



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**RESISTÊNCIA AOS INIBIDORES DA INTEGRASE NO
TRATAMENTO DA INFECÇÃO PELO VIH**

Trabalho submetido por
Mafalda Carneiro da Rita Alves Ferreira
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

novembro de 2016



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**RESISTÊNCIA AOS INIBIDORES DA INTEGRASE NO
TRATAMENTO DA INFECÇÃO PELO VIH**

Trabalho submetido por
Mafalda Carneiro da Rita Alves Ferreira
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
Prof. Doutora Perpétua Gomes

novembro de 2016

"Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Se estamos possuídos por uma inabalável determinação conseguiremos superá-los. Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho."

Dalai Lama

Agradecimentos

Deixo o meu reconhecimento a todos que contribuíram para a concretização deste trabalho:

À Professora Doutora Perpétua Gomes, por ter despertado em mim o interesse para este tema, por toda a ajuda, espírito crítico, orientação e disponibilidade demonstrada ao longo destes meses.

A todos os profissionais do Laboratório de Microbiologia Clínica e Biologia Molecular do HEM, por me terem recebido tão bem e estarem sempre disponíveis para me ajudar, especialmente ao Mestre Joaquim Cabanas que me ajudou a realizar a análise estatística deste trabalho.

À minha mãe Olga, pelo amor, carinho, por toda a ajuda académica, pelos esclarecimentos, pela paciência e pela força de vontade que me transmite sem a qual nunca teria atingido esta meta.

Ao meu pai Zé, sempre com palavras de motivação e com toda a ternura que me transmite leva-me sempre a acreditar e nunca desistir.

Ao Artur, pelo apoio incondicional, pelo companheirismo, por estar sempre ao meu lado e com uma enorme paciência transmite-me sempre a força que preciso para não desistir.

Ao meu avô Manel e à minha avó Mena pela preocupação, pelo apoio e por todo o carinho e amor que me dão.

À minha tia Xana, ao meu tio Rogério e ao meu primo Francisco, que me dão todo o apoio familiar que necessito em Lisboa.

Aos meus irmãos Nuno e João Pedro, que embora longe estão sempre perto e conto sempre com eles.

Às minhas querida amigas, Rita Varanda, Filipa Barbosa, Carmo Santos Silva, Mónica Carvalho e Silva, Guadalupe Videira, Catarina Fernandes e Leonor Militão, que sempre me apoiaram e se interessaram ao longo destes anos por esta minha vida académica.

Resumo

Objetivo: Avaliar a resistência aos inibidores da integrase (InSTIs) no tratamento de indivíduos infetados por VIH-1 e sob falência virológica na presença destes fármacos.

Material e Métodos: Foram analisadas, retrospectivamente, isolados virais (região da integrase) pertencentes a 367 indivíduos, dos quais 213 (58%) homens e 154 (42%) mulheres, com idades compreendidas entre os 7 e os 83 anos. As mutações estudadas foram as descritas pela *International Aids Society* (IAS) como associadas a resistência aos InSTIs.

Resultados: A frequência das mutações de resistência encontrada foi bastante variável, sendo a N155H a mutação com maior frequência e a mutação 121Y não foi encontrada. 33% (n=121) dos indivíduos estavam infetados por vírus do subtipo G, 26% (n=94) pelo subtipo B, 11% (n=39) pelo subtipo C, 10% (n=38) pelo subtipo CRF02_AG e os restantes 20% correspondem a outros subtipos. Foi ainda possível identificar a frequência com que as mutações ocorrem isoladamente e em associação, prevalecendo a presença de uma única mutação em 40% (n=33), embora 60% (n=48) dos doentes resistentes apresentem duas ou mais mutações. As mutações são globalmente independentes do subtipo ($p \geq 0,05$). No entanto, as mutações da posição 140 e 148 são exceção ($p=0,011$ e $p=0,002$, respetivamente) tendo uma maior prevalência no subtipo B. Verificou-se ainda, que a resistência aos InSTIs encontrada no sexo masculino (n=48) foi semelhante à encontrada no sexo feminino (n=33), 24% e 21%, respetivamente. As mutações da região do gene da integrase são independentes das outras classes terapêuticas (NRTIs, NNRTIs, IPs) que constituem o regime terapêutico, $p=0,295$.

Conclusão: Neste estudo, 78% dos indivíduos apresentam suscetibilidade aos InSTIs, e os restantes 22% apresentaram mutações associadas a resistência no gene da integrase, que influenciam a resposta à terapêutica com InSTIs. Nesta população, a baixa utilização de regimes terapêuticos com EVG, teve como consequência a baixa prevalência das mutações T66I e S147G, E92Q, Q148, assim como a associação Q148 com a G140. A elevada prevalência das mutações N155H e T97A reflete a utilização do raltegravir. A reduzida presença das mutações Q148HRK e R263K favorece a possibilidade de tratamento sequencial com DTG.

Palavras – Chave: VIH | Integrase | Inibidores da integrase | Mutação | Resistência.

Abstract

Objective: Assessment of integrase inhibitors (InSTIs) resistance in infection treatment by VIH-1 and under virological failure in the presence of these drugs.

Materials and Methods: Isolated viral (integrase region), belonging to 367 subjects, of which 213 (58%) were men and 154 (42%) women, between the ages of 7 and 83, were retrospectively analysed. The studied mutations were described by the International Aids Society (IAS) as associated to InSTIs resistance.

Results: The mutation frequency was variable, being N155H the mutation with the highest frequency and 121Y wasn't found in any subject. 33% (n=121) of the subjects were infected with subtype G virus, 26 % (n=94) with subtype B, 11% (n=39) with subtype C, 10% (n=38) with subtype CRF02_AG and the remaining 20% corresponded to other subtypes. It was also possible to identify the frequency in which the mutations occur both singly and in combination. The presence of a single mutation prevails in 40% (n=33), although 60% (n=48) of the resistant patients exhibit two or more mutations. Overall, mutations are subtype independent ($p \geq 0,05$). However, the changes in 140 and 148 position are an exception ($p = 0.011$ and $p = 0.002$, respectively), emerging more easily in subtype B. It founds that the number of infected men (n=48) exhibit a similar InSTIs resistances than women (n=33), 24% and 21% respectively. Mutations of the integrase gene region are independent from other therapeutic classes (NRTIs, NNRTIs, PIs) which constitute the therapeutic regimen, $p = 0.295$.

