F1 e 3 (5,6%) do subtipo C. O subtipo B foi estatisticamente mais significativo em relação aos demais subtipos ($p < 0,0001$). No Brasil, os subtipos B, F e C são os prevalentes, além dos recombinantes emergentes destes subtipos (SOARES et al., 2005; SA FILHO et al., 2005; SANABANI et al., 2006). Quatro amostras mostraram-se discordantes quando comparados resultados dos subtipos analisados pelas duas regiões, ou seja, duas amostras que pela região *env* indicaram subtipo B, na região da integrase determinavam subtipo F1; e duas outras amostras que pela região *env* correspondiam ao subtipo B, na região da integrase indicavam subtipo F1, sugerindo a presença de recombinantes. As formas CRF_28 e CRF_29, as quais são ambas recombinantes BF foram as primeiras descritas no Brasil e apresentam um crescimento exponencial no país (SA FILHO et al., 2006; SANABANI et al., 2006). Além desses recombinantes, já foram descritos outros três: CRF_BF39, CRF_BF40 (GUIMARÃES et al., 2008) e, mais recentemente, CRF46_BF1 (SANABANI et al., 2010). Também foi relatada a presença de recombinante BC no Brasil (SANTOS et al., 2006).

Entre os 102 resíduos variáveis encontrados na IN, onze apresentaram frequência maior que 25% nos 54 indivíduos estudados (I72, T124, V201, L101, S17, T125, S119, L28, D256, E11 e S283). Não foi identificado nenhum polimorfismo nos sítios conservados H12, H16, C40 e C43 de ligação ao Zn^{2+} e na tríade catalítica D64, D116, E152, ambos sítios importantes para o funcionamento da integrase. Também não foi encontrada nenhuma alteração nos códons que interagem com o LEDGF, como A128, A129, W131, W132, Q168, E170, T174 e M178. O domínio que apresentou menor variabilidade foi o C-terminal (68,4% conservado), seguido dos domínios catalítico principal e N-terminal, 65% e 57,1% respectivamente. Estudo realizado em São Paulo apresentou grau de conservação dos domínios menor que os encontrados neste trabalho, mas de maneira análoga, o domínio mais conservado foi o C-terminal (ARRUDA et al., 2010). Diferentemente, em outros trabalhos os domínios N-terminal e C-terminal foram os que apresentaram maior grau de variabilidade (RHEE et al., 2008; LOW et al., 2009).

No grupo dos pacientes que não faziam uso de ARV, foram encontrados 83 resíduos variáveis, sendo que 11 apresentaram frequência maior que 25% (I72, T124, V201, T125, S17, S119, L28, L101, S283, T112 e E11). A mutação I72V foi a mais frequente, com 15 (57,7%) amostras. Mutações primárias não foram detectadas, no entanto mutações associadas à resistência aos inibidores de IN, como V201I (42,3%), V151I (19,2%), T124A (19,2%), L74I (15,4%), K156N (15,4%), T206S (11,5%), M154I (7,7%), I203M (7,7%), T112I (7,7%), S119G (7,7%), V54I (3,8%), L68I (3,8%), S119R (3,8%), G163R (3,8%) e V165I (3,8%) estavam presentes no grupo analisado.

Similarmente, no grupo dos pacientes em tratamento 83 códons apresentaram mutação, tendo onze resíduos com frequência maior que 25% (V201, I72, T124, L101, S17, D256, T125, L234, L28, V31 e E11). As mutações mais frequentes nesse grupo foram a V201I e I72I/V, com 16 (57,1%) amostras cada. Mutações associadas com resistência *in vitro* e/ou *in vivo* aos inibidores de integrase foram relatadas, como K156N (14,3%), V151I (10,7%), T206S (10,7%), V165I (7,1%), S119G (7,1%), S230N (7,1%), M154L (7,1%), V54I (3,6%), S119R (3,6%), G163K (3,6%), R20K (3,6%) e T112I (3,6%).

Nas amostras estudadas não foram encontradas mutações primárias, porém mutações acessórias e polimorfismos associados com resistência aos inibidores de integrase foram detectados. Resultados similares foram relatados por trabalhos realizados recentemente no Rio de Janeiro e São Paulo (PASSAES et al., 2009; ARRUDA et al., 2010).