Conclusion: In this study, 78% of the subjects are susceptible to InSTIs, and the remaining 22% exhibits mutations, which are associated to resistance in the integrase gene, which influence the response to InSTIs therapy. In this population, reduced therapeutic with EVG resulted in the low prevalence of T66I and S147G, E92Q, Q148 mutations as well as Q148 and G140 association. High prevalence of N155H and T97A reflects that Raltegravir is being used. The reduced presence of Q148HRK and R263K mutations, favours the possibility of sequential treatment with DTG.

Key words: HIV | Integrase | Integrase inhibitors | Mutation | Resistance

Índice Geral

1.	Introdução	11
1.1	Descoberta do Vírus da Imunodeficiência Humana	11
1.2	História Evolutiva do VIH	12
1.3	Epidemiologia	15
1.3.1	Distribuição mundial	15
1.3.2	VIH em Portugal	15
1.4	Taxonomia e características gerais	16
1.5	Vírus da Imunodeficiência humana tipo 1	17
1.5.1	Organização estrutural	17
1.5.2	Organização genómica do VIH-1	18
1.6	Ciclo de replicação viral	19
1.7	Diversidade genética	20
1.7.1	Grupo M do VIH-1	21
1.7.2	Mecanismos Responsáveis pela Diversidade Genética	21
1.8	“Quasispecies”	22
1.9	Terapêutica antirretroviral	23
1.9.1	Classes terapêuticas dos antirretrovirais	23
1.9.2	Fatores de resistência aos antirretrovirais em doentes VIH-1	25
1.10	Integrase	25
1.10.1	Processo de Integração	31
1.10.2	Inibidores da integrase InSTIs	35
1.10.3	Caracterização de mutações associadas à resistência	40
1.10.4	Mutações associadas à resistência aos inibidores da integrase	40
2.	Objetivos	45
3.	Materiais e Métodos	46
3.1	População	46
3.2	Métodos	46
3.2.1	Extração do ARN viral	46
3.2.2	Amplificação da região da integrase	47
3.2.3	Quantificação dos produtos da RT-PCR	48
3.2.4	Protocolo de purificação – Exosap	49
3.2.5	Ciclo de sequenciação e purificação	50
3.2.6	Purificação da sequência com etanol e acetato de sódio	50
3.2.7	Deteção da sequência de ADNc	51

3.2.8	Análise das sequências obtidas.....	51
4.	Resultados.....	53
5.	Discussão de Resultados.....	61
6.	Conclusão	65
7.	Bibliografia.....	67

Índice de figuras

Figura 1: Origem do VIH. Transmissão zoonótica a vermelho.....	13
Figura 2: Filogenia dos lentivírus	14
Figura 3: Estrutura do VIH	18
Figura 4: Organização do genoma do VIH-1	18
Figura 5: Ciclo de replicação viral do VIH-1 e respetivos alvos terapêuticos...	20
Figura 6: Domínios da integrase	26
Figura 7: Domínio NTD da integrase	27
Figura 8: Domínio CCD da integrase	27
Figura 9: Domínio CTD da integrase	29
Figura 10: Tetramero	29
Figura 11: Tríade catalítica, dímero CCD-CTD e dímero NTD-CCD	30
Figura 12: Terminais longos de repetição (LTR)	32
Figura 13: Entrada do PIC no núcleo	33
Figura 14: Formação de uma dupla cadeia linear de ADN e das extremidades 3'-CAOH no ADN viral.....	34
Figura 15: Processo de integração	35
Figura 16: Raltegravir.....	37
Figura 17: Dinucleótidos CA e a 4 ^a guanina	38
Figura 18: Elvitegravir.....	39
Figura 19: Dolutegravir	40
Figura 20: Mutações que contribuem para a resistência aos inibidores da integrase.....	41
Figura 21: Mutações que contribuem para a resistência ao RAL	42
Figura 22: Mutações no domínio CCD que conferem resistência aos inibidores da integrase	44
Figura 23: Procedimento equipamento automático Nuclisens [®] easyMag [®] (BioMérieux)	47

Índice de tabelas

Tabela 1: RT-PCR master mix para uma amostra	47
Tabela 2: Ciclos de amplificação da RT-PCR da integrase.....	48
Tabela 3: Tabela de referência para a quantificação dos produtos RT-PCR.....	49
Tabela 4: Tempos usados na purificação	49
Tabela 5: Valores de diluição para produtos de RT-PCR purificados.....	50
Tabela 6: Ciclos utilizados na amplificação do gene da integrase	50
Tabela 7: Análise das mutações relevantes entre o subtipo B e G	59

Índice de gráficos

Gráfico 1: Prevalências dos subtipos VIH-1 na população estudada.....	53
Gráfico 2: Frequências das mutações.....	54
Gráfico 3: Indivíduos Resistentes vs Suscetíveis	55
Gráfico 4: Indivíduos Resistentes vs Suscetíveis do sexo Masculino	55
Gráfico 5: Indivíduos Resistentes vs Suscetíveis do sexo Feminino.....	56
Gráfico 6: Frequência de mutações isoladas e em associação.....	57
Gráfico 7: Frequência de mutações isoladas	57
Gráfico 8: Frequência da associação de duas mutações	58

Lista de abreviaturas

- ADN – Ácido Desoxirribonucleico
ARN – Ácido Ribonucleico
ARVs – Fármacos Antirretrovirais
CA – Cápside
CRFs – Formas Recombinantes Circulantes
DTG – Dolutegravir
EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EVG – Elvitegravir
FDA – *Food and Drug Administration*
HAART – Regime Terapêutico Antirretroviral de Alta Potência
IN – Integrase
InSTIs - Inibidores de Transferência de Cadeia da Integrase
LEDGE/p75 – Fator de Crescimento *lens epithelium*
MA – Proteína da Matriz
NC – Nucleocápside
NNRTI – Fármaco Não Análogo dos Nucleósidos Inibidor da Transcriptase Reversa
NRTI – Fármaco Análogo dos Nucleósidos Inibidor da Transcriptase Reversa
PIC – Complexo de Pré-integração
PR – Protease
RAL – Raltegravir
RT – Transcriptase Reversa
SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SU – Glicoproteína de Superfície
TARc – Terapêutica Antirretroviral Combinada
TBE – Tris/Borato/EDTA
TM – Glicoproteína Transmembranar
VIH – Vírus da Imunodeficiência Humana