A mutação associada ao RAL, V151I foi encontrada em 14,8% das amostras estudadas, além das mutações L74I (7,4%), V54I (3,7%), I203M (3,7%), G163R/K (3,7%) e S230N (3,7%). Demais mutações e/ou polimorfismos associados com outros inibidores de integrase também foram detectados, como I72V (57,4%), V201I (50%), V165I (5,6%) e M154I (3,7%). As mutações R20K e L68I relacionadas à resistência ao EVG (GOETHALS et al., 2008, GOODMAN et al., 2008) estavam presentes em uma (1,9%) amostra cada, enquanto que a mutação S119G/R foi detectada em seis (11,1%) amostras. Já a mutação selecionada *in vitro* pelo RAL, EVG e S/GSK1349572, T124A foi encontrada em 13 (24,1%) amostras.

A adição da mutação V54I a um vírus recombinante Q148R/G140A/E138K foi recentemente relatada por Goethals et al. (2010). No seu trabalho, a adição desta mutação não conferiu maior resistência ao RAL ou a outros inibidores de IN, mas melhorou levemente a capacidade de replicação do vírus mutante, sugerindo que seja uma mutação compensatória resultante da seleção de resistência *in vitro* com RAL.

As mutações G163R/K são mutações acessórias que normalmente ocorrem em combinação com a mutação primária N155H em pacientes em tratamento com RAL, possivelmente contribuindo com o *fitness* viral. Sabe-se que as combinações duplas ou triplas de mutações secundárias, como V72I / T97A / G163R, podem levar à resistência moderada ao Raltegravir na falta da mutação primária (FRANSEN et al., 2010).

Não foi encontrada nenhuma diferença significativa em relação à presença de mutações e os diferentes grupos estudados, no entanto, foi observado que a mutação M154L estava ausente no grupo de pacientes que não faziam uso de medicamento e que a frequência no grupo dos pacientes tratados era de 7,1%. Apesar do número de amostras diferir, Ceccherini-Silberstein et al. (2010) relataram dado semelhante. Estudos recentes indicam uma forte associação entre M154L e as mutações T215(Y/F/S/D) na TR (LOW et al., 2009; CECCHERINI-SILBERSTEIN et al., 2010a).

Além de não ter sido detectada nenhuma mutação primária, de maneira semelhante a outros trabalhos (LATAILLADE, CHIARELLA, KOZAL, 2007; PASSAES et al., 2009; LOW et al., 2009; ARRUDA et al., 2010; CECCHERINI-SILBERSTEIN et al., 2010a), também não foi identificada qualquer mutação em sítios indispensáveis para a função da enzima demonstrando, assim, a importância destes para a infecção e replicação viral. Além disso, o padrão de mutação encontrado foi independente da experiência atual ou não com ARVs, apesar de alguns trabalhos indicarem a influência da terapia ARV na variabilidade da IN (LOW et al., 2009; VAN HAL et al., 2009; CECCHERINI-SILBERSTEIN et al., 2010b).

A ausência de mutações primárias pode estar envolvida com a utilização clínica dessa classe de droga, uma vez que o RAL foi incluído na lista de

medicamentos antirretrovirais no Brasil em 2008. Ademais, a falta de variantes naturalmente resistentes aos inibidores de integrase também sugere que a circulação destas entre os pacientes virgens de tratamento será limitada até que a ampla utilização desta nova classe de ARV aumente a chance de infecção por uma variante de um paciente tratado e resistente (CECCHERINI-SILBERSTEIN et al., 2010b).

A presença isolada de polimorfismos e mutações associadas à resistência aos inibidores de IN parece não ter nenhuma significância na diminuição da suscetibilidade a estes inibidores ou, então, sua contribuição é mínima. As mutações primárias na integrase levam a uma redução na atividade de integração e mutações acessórias restauram parcialmente a atividade da integração deficiente, que por sua vez restaura a cinética de replicação e a infectividade viral (NAKAHARA et al., 2009). Este tipo de participação das mutações acessórias também já foi descrita para vírus resistentes a outras classes de ARVs (DYKES, DEMETER, 2007) o que, no entanto, não torna dispensável a necessidade de mais estudos com o objetivo de verificar a importância de mutações e/ou polimorfismos na determinação da barreira genética dos inibidores de IN e das diversas vias que possam levar à resistência. Da mesma maneira, a identificação e caracterização de resíduos conservados também são fundamentais para o desenvolvimento de novos fármacos que possam agir mais eficientemente no bloqueio da replicação e em regiões distintas dos inibidores de integrase atuais, RAL e EVG, evitando a resistência cruzada.