1. Introdução

1.1 Descoberta do Vírus da Imunodeficiência Humana

Em 1983, cientistas no Instituto Pasteur em Paris, ao investigarem a causa da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) isolaram, pela primeira vez, o agente etiológico da SIDA, a partir de uma cultura de linfócitos-T de um paciente com linfadenopatias. Designaram este vírus de *lymphadenopathy associated virus* (LAV). Mais tarde, em 1984, Robert Gallo e outros investigadores do National Cancer Institute em Bethesda isolam um outro retrovírus também associado à ocorrência da síndrome da imunodeficiência adquirida, nomeando-o de *human T-cell lymphotropic virus type III* - HTLV-III. A caracterização genética e molecular destes agentes revelou que todos os isolados eram variantes do mesmo vírus e, em 1986, adotou-se uma nomenclatura única passando-se a designar-se por Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH) (Gelderblom et al., 1988; Reeves & Doms, 2002).

Posteriormente, um novo vírus foi isolado a partir de dois pacientes que se encontravam no Hospital Egas Moniz, em Lisboa, embora este tenha sido identificado pela primeira vez no Instituto Pasteur, em Paris. Estes pacientes eram provenientes da Guiné-Bissau e de Cabo Verde, duas ex-colónias portuguesas localizadas na África Ocidental (Clavel et al., 1986; Gelderblom et al., 1988; Valadas & Antunes, 2004). Estes retrovírus revelaram apenas diferenças genéticas e serológicas relativamente aos anteriormente descobertos e foram classificados em VIH do tipo 2 (VIH-2), distinguindo-se dos isolados originais, atualmente designados por VIH do tipo 1 (VIH-1) (Gelderblom et al., 1988; Sharp & Hahn, 2011).

A prevalência da infeção por VIH-2 fora da África Ocidental é muito baixa, exceto em países com um passado socioeconómico ligado a Portugal, tal como o sudeste da Índia, Angola, Moçambique e Brasil, onde existe um número significativo de indivíduos infetados por VIH-2. As taxas de infeção, também vão diminuindo à medida que se viaja da Guiné-Bissau e Cabo Verde para países africanos em seu redor. A maioria dos pacientes que adquiriram a infeção em África tinha estado na Guiné-Bissau durante as décadas de 1960 e 1970, quando se iniciou a disseminação do vírus. Coincidiu com as guerras coloniais portuguesas e consequente envio de milhares de soldados para as ex-colónias, incluindo a Guiné-Bissau. Deste modo, Portugal tornou-se um dos países, fora da África Ocidental com uma das mais altas taxas de prevalência da

infeção pelo HIV-2, sendo o país da Europa com maior prevalência (Reeves & Doms, 2002; Valadas & Antunes, 2004).

Em Portugal, o país de origem dos pacientes infetados por VIH-2 difere de região para região. Enquanto, na região de Lisboa, a maioria dos pacientes infetados são da Guiné-Bissau ou Cabo Verde, possivelmente refletindo o afluxo de imigrantes já infetados provenientes desses países, no norte de Portugal quase todos os pacientes infetados são de origem portuguesa. A lenta progressão da infeção por VIH-2 possibilita que esta se continue a disseminar de uma forma despercebida (Valadas & Antunes, 2004).

Ambos os tipos do VIH são responsáveis pela síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), contudo a maioria dos indivíduos infetados com VIH-2 não progridem para SIDA, mas os que acabam por desenvolver SIDA, apresentam sintomas clínicos indistinguíveis do VIH-1. Atualmente, o vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (VIH-1) é o agente etiológico do síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) pandémica, enquanto o VIH-2 é endémico. (Reeves & Doms, 2002; Sharp & Hahn, 2011; Valadas & Antunes, 2004).

1.2 História Evolutiva do VIH

Existem cinco linhas de evidência capazes de justificar a transmissão zoonótica (figura 1) de lentivírus dos primatas: semelhanças na organização do genoma viral, relação filogenética, prevalência no hospedeiro natural, coincidência geográfica e possíveis rotas de transmissão (Gao et al., 1999).

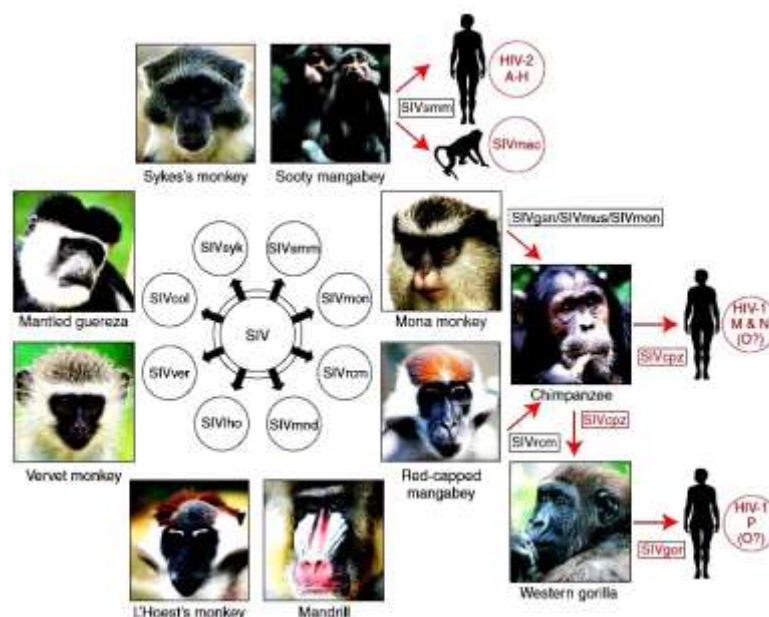


Figura 1: Origem do VIH. Transmissão zoonótica a vermelho. (Sharp, 2011)

O Vírus da Imunodeficiência Símia nos *sooty mangabeys monkeys* (SIVsmm) é filogeneticamente próximo do VIH-2. Este vírus foi encontrado num número considerável de *sooty mangabeys* (*Cercocebus atys*) cujo habitat natural é a costa oeste africana, desde o Senegal até ao Ghana e que coincide com o epicentro do VIH-2 epidémico (Desrosiers, 1990; Gao et al., 1999). O contacto próximo entre esta espécie e os humanos tem por base o facto de ser utilizada na alimentação e/ou como animal de estimação (Gao et al., 1999). Uma hipótese provável da transmissão do SIV ao Homem foi a exposição direta ao sangue de primatas infetados (Martin Peeters, D’Arc, & Delaporte, 2014).