Estes dados indicam que a terapia com os inibidores de integrase pode beneficiar o tratamento de pacientes que apresentam falha terapêutica a outras classes de ARVs e que, aparentemente, a região da integrase possui variações naturais, assim como a protease, e que a presença de mutações que levam à alta resistência aos inibidores de IN em pacientes virgens para esta classe de medicamento não é comumente detectada. Além disso, a escolha do inibidor de integrase RAL vem se mostrando tão eficiente como o efavirenz (LENNOX, 2008) na terapia de pacientes virgens de tratamento, levando a níveis indetectáveis de RNA plasmático e à recuperação imunológica. Tais resultados têm contribuído para a recomendação do RAL em combinação com dois inibidores de transcriptase reversa análogos de nucleosídeos para pacientes virgens de tratamento no *Guidelines for*

the use of Antiretroviral in HIV-1 Infected Adults and Adolescents dos Estados Unidos (DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 2009). No entanto, no Brasil o RAL não é ainda uma opção de tratamento para pacientes virgens, sendo somente utilizado em casos de falha terapêutica como terapia de resgate (BRASIL, 2008).

Assim, a terapia com inibidor de IN parece ser uma alternativa eficiente em casos de falha terapêutica, uma vez que não foram constatadas mutações primárias nas amostras analisadas. No entanto, há ainda a necessidade de compreender a participação de determinadas mutações e/ou polimorfismos na emergência de variantes resistentes, suas contribuições para o restabelecimento do *fitness* viral e também o impacto da introdução dos inibidores de integrase como primeira opção na terapêutica de pacientes virgens de tratamento.

REFERÊNCIAS

ARRUDA, L.B. et al. Genetic diversity on the integrase region of the pol gene among HIV type 1-infected patients naïve for integrase inhibitors in São Paulo City, Brazil. **AIDS Res. Hum. Retroviruses**, v.26, n.1, p.105-7, jan. 2010.

BIOAFRICA. REGA HIV-1 Subtyping Tool. **REGA HIV-1 & 2 Automated Subtyping Tool (version 2.0)**. Disponível em: <<http://www.bioafrica.net/>>. Acesso maio-dezembro 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Tratamento de HIV e Aids. Recomendações para terapia antirretroviral em adultos infectados pelo HIV – 2008. Suplemento I – Manejo da Falha Terapêutica**. Brasília. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pagina/recomendacoes-de-tratamento>>. Acesso em: 12 nov. 2010.

BRÍGIDO, L.F. et al. HIV type 1 subtype C and CB Pol recombinants prevail at the cities with the highest AIDS prevalence rate in Brazil. **AIDS Res. Retroviruses**, v.23, n.12, p.1579-86, dec. 2007.

CANNON, P.M. et al. Conserved sequences in the carboxyl terminus of integrase that are essential for human immunodeficiency virus type 1 replication. **J. Virol.**, v.70, n.1, p.651-7, jan. 1996.

CARTEAU, S.; HOFFMANN, C.; BUSHMAN, F. Chromosome structure and human immunodeficiency virus type 1 cDNA integration: centromeric alphoid repeats are a disfavored target. **J. Virol.**, v.72, n.5, p.4005-14, may 1998.

CASTILLA, J. et al. Late diagnosis of HIV infection in the era of highly active antiretroviral therapy: consequences for AIDS incidence. **AIDS**, v.16, n.14, p.1945-51, sep. 2002.

CECCHERINI-SILBERSTEIN, F. et al. Secondary integrase resistance mutations found in HIV-1 minority quasispecies in integrase therapy-naïve patients have little or

no effect on susceptibility to integrase inhibitors. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.54, n.9, p.3938-48, sep. 2010b.

CECCHERINI-SILBERSTEIN, F. et al. Specific HIV-1 integrase polymorphisms change their prevalence in untreated versus antiretroviral-treated HIV-1-infected patients, all naive to integrase inhibitors. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.65, n.11, p.2305-18, nov. 2010a.

CECCHERINI-SILBERSTEIN, F. et al. Characterization and structural analysis of HIV-1 Integrase conservation. **AIDS Rev.**, v.11, n.1, p.17-29, jan-mar 2009.

COOPER, D.A. et al. Subgroup and resistance analyses of raltegravir for resistant HIV-1 infection. *N. Engl. J. Med.*, v.359, n.4, p.355-65, jul.2008.

DE MEDEIROS, L.B. et al. Primary resistance of human immunodeficiency virus type 1 in a reference center in Recife, Pernambuco, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.101, n.8, p.845-9, dec. 2006.

DELWART, E.L. et al. Genetic subtyping of human immunodeficiency virus using a heteroduplex mobility assay. **PCR Methods Appl.**, v.4, n.5, p.S202-16, apr. 1995.

DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents. **Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents – December 2009**. Disponível em: <<http://www.aidsinfo.nih.gov/ContentFiles/AdultandAdolescentGL.pdf>>. Acesso em: 05 dez. 2010.

DEPREZ, E. et al. Oligomeric states of the HIV-1 integrase as measured by time-resolved fluorescence anisotropy. **Biochemistry**, v.39, n.31, p.9275-84, aug. 2000.