O VIH-1 teve origem no vírus da imunodeficiência símia (SIVs) detetado em chimpanzés (SIVcpz) e gorilas (SIVgor). A primeira linhagem de SIVs foi identificada na década de 80 a partir de chimpanzés *Pan troglodytes troglodytes*, no Gabão. As sequências genómicas e a análise filogenética mostraram que o SIVcpz estava intimamente relacionado com o VIH-1, suspeitando-se que a origem da epidemia pelo VIH-1 teve início na transmissão zoonótica do SIVs a partir de chimpanzés (Mirela et al., 2015; M Peeters & Delaporte, 2012). As estirpes de SIVcpz da subespécie de chimpanzés *Pan troglodytes troglodytes* têm sido objeto de maior transmissão, tanto para seres humanos, transmitindo o VIH-1, como para gorilas (*Gorilla gorilla*) originando a SIVgor (Mirela et al., 2015).

Os chimpanzés *Pan troglodytes troglodytes* são o reservatório para o grupo M do VIH-1 pandémico e para o grupo N. Os vírus do grupo P estão estreitamente relacionados com estirpes de SIVgor, indicando que provavelmente surgiram de uma transmissão gorila-humano, e os vírus do grupo O também estão mais relacionados com o SIVgor do que com o SIVcpz, mas não é claro se o precursor do vírus humano infetou chimpanzés ou gorilas(Mirela et al., 2015; M Peeters & Delaporte, 2012).

Estudos filogenéticos comprovam que os dois tipos de VIH partilham uma maior proximidade evolutiva com os respetivos SIV do que entre si (figura 2) (Reeves & Doms, 2002).

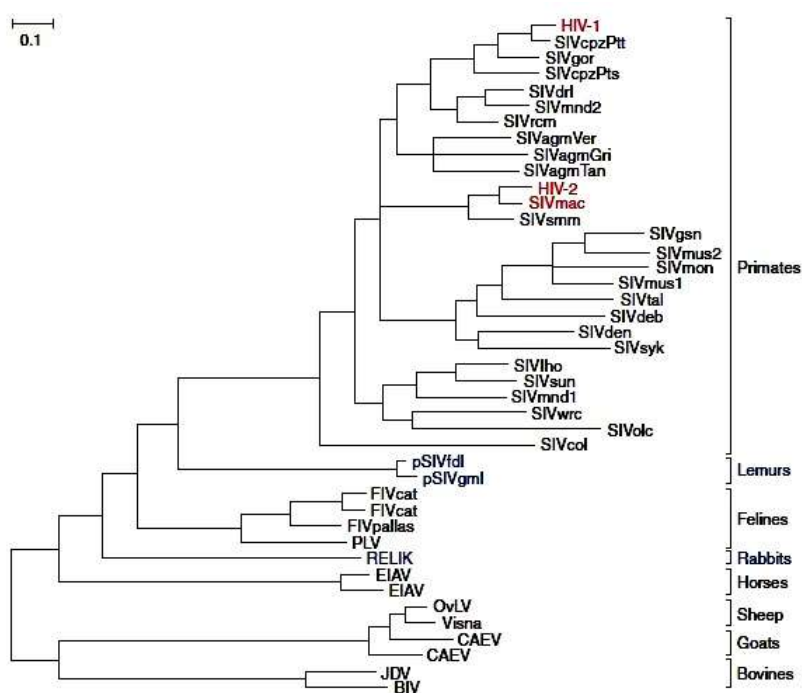


Figura 2: Filogenia dos lentivírus baseada em sequências Pol obtidas a partir de vários lentivírus de mamíferos. (Sharp, 2011)

Assim, devido às evidências genéticas, filogenéticas e epidemiológicas pode-se concluir que VIH teve origem a partir de múltiplas transmissões zoonóticas do vírus da imunodeficiência símia (SIV) (Hemelaar, Gouws, Ghys, & Osmanov, 2013; Sharp & Hahn, 2011).

1.3 Epidemiologia

1.3.1 Distribuição mundial

Segundo a organização mundial de saúde (OMS), no final do ano de 2015, estimou-se que 36,7 milhões de pessoas contraíram VIH e 17 milhões tiveram acesso a tratamento, o que representa cerca de 46% dos indivíduos infetados. Em 2015, calculou-se que a SIDA provocou 1,1 milhões de mortes e que surgiram cerca de 2,1 milhões de novas infeções. A população de adultos e crianças infetadas com o VIH encontra-se concentrada fundamentalmente no continente africano, principalmente na região subsariana. Esta região continua a ser a mais afetada, com 25,6 milhões de indivíduos infetados (World Health Organization (WHO), 2016).

Relativamente à transmissão do VIH, esta ocorre através do sangue e os seus derivados, por contacto sexual e por transmissão vertical (Patel et al., 2014) encontrando-se a taxa de infeção relativamente mais alta nos utilizadores de drogas injetáveis, na prostituição e nos homens homossexuais (Rutenberg, Tun, & Borse, 2016). A nível mundial, foi estimado que 13 milhões de indivíduos consomem drogas por via endovenosa, e destes, cerca de 1,7 milhões encontram-se infetados com VIH. Embora a transmissão fosse significativa nas relações homossexuais o progresso da epidemia fez com que a frequência de transmissão heterossexual aumentasse, apresentando atualmente maior número de pessoas infetadas comparativamente com os homossexuais (World Health Organization (WHO), 2016).

1.3.2 VIH em Portugal

A Unidade de Referência e Vigilância Epidemiológica do Departamento de Doenças Infeciosas do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, em colaboração com o Programa Nacional da Infeção VIH/SIDA da Direção-Geral da Saúde elabora, anualmente, um relatório referente à infeção VIH/SIDA que reúne informação epidemiológica relativa à caracterização da situação em Portugal, tendo por base o sistema de notificação de casos de infeção VIH/SIDA, que é obrigatória em Portugal, desde 2005 (Martins, Shivaji, & Saúde, 2015).