DYKES, C.; DEMETER, L.M. Clinical significance of human immunodeficiency virus type 1 replication fitness. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.20, n.4, p.550-78, oct. 2007.

ELGELMAN, A.; MIZUUCHI, K.; CRAIGIE, R. HIV-1 DNA integration: mechanism of viral DNA cleavage and DNA strand transfer. **Cell.**, v.67, n.6, p.1211-21, dec. 1991.

ENGELMAN, A.; CHEREPANOV, P. The lentiviral integrase binding protein LEDGF/p75 and HIV-1 replication. **PLoS Patholog.**, v.4, n.3, e1000046, mar. 2008.

EWING, B. et al. Base-calling of automated sequencer traces using *Phred*. I. Accuracy assessment. **Genome Res.** v.8, n.3, p.175-185, 1998a.

EWING, B; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using *Phred*. II. Error probabilities. **Genome Res.** v.8, n.3, p.186-194, 1998b.

FRANSEN, S. et al. Comparison of raltegravir susceptible and resistant viruses define de the contribution of secondary mutations to reductions in raltegravir susceptibility. In: 17th CONFERENCE ON RETROVIRUSES AND OPPORTUNISTIC INFECTIONS (CROI), 2010, San Francisco, **Program and Abstracts**, abstract #556. Disponível em: <<http://www.retroconference.org/2010/index.asp>>. Acesso em: 29 nov. 2010.

FRANSEN, S. et al. Loss of raltegravir susceptibility by human immunodeficiency virus type 1 is conferred via multiple nonoverlapping genetic pathways. **J. Virol.**, v.83, n.22, p.11440-6, nov. 2009.

GOETHALS, O. et al. Primary mutations selected in vitro with raltegravir confer large fold changes in susceptibility to first-generation integrase inhibitors, but minor fold changes to inhibitors with second-generation resistance profiles. **Virology**, v.402, n.2, p.338-46, jul. 2010.

GOETHALS, O. et al. Resistance mutations in human immunodeficiency virus type 1 integrase selected with elvitegravir confer reduced susceptibility to a wide range of integrase inhibitors. **J. Virol.**, v.82, n.21, p.10366-74, nov. 2008.

GOLDGUR, Y. et al. Three new structures of the core domain of HIV-1 integrase: an active site that binds magnesium. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.95, n.16, p.9150-4.

GOODMAN, D. et al. Integrase inhibitor resistance involves complex interactions among primary and secondary resistance mutations: a novel mutation L68V/I associates with E92Q and increases resistance. In: XVII INTERNATIONAL HIV

DRUG RESISTANCE WORKSHOP, 2008, Sitges, Spain, **Antivir. Ther.** 13 (Suppl. 3): A15.

GRABAR, S.; WEISS, L.; COSTAGLIOLA, D. HIV infection in older patients in the HAART era. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.57, n.1, p.4-7, jan. 2006.

GUIMARÃES, M.L. et al. Identification of two CRF_{01_BF} in Rio de Janeiro State, Brazil. **AIDS**, v.22, n.3, p.433-5, jan. 2008.

HERRING, B.L.; CUNNINGHAM, A.L.; DWYER, D.E. Potential drug resistance polymorphisms in the integrase gene of HIV type 1 subtype A. **AIDS Res. Hum. Retrovir.** v.20, n.9, p.1010-4, sep. 2004.

INOCENCIO, L.A. et al. Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance: a survey of individuals recently diagnosed with HIV. **J. Int. AIDS Soc.**, v.12, n.1, p.1-6, sep. 2009.

KATZMAN, M.; SUDOL, M. Mapping viral DNA specificity to the central region of integrase by using functional human immunodeficiency virus type 1/visna virus chimeric proteins. **J. Virol.**, v.72, n.3, p.1744-53, mar. 1998.

LATAILLADE, M.; CHIARELLA, J.; KOZAL, M.J. Natural polymorphism of the HIV-1 integrase gene and mutations associated with integrase inhibitor resistance. **Antivir. Ther.**, v.12, n.4, p.563-70, 2007.

LEE, S.P. et al. Zn²⁺ promotes the self-association of human immunodeficiency virus type-1 integrase in vitro. **Biochemistry**, v.36, n.1, p.173-80, jan. 1997.

LEH, H. et al. Determinants of Mg²⁺-dependent activities of recombinant human immunodeficiency virus type 1 integrase. **Biochemistry**, v.39, n.31, p.9285-94, aug. 2000.

LENNOX, J.L. et al. 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**, v.374, n.9692, p.796-806, sep. 2009.

LITTLE, S.J. et al. Antiretroviral-drug resistance among patients recently infected with HIV. **N. Engl. J. Med.**, v.347, n.6, p.385-94, aug. 2002.

LOW, A. et al. Natural polymorphisms of human immunodeficiency virus type 1 integrase and inherent susceptibilities to a panel of integrase inhibitors. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.53, n.10, p.4275-82, oct. 2009.

LUTZKE, R.A.; PLASTERK, R.H. Structure-based mutational analysis of the C-terminal DNA-binding domain of human immunodeficiency virus type 1 integrase: critical residues for protein oligomerization and DNA binding. **J. Virol.**, v.72, n.6, p.4841-8, jun. 1998.

LUTZKE, R.A.; VINK, C.; PLASTERK, R.H. Characterization of the minimal DNA-binding domain of the HIV integrase protein. **Nucleic Acids Res.**, v.22, n.20, p.4125-31, oct. 1994.

MALET, I. et al. Mutations associated with failure of Raltegravir treatment affect integrase sensitivity to the inhibitor in vitro. **Antimicrob. Agents and Chemother.** v.52, n.4, p.1351-8, apr. 2008.

MANFREDI, R. HIV infection and advanced age emerging epidemiological, clinical, and management issues. **Ageing Res Rev.**, v.3, n.1, p.31-54, jan. 2004.

MARCHAND, C. et al. HIV-1 IN inhibitors: 2010 update and perspectives. **Curr. Top. Med. Chem.**, v.9, n.11, p.1016-37, 2009.

MENÉNDEZ-ARIAS, L. Molecular basis of human immunodeficiency virus drug resistance: An update. **Antiviral Res.**, v.85, n.1, p.210-31, jan. 2010.

MITCHELL, R.S. et al. Retroviral DNA integration: ASLV, HIV, and MLV show distinct target site preferences. **PLoS Biol.**, v.2, n.8, p.E234, aug. 2004.

NAKAHARA, K. et al. Secondary mutations in viruses resistant to HIV-1 integrase inhibitors that restore viral infectivity and replication kinetics. **Antiviral Res.**, v.81, n.2, p.141-6, feb. 2009.

PASSAES, C.B. et al. Lack of primary mutations associated with integrase inhibitors among HIV-1 subtypes B, C, and F circulating in Brazil. **J. Acquir. Defic. Syndr.**, v.51, n.1, p.7-12, may 2009.

POMMIER, Y.; JOHNSON, A.A.; MARCHAND, C. Integrase inhibitors to treat HIV/AIDS. **Nat. Rev. Drug. Discov.**, v.4, n.3, p.236-48, mar. 2005.

QUERCIA, R. et al. Selective-advantage profile of human immunodeficiency virus type 1 integrase mutants explains in vivo evolution of raltegravir resistance genotypes. **J. Virol.**, v.83, n.19, p.10245-9, oct. 2009.

RHEE, S.Y. et al. Natural variation of HIV-1 group M integrase: Implications for a new class of antiretroviral inhibitors. **Retrovirology**, v.5, n.74, aug. 2008.

SA FILHO, D.J. et al. Analysis of full-length human immunodeficiency virus type 1 genome reveals a variable spectrum of subtypes B and F recombinants in São Paulo, Brazil. **AIDS Res. Hum. Retroviruses**, v.21, n.2, p.145-51, feb. 2005.

SA FILHO, D.J. et al. Identification of two HIV type 1 circulating recombinant forms in Brazil. **AIDS Res. Hum. Retroviruses**, v.22, n.1, p.1-13, jan. 2006.

SANABANI, S. et al. Analysis of the near full length genomes of HIV-1 subtypes B, F and BF recombinant from a cohort of 14 patients in São Paulo, Brazil. **Infect. Genet. Evol.**, v.6, n.5, p.368-77, sep. 2006.

SANABANI, S.S. et al. Characterization and frequency of a newly identified HIV-1 BF1 intersubtype circulating recombinant in São Paulo, Brazil. **Virol. J.**, v.7:74, apr. 2010.

SANTOS, A.F. et al. Characterization of a new circulating recombinant form comprising HIV-1 subtypes C and B in southern Brazil. **AIDS**, v.20, n.16, p.2011-9, oct. 2006.

SCHRÖDER, A.R. et al. HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. **Cell**, v.110, n.4, p.521-9, aug. 2002.

SHIMURA, K. et al. Broad antiretroviral activity and resistance profile of the novel human immunodeficiency virus integrase inhibitor elvitegravir (JTK-303/GS-9137). **J. Virol.**, v.82, n.2, p.764-74, jan. 2008.

SICHTIG, N. et al. Evolution of raltegravir resistance during therapy. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.64, n.1, p.25-32, jul. 2009.