Relativamente à situação em Portugal em 2014 (último relatório disponível) destacam-se as seguintes informações:

- Em Portugal foram diagnosticados 920 novos casos de infeção por VIH em 2014 e, no final do ano, encontravam-se diagnosticados, cumulativamente, 52.694 casos de infeção por VIH, dos quais 20.856 em estadio de SIDA;
- 72,5% dos novos casos diagnosticados dizem respeito ao sexo masculino, com uma idade mediana ao diagnóstico de 38 anos;
- Os novos casos correspondiam maioritariamente (99,3%) a indivíduos com idade igual ou superior a 15 anos;
- Apenas 18,3% apresentavam uma patologia indicadora de SIDA à data do diagnóstico da infeção;
- 92,2% dos casos foram por transmissão por via sexual, sendo que 61,3% através de relações heterossexuais e os restantes 42,7% por meio de relações sexuais entre homens;
- As infeções associadas ao consumo de drogas equivalem a 4,3% dos novos diagnósticos;
- De acordo com os valores das contagens iniciais de CD4, 51,2% dos novos casos corresponderam a diagnósticos tardios;
- A análise das tendências temporais da epidemia revela, desde 2008, uma descida consistente da taxa de novos diagnósticos;
- Portugal continua a ter uma das mais elevadas taxas da União Europeia;
- As tendências recentes revelam um decréscimo acentuado dos casos de infeção associados a consumo de drogas, aumento dos diagnósticos em jovens do sexo masculino que têm sexo com homens e uma elevada percentagem de diagnósticos tardios, particularmente em heterossexuais de meia-idade (Martins et al., 2015).

1.4 Taxonomia e características gerais

Segundo o Internacional Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), o vírus da imunodeficiência humana (VIH) pertence à família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirinae*, género *Lentivirus* (International Committee on Taxonomy of Viruses, 2015).

O genoma viral é constituído por duas cadeias de ácido ribonucleico (ARN) de cadeia simples (ss-ARN) e contém 9 genes (Freed, 2001; Gelderblom et al., 1988). A sobrevivência viral depende de dois processos fundamentais. Primeiro, a ocorrência de transcrição reversa no seu ciclo replicativo, em que, por ação de uma transcriptase reversa, ocorre a conversão de cada uma das moléculas de ARN genómico de cadeia simples numa molécula de ácido desoxirribonucleico (ADN), de cadeia dupla (ds-ADN). Posteriormente, a integração do seu genoma, na forma de ADN complementar, no genoma da célula hospedeira (ADN proviral) (Krishnan & Engelman, 2012).

Durante a infeção, o VIH apresenta tropismo particular para células do sistema imunitário, principalmente para os linfócitos T CD4⁺. A sua especificidade deve-se, essencialmente, à utilização de recetores de membrana CD4⁺ presentes nessas células, juntamente com os co-recetores CXCR4 ou CCR5, para os quais o vírus possui tropismo diferencial (Forsman & Weiss, 2008).

1.5 Vírus da Imunodeficiência humana tipo 1

1.5.1 Organização estrutural

O VIH apresenta uma estrutura esférica com um diâmetro de 110 nm e é revestido exteriormente por um invólucro viral de natureza lipídica, derivado da membrana citoplasmática da célula hospedeira, onde se encontram inseridas duas glicoproteínas de origem viral: a glicoproteína transmembranar (gp41) ligada à glicoproteína de superfície (gp120), tal como se pode observar na figura 3 (A. Engelman, 2013; Frankel, Francisco, & Young, 1998; Freed, 2001).

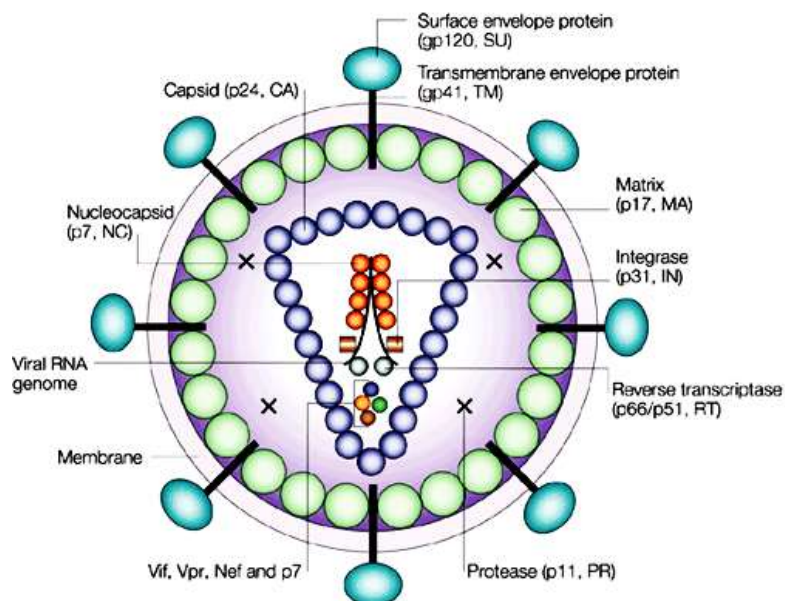


Figura 3: Estrutura do VIH (Disponível em: http://www.nature.com/nri/journal/v2/n4/fig_tab/nri776_F1.html)

1.5.2 Organização genómica do VIH-1

O genoma do VIH – 1 tem três genes estruturais *gag*, *pol* e *env* que codificam inicialmente poliproteínas, que são posteriormente clivadas em proteínas funcionais comuns a todos os retrovírus. As quatro proteínas Gag são a proteína da matriz, MA ou p17, localizada entre a cápside e a membrana viral, a proteína da cápside, CA ou p24, que forma o “core” viral, proteína da nucleocápside, NC ou p7 e a proteína p6. A clivagem da poliproteína Env origina a proteína do invólucro viral SU ou gp120 e a glicoproteína transmembranar TM ou gp41. O conjunto destas proteínas formam o core do virião e a membrana externa do invólucro viral. A clivagem da poliproteína Pol origina as enzimas retrovirais protéase, PR ou p11, a transcriptase reversa, TR ou p66/p51 e a integrase, IN ou p31. O vírus tem ainda outros genes que codificam seis proteínas adicionais, Vif, Vpr, Vpr, Vpu e Nef denominadas proteínas acessórias e a Tat e Rev denominadas proteínas reguladoras (figura 4) (Frankel et al., 1998; Freed, 2001).

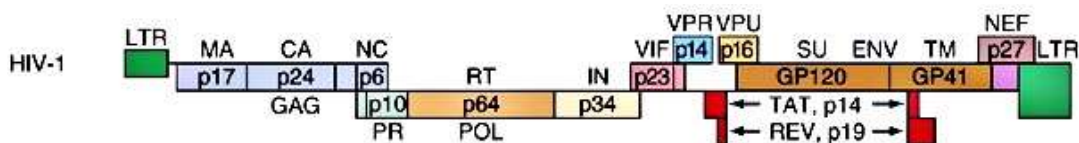


Figura 4: Organização do genoma do VIH-1 (Adaptado de:

http://highered.mheducation.com/sites/dl/free/0071402357/156712/figure172_2.html)

1.6 Ciclo de replicação viral

No ciclo de replicação do VIH é possível identificar diferentes etapas sequenciais, como se pode observar na figura 5:

Ligação e Entrada: Ao entrar na corrente sanguínea, o VIH infeta células que apresentam o recetor CD4⁺ à sua superfície como os linfócitos T. A glicoproteína gp120 do invólucro viral exposta à superfície sofre uma série de alterações conformacionais em resposta à interação com o recetor CD4⁺, e os co-recetores, CCR5 ou CXCR4 (Hajduczki, Bundoc, & Berger, 2015). Após uma mudança conformacional do complexo, a gp41 permite a fusão do invólucro viral com a membrana celular (Alsaahfi, Debbeche, Sodroski, & Finzi, 2015) que conduz à libertação do core viral dentro do citoplasma (Hu & Hughes, 2012). Após a sua entrada na célula hospedeira, a cápside viral sofre descapsidação, processo em que ocorre destruição da cápside viral por ação das enzimas celulares, libertando o ARN e as enzimas virais (Jayappa et al., 2015).

Transcrição reversa: O ARN viral (duas cópias de ARN de cadeia simples) é convertido em ADN de cadeia dupla por ação da RT que atua através das vias polimerase ADN dependente de ARN, RNase H e polimerase de ADN dependente de ADN (M. T. Miller, Tuske, Das, Destefano, & Arnold, 2015). No final do processo de retrotranscrição obtém-se uma molécula de ADN linear de cadeia dupla limitada pelas LTR. (Frankel et al., 1998; Freed, 2001).

Integração do ADN: No citoplasma, forma-se o complexo de pré-integração (PIC) do qual faz parte o ADN viral assim como as proteínas virais RT, IN, NC e MA, penetra no núcleo da célula, através dos poros nucleares (Craigie & Bushman, 2013; M. D. Miller, Farnet, & Bushman, 1997). No núcleo a IN catalisa a inserção do ADN viral no ADN da célula hospedeira, através de um processo de transferência de cadeia, formando-se um provírus (Krishnan & Engelman, 2012; Métifiot, Marchand, Maddali, & Pommier, 2010; Serrao et al., 2014).

Replicação viral: O provírus serve de molde para a síntese de mARNs virais, por transcrição, os quais codificam as proteínas estruturais, reguladoras e acessórias que constituem os vírus (Freed, 2001). Por tradução dos mARNs virais sintetizam as várias proteínas virais, que se organizam ao nível da membrana celular, para formar as novas partículas virais. O ARN que constitui o material genético, é incorporado na partícula

viral juntamente com componentes proteicos. Forma-se, assim, uma partícula que se liberta da membrana (Engelman & Cherepanov, 2014).

Maturação viral: A maturação viral é a última etapa da replicação do vírus na célula hospedeira infetada. Neste processo, a partícula viral imatura sofre um rearranjo estrutural, mediado pela PR viral, que cliva as poliproteínas *gag* e *gag-Pro-Pol* dando origem a proteínas estruturais MA, CA, NC, P6 e às enzimas PR, RT e IN. As proteínas e as enzimas sofrem, posteriormente, uma reorganização de modo a originarem partículas virais maduras e infecciosas, os viriões (Robinson, Reed, Geary, Swain, & Lingappa, 2014; Sundquist & Kräusslich, 2012).

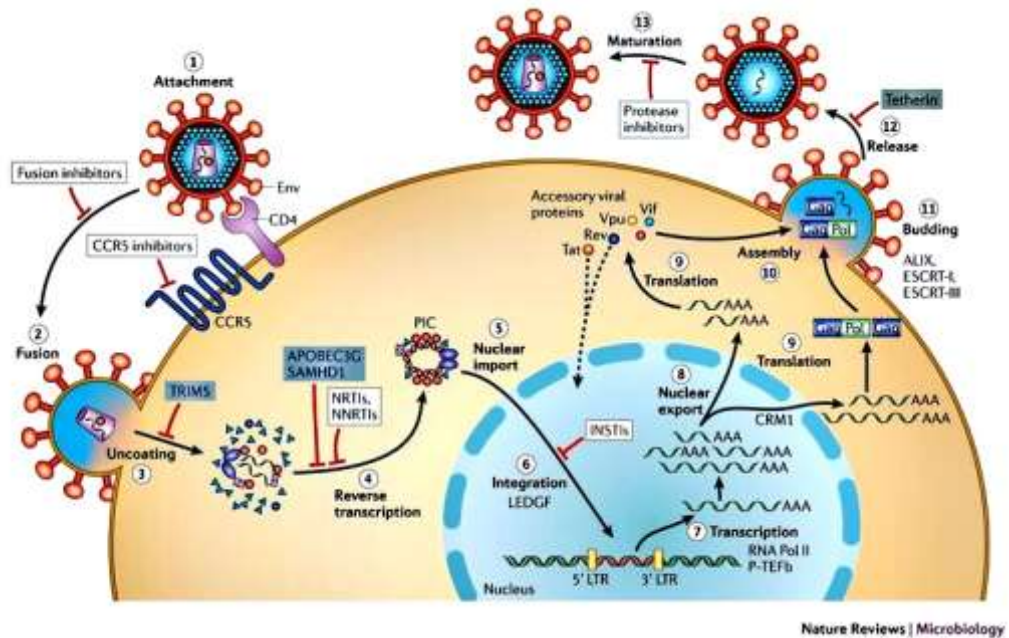


Figura 5: Ciclo de replicação viral do VIH-1 e respetivos alvos terapêuticos
Adaptado de: http://www.nature.com/nrmicro/jouARN1/v10/n4/fig_tab/nrmicro2747_F1.html

1.7 Diversidade genética

As estirpes do VIH-1 que circulam globalmente, podem ser classificadas em quatro grupos filogenéticos principais: o grupo M (major/main), N (non-M/non-O), O (outlier) e P (new group), todos causadores de SIDA, sendo o grupo M o principal responsável pela epidemia global de SIDA (Gao et al., 1999; Han, Mesplède, & Wainberg, 2016; Kluge et al., 2014; Langs-Barlow & Paintsil, 2014; Martin Peeters et al., 2014).