SKIEST, D.J. et al. The importance of comorbidity in HIV-infected patients over 55: a retrospective case-control study. **Am. J. Med.**, v.101, n.6, p.605-11, dec. 1996.

SOARES, E.A. et al. HIV-1 subtype C dissemination in southern Brazil. **AIDS**, v.19, n.4, p.S81-6, oct. 2005.

STANDFORD UNIVERSITY. **HIVdb Program Genotypic Resistance Interpretation Algorithm** Version **6.0.7**. Disponível em: <<http://hivdb.stanford.edu/pages/algs/HIVdb.html>>. Acesso maio-dezembro 2010.

VAN HAL, S.J. et al. HIV-1 integrase polymorphisms are associated with prior antiretroviral drug exposure. **Retrovirology**, v.6:12, feb. 2009.

VINK, C. et al. Site-specific hydrolysis and alcoholysis of human immunodeficiency virus DNA termini mediated by the viral integrase protein. **Nucleic. Acids Res.**, v.19, n.24, p.6691-8, dec. 1991.

WENSING, A.M. et al. Prevalence of drug-resistant HIV-1 variants in untreated individuals in Europe: implications for clinical management. **J. Infect. Dis.**, v.192, n.6, p.958-66, sep. 2005.

WU, X. et al. Human immunodeficiency virus type 1 integrase protein promotes reverse transcription through specific interactions with the nucleoprotein reverse transcription complex. **J. Virol.**, v.73, n.3, p.2126-35, mar. 1999.

WU, X. et al. Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. **Science**, v.300, n.5626, p.1749-51, jun. 2003.

Capítulo IV

Rede Nacional de Genotipagem

Desde 1991, o Governo Brasileiro adota uma política que visa garantir o acesso universal à terapia antirretroviral (ARV) aos portadores do HIV. Esta medida tem grande impacto na redução da morbidade e mortalidade dos pacientes infectados pelo HIV e na epidemia de HIV/aids no país.

O Brasil foi o primeiro país a implementar um programa de distribuição em alta escala de ARV beneficiando diversos pacientes. A evolução da resposta brasileira foi fortemente influenciada pelo seu amplo contexto político e social, particularmente a estrutura e função do sistema de saúde público.

Apesar do avanço no desenvolvimento dos medicamentos e dos diversos ARVs disponíveis, variantes virais resistentes selecionadas durante o tratamento dos pacientes podem emergir, levando à falha terapêutica e, conseqüentemente, à elevação da carga viral do paciente. Além disso, essas variantes podem ser transmitidas dificultando o tratamento do paciente recém-infectado.

Com o intuito de monitorar adequadamente os pacientes, o Ministério da Saúde implantou no âmbito laboratorial, em 2001, a Rede Nacional de Genotipagem do HIV-1 (RENAGENO), com o intuito de realizar e interpretar os resultados do teste de resistência utilizando critérios adequados e racionais, estabelecidos por comitê técnico assessor. A Rede hoje conta com 23 laboratórios executores especializados (Figura 1) na execução do exame, um “laboratório de resgate” envolvido na resolução de problemas de ordem técnica e operacional, além de médicos especialistas treinados para solicitar o exame e orientar na interpretação do teste, designados médicos de referência em genotipagem (MRG). A solicitação, execução e liberação do exame seguem um fluxograma rigidamente definido (Figura 2).



Figura 1: Distribuição geográfica no território nacional dos laboratórios de genotipagem integrantes da Rede Nacional de Genotipagem do HIV (RENAGENO) (BRASIL, 2010).