O grupo M é transversal a qualquer parte do mundo. É o grupo que maior expansão teve e o que engloba a maior diversidade genética. Em contrapartida, o grupo N é o menos prevalente, onde apenas há casos reportados em Camarões. O grupo O corresponde a 1% do número total de casos de VIH-1 e está confinado principalmente nos Camarões e no Gabão. O grupo P é o mais raro, tendo sido apenas identificado, numa mulher grávida originária dos Camarões mas a viver em França (Bhatti, Usman, & Kandi, 2016).

1.7.1 Grupo M do VIH-1

O grupo M deste vírus teve origem no SIVcpz dos chimpanzés *Pan troglodytes troglodytes* (Hemelaar et al., 2013). Na primeira metade do século 20, após a transmissão para os humanos, mas ainda confinado a África, o grupo M diversificou-se em vários subtipos genéticos (A, B, C, D, F, G, H, J, K) (Han et al., 2016; Hemelaar et al., 2013; Langs-Barlow & Paintsil, 2014; Martin Peeters et al., 2014). Esta variabilidade genética teve origem em elevadas taxas de mutação e recombinações por ação da enzima transcriptase reversa, aliada às elevadas taxas de replicação do próprio vírus.

Existem ainda combinações genéticas entre subtipos diferentes que originam as formas recombinantes circulantes (CRFs) e as formas recombinantes únicas (URFs) (Hemelaar et al., 2013). Dentro de cada um dos subtipos, CRFs, e URFs, existem também variações de sequências genéticas que ocorrem sem influência da pressão antirretroviral. Estas variações que ocorrem naturalmente são designadas por polimorfismos. Por outro lado, as variações que resultam da pressão seletiva de determinados fármacos são conhecidas como mutações de resistência. Assim, estas últimas são dependentes da classe a que o antirretroviral pertence (Langs-Barlow & Paintsil, 2014). Na segunda metade do século 20, ocorreu a expansão global do grupo M do VIH-1 resultando na distribuição global diferencial dos subtipos do VIH-1 e dos recombinantes (Hemelaar et al., 2013).

1.7.2 Mecanismos Responsáveis pela Diversidade Genética

A elevada diversidade genética do VIH-1 tem contribuído para a formação rápida de novas variantes genéticas, influenciando a velocidade com que estes vírus evoluem.

Estudos no grupo M do VIH-1 permitiram identificar os três fatores que contribuem para a variabilidade genética do VIH:

- Elevada taxa de replicação viral *in vivo* que gera aproximadamente 10^{10} viriões por dia num indivíduo afetado.
- Elevada taxa de mutação, devido ao aparecimento de erros mediados pela RT e pela incapacidade de correção dos nucleótidos introduzidos incorretamente.
- Elevada taxa de recombinação da enzima transcriptase reversa (RT), que transcreve ARN viral em ADN, que é propensa a erros e introduz em média uma mutação por genoma, por ciclo de replicação. A recombinação ocorre porque a RT copia, alternadamente, as duas moléculas de ARN existentes no virião, gerando um genoma de ADN mosaico. A frequência de recombinação varia entre 7 a 30 por ciclo de replicação. A recombinação é uma etapa importante na evolução viral, não só no indivíduo, mas também na epidemia global (Dampier et al., 2016; Deeks, 2003; Hemelaar et al., 2013; McCutchan, 2006; Potter, Chew, Steain, Dwyer, & Saksena, 2004).

1.8 “Quasispecies”

Os fatores responsáveis pela variabilidade genética, anteriormente citados, conduzem à rápida formação de micropopulações virais distintas, geneticamente relacionadas entre si, denominadas “*quasispecies*”. Muitas vezes, a presença destas “*quasispecies*” provoca uma reduzida suscetibilidade a um ou dois fármacos antes de se iniciar a terapêutica (Arts & Hazuda, 2012; Dampier et al., 2016; McCutchan, 2006).

As “*quasispecies*” resultam da rápida evolução genómica devido à elevada taxa de mutação na replicação do ARN viral. Apesar de uma elevada taxa de mutação ser desfavorável para um vírus, pois podem-se obter vírus não viáveis, foi levantada a hipótese de poder originar um conjunto de mutações potencialmente benéficas ao nível da população, o que confere às “*quasispecies*” virais uma maior probabilidade de evoluírem e de se adaptarem a novos ambientes e desafios durante a infecção (Vignuzzi, Stone, Arnold, Cameron, & Andino, 2006).

1.9 Terapêutica antirretroviral

Antes de 1996, existiam poucas opções de tratamento antirretroviral para a infecção por VIH-1. A terapêutica consistia na profilaxia e tratamento contra agentes oportunistas e doenças relacionadas com a SIDA. O primeiro regime terapêutico escolhido, após o aparecimento dos primeiros fármacos antivirais exclusivos do VIH-1, foi a monoterapia (Arts, 2012). O primeiro composto capaz de inibir a replicação do VIH tanto *in vitro* como *in vivo* foi o suramin. Contudo, o primeiro fármaco anti-VIH com licença para uso clínico foi a zidovudina (NRTI) em 1987 (De Clercq, 2009).

No início de 1990, o tratamento da infecção por VIH-1 foi revolucionado com a introdução de outros inibidores da transcriptase reversa e posteriormente com os inibidores da protease (Arts & Hazuda, 2012). Deste modo, o padrão de cuidados do VIH-1 evoluiu para incluir a administração de um cocktail ou a combinação de pelo menos dois agentes antirretrovirais (ARVs), e de preferência num regime que combine três fármacos, de duas ou mais classes distintas, que diminuam a replicação do vírus alcançando-se assim, a supressão viral (Arts & Hazuda, 2012; Fernández-Ortega et al., 2016; The UK Collaborative HIV Cohort (UK CHIC) Writing Committee, 2016).