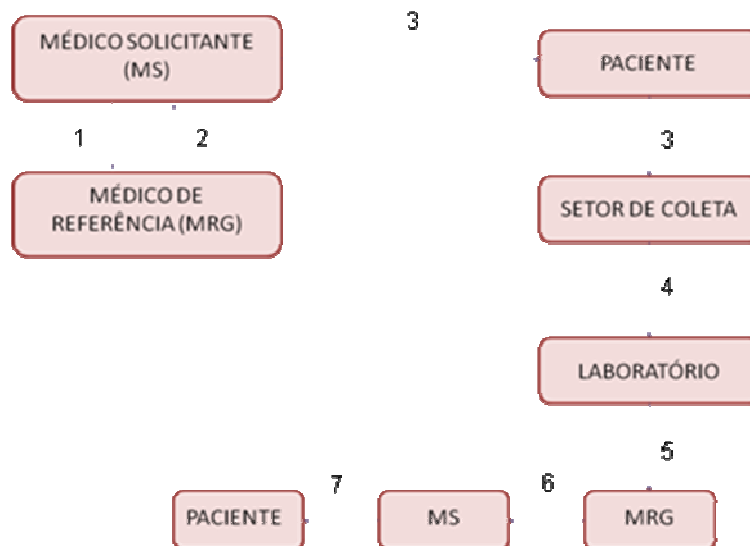


Figura 2: Fluxograma do funcionamento da Renageno: (1) Médico solicitante (MS) encaminha solicitação de teste de genotipagem para o médico de referência em genotipagem (MRG); (2) MRG autoriza ou não a realização do exame; (3) MS encaminha paciente para coleta de material para o exame de genotipagem; (4) Material biológico é encaminhado para execução do exame de genotipagem; (5) Laudo com resultado da genotipagem é encaminhado para avaliação do MRG; (6) MRG avalia o laudo laboratorial e envia relatório ao MS com interpretação clínica e sugestão de esquema terapêutico baseado nos dados clínicos e laboratoriais; (7) MS indica terapêutica antirretroviral ao paciente (Adaptado de BRASIL, 2001).

Os testes de genotipagem foram desenvolvidos para ajudar a avaliar o impacto da resistência viral. Este teste é capaz de detectar mutações associadas com resistência fenotípica aos ARVs do HIV. A técnica consiste no isolamento de RNA viral do plasma do paciente e posterior amplificação por RT-PCR das regiões genômicas da transcriptase reversa e protease, principais alvos dos ARVs. O produto é, então, sequenciado em equipamento automatizado e a sequência de aminoácido viral obtida é comparada com a sequência do vírus selvagem para a identificação de mutações.

Segundo o Ministério da Saúde (2008), a utilidade do teste de genotipagem para detecção de resistência a drogas se resume nos seguintes itens:

1. Possibilita trocas de esquemas antirretrovirais com resistência identificada, no lugar de resistência presumida;
2. Propicia o uso de drogas ativas por períodos mais prolongados;
3. Evita trocas desnecessárias de ARVs;
4. Evita toxicidade desnecessária de drogas inativas;
5. Economiza custos relacionados a trocas de drogas;
6. Promove uma noção mais realista do desempenho futuro do tratamento.

No entanto, para a realização do teste de genotipagem há determinados critérios que devem ser seguidos:

1. Falha virológica confirmada;
2. Carga viral com pelo menos 2.000 cópias de RNA/mL;
3. Uso regular de ARV:
 - Há seis meses, para pacientes em geral;
 - Há três meses, para gestantes.

O objetivo inicial da implantação da RENAGENO era o de instalar uma rede de laboratórios para realizar exames de genotipagem em pacientes da rede pública de saúde infectados pelo HIV. Esses laboratórios foram distribuídos segundo a capacidade técnica instalada e de acordo com o número de pacientes em uso de

ARV nas diferentes macrorregiões do país. Secundariamente a esse objetivo, com a instalação da rede outras questões poderiam ser estudadas, como: avaliar o impacto do acesso ao teste de genotipagem na evolução clínica, imunológica e virológica de pacientes soropositivos para o HIV em tratamento com ARV na rede pública de saúde; estimar a prevalência de mutações e sua associação ao estadiamento clínico, exposição prévia a ARVs, ao esquema terapêutico em uso no momento da coleta, nas diferentes áreas geográficas e aos subtipos circulantes; contribuir no monitoramento, quantitativo e qualitativo, da emergência de variantes resistentes circulantes no país; gerar dados de prevalência de subtipos do HIV-1 que infectam os pacientes que utilizaram a genotipagem, uma vez que a região genômica da *pol* pode ser utilizada para análise filogenética do vírus.

O Brasil é um dos poucos países que disponibiliza um teste de genotipagem gratuitamente, além dos medicamentos ARVs, mostrando uma resposta à epidemia de HIV/AIDS que deve funcionar como modelo para diversos outros países. Além disso, a responsabilidade do país não se limita à distribuição de medicamentos e testes laboratoriais gratuitos, mas envolve também a educação, prevenção, monitoramento epidemiológico e desenvolvimento de parcerias entre o governo e a sociedade para ampliar a resposta à epidemia do HIV/AIDS.

Desta forma, a RENAGENO juntamente com os demais laboratórios, tem como objetivo contribuir para que o paciente HIV positivo tenha o acompanhamento médico necessário para que sua sobrevivência seja elevada, além de fornecer dados de extrema importância para o estudo epidemiológico do HIV no país.

A participação na RENAGENO como um dos laboratórios executores exige um controle de qualidade rígido, capacitação para realização do exame e para a avaliação dos dados que serão fundamentais para a interpretação do laudo de resistência e indicação de tratamento pelo MRG.

A rotina no laboratório não somente proporciona a oportunidade de trabalhar com técnicas moleculares indispensáveis para quem pretende seguir a área de biologia molecular, mas também oferece um amplo conhecimento profissional e científico. A responsabilidade exigida em todas as etapas, do recebimento da amostra até a execução final do exame e sua liberação, é essencial para qualquer

profissional, em qualquer segmento. Contribuir de forma a gerar resultados confiáveis no final de cada rotina disponível pela Rede é fundamental não somente por demonstrar a qualidade do laboratório, mas por garantir que o paciente tenha as melhores escolhas e indicações de tratamento.

Assim, a contribuição dos laboratórios executores para com a RENAGENO requer mais do que a realização do exame em si, mas também um comprometimento real visando a qualidade final do exame.

REFERÊNCIAS

BRASIL. Ministério da Saúde. **Projeto de Implantação de uma Rede Nacional para Genotipagem do HIV-1 (RENAGENO) em pacientes com falha terapêutica aos anti-retrovirais - 2001.** Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/en/node/42987>>. Acesso em: 10 nov. 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Rede Nacional de Laboratórios de Genotipagem. Brasília.** Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pagina/rede-nacional-de-laboratorios-de-genotipagem>>. Acesso em: 12 nov. 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Tratamento de HIV e Aids. Recomendações para terapia antirretroviral em adultos infectados pelo HIV – 2008.** Brasília. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pagina/recomendacoes-de-tratamento>>. Acesso em: 12 nov. 2010.

TEIXEIRA, P.R.; VITÓRIA, M.A.; BARCAROLO, J. Antiretroviral treatment in resource-poor settings: the Brazilian experience. **AIDS**, v.3, p.S5-7, jun. 2004.

TEIXEIRA, P.R.; VITÓRIA, M.A.; BARCAROLO, J. The Brazilian Experience in Providing Universal Access to Antiretroviral Therapy. In: Moatti J-P, Coriat B, Souteyrand Y, Barnett T, Dumoulin J, Flori Y-A, eds. **Economics of AIDS and Access to HIV/AIDS Care in Developing Countries, Issues and Challenges.** Paris, France: Agence Nationale de Recherches sur le Sida; 2003.69–88. Disponível em: <<http://www.lepublieur.com/anrs/ecoaids6.pdf>>. Acesso em: 15 nov. 2010.

Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP



**Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu**

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br
e-mail coordenadoria: tsarden@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde
em 30 de abril de 1997

Botucatu, 07 de dezembro de 2.009

OF. 470/2009-CEP

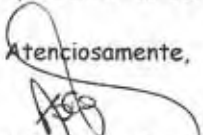
Ilustríssima Senhora
Profª Drª Maria Inês de Moura Campos Pardini
Divisão de Hemocentro da
Faculdade de Medicina de Botucatu

Prezada Drª Maria Inês,

De ordem do Senhor Coordenador deste CEP, informo que Projeto de Pesquisa (Protocolo CEP 3407-2009) "Avaliação da resistência aos inibidores de integrase em pacientes soropositivos para o HIV-1", a ser conduzido por Aline Aki Tanikawa, orientada por Drª. Maria Inês de Moura Campos Pardini, co-orientada pela Drª. Rejane Maria Tommasini Grotto, com a participação de Dr. Lenice do Rosário de Souza recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião de 07 de dezembro de 2.009.

Situação do Projeto: APROVADO. Ao final da execução deste Projeto, apresentar ao CEP "Relatório Final de Atividades".

Atenciosamente,


Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP

Anexo 2 : Justificativa de Alteração no Título do Projeto de Pesquisa



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



JUSTIFICATIVA DE ALTERAÇÃO NO TÍTULO DO PROJETO DE PESQUISA

Declaramos que o Projeto de Pesquisa "Avaliação da Resistência aos inibidores de integrase em pacientes soropositivos para o HIV-1"

aprovado pelo CEP em 07/12/2009, teve seu título alterado para "Avaliação da Resistência primária aos inibidores de integrase em pacientes soropositivos para o HIV-1", sem nenhuma alteração no seu conteúdo metodológico da época de apresentação para análise do CEP.

A presente alteração foi efetuada somente para adequação do título da Dissertação de Mestrado.

Botucatu, 01/12/2010

Nome/Assinatura do(a) aluno(a) *Adine Ala Sanitawa / pro. Dr. Janice*

Nome/Assinatura do(a) orientador (a) *[Assinatura]*

Programa de Pós Graduação em Pesquisa e Desenvolvimento – Biotecnologia Médica

10:17 01/12/2010 000000 COMITE DE ETICA EM PESQUISA - UNESP