A utilização desta combinação, conhecida como terapêutica combinada de alta potência (HAART), no tratamento da infecção por VIH-1, foi fundamental na redução da morbilidade e mortalidade associadas à infecção pelo VIH-1 ou SIDA, o que veio melhorar a eficácia global e durabilidade da terapêutica (Arts & Hazuda, 2012; Cohen et al., 2016; Fernández-Ortega et al., 2016; The UK Collaborative HIV Cohort (UK CHIC) Writing Committee, 2016).

Embora a terapêutica antirretroviral combinada (TARc) seja eficaz no controlo da replicação viral e na reconstituição parcial das defesas imunitárias, a sua utilização é limitada pelo desenvolvimento da resistência viral. Como os ARVs não eliminam reservatórios virais, atualmente mantém-se a necessidade de uma terapêutica diária ao longo da vida do indivíduo infetado (Fernández-Ortega et al., 2016).

1.9.1 Classes terapêuticas dos antirretrovirais

Atualmente existem, 29 fármacos antirretrovirais aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA), para o tratamento da infecção por VIH-1. Estes dividem-se em

seis classes distintas de acordo com o alvo terapêutico, atuando em diferentes etapas do ciclo replicativo do VIH, como se pode observar na figura 5 (Bhatti et al., 2016; M. A. Wainberg, Han, & Mesplède, 2016):

- (1) Inibidores nucleósidos/nucleótidos da transcriptase reversa (NRTI)
- (2) Inibidores não nucleósidos da transcriptase reversa (NNRTI)
- (3) Inibidores da protease (IP)
- (4) Antagonistas dos co-recetores
- (5) Inibidores da fusão
- (6) Inibidores da integrase (InSTIs)

Os fatores a ter em consideração ao selecionar o primeiro regime TARc de um paciente incluem: a presença / ausência de resistência genotípica contra antirretrovirais específicos, tolerabilidade, potenciais efeitos adversos, co-morbilidades, interações medicamentosas e preferência do paciente (The UK Collaborative HIV Cohort (UK CHIC) Writing Committee, 2016), uma vez que o efeito da terapêutica pode ser prejudicado por baixa tolerabilidade aos fármacos, falta de adesão, e interações farmacológicas entre antirretrovirais e/ou outros fármacos que podem alterar os níveis pretendidos em circulação e ter implicações a nível de efeitos adversos. Cada um destes aspetos pode conduzir a uma falência virológica e ao aparecimento da resistência aos antirretrovirais, comprometendo o sucesso terapêutico. Os testes de resistência são recomendados antes de iniciar terapêutica antirretroviral combinada (TARc) com fármacos que atuam na RT e PR, em doentes que nunca fizeram tratamento, bem como para otimizar a terapêutica antirretroviral após falência virológica (Arts & Hazuda, 2012).

Dado o número de agentes e classes distintas de medicamentos antirretrovirais disponíveis, a maioria dos doentes, mesmo aqueles com história de fracassos anteriores, podem ser tratados com sucesso (Arts & Hazuda, 2012).

Uma vez que o vírus continua a evoluir mesmo com terapêuticas mais eficazes, novos tratamentos VIH-1 serão sempre necessários (Arts & Hazuda, 2012). No entanto, sendo os vírus parasitas intracelulares obrigatórios, sem metabolismo independente e

dependentes da “maquinaria” da célula hospedeira para a sua replicação, o recurso a proteínas da célula hospedeira que estejam envolvidas no ciclo de replicação, como alvo terapêutico, poderia representar uma via de investigação potencialmente vantajosa para o desenvolvimento de novas terapêuticas antirretrovirais alternativas (Fernández-Ortega et al., 2016).

1.9.2 Fatores de resistência aos antirretrovirais em doentes VIH-1

Existem vírus presentes em “reservatórios” no hospedeiro que persistem por longos períodos de tempo, dando origem a populações virais nas quais é frequente a acumulação de variantes multirresistentes, algumas das quais podem demonstrar grande infecciosidade e elevada capacidade replicativa (Dampier et al., 2016; Deeks, 2003; Ode et al., 2015; Potter et al., 2004).

O desenvolvimento de resistências à terapêutica antirretroviral, em indivíduos sob terapêutica HAART, pode ter origem em diferentes fatores:

- Heterogeneidade das “*quasiespecies*” de VIH-1 presente no indivíduo infetado;
- Elevada taxa de replicação viral apresentada durante o tratamento;
- Elevada taxa de mutações e o efeito destas na suscetibilidade à terapêutica e no *fitness* replicativo do vírus;
- Pressão seletiva proveniente da terapêutica;
- Farmacocinética;
- Má adesão aos regimes terapêuticos;
- Existência de reservatórios virais (Deeks, 2003; Potter et al., 2004).

1.10 Integrase

Para ultrapassar as limitações das terapêuticas existentes foram analisadas novas abordagens para o tratamento de infeção por VIH. Uma vez que não existe no organismo humano nenhum homólogo celular à enzima integrase do VIH, esta enzima tornou-se um alvo atrativo para desenvolvimento de fármacos antirretrovirais (Shimura et al., 2008).

A integrase é uma proteína com peso molecular de 32 kDa da família das nucleases-transposases que inclui a RNase H, a Ruv C, transposases e outras integrases retrovirais (Métifiot et al., 2010).

Esta proteína é constituída por 288 aminoácidos e é codificada na extremidade 3' do gene *pol*. Este gene dos retrovírus codifica três enzimas essenciais – protease, transcriptase reversa e integrase (Chen et al., 2008; Pommier, Johnson, & Marchand, 2005). A enzima integrase resulta da clivagem proteolítica do precursor Gag-Pol durante a maturação viral (Pommier et al., 2005; Shimura et al., 2008).

A integrase contém três domínios funcionais e estruturais: o domínio N-terminal ou amino-terminal (NTD) o domínio do centro catalítico (CDD), e o domínio C-terminal ou carboxi-terminal (CTD), representados na figura 6 (Blanco, Varghese, Rhee, Gatell, & Shafer, 2011; Pommier et al., 2005; Sala et al., 2016).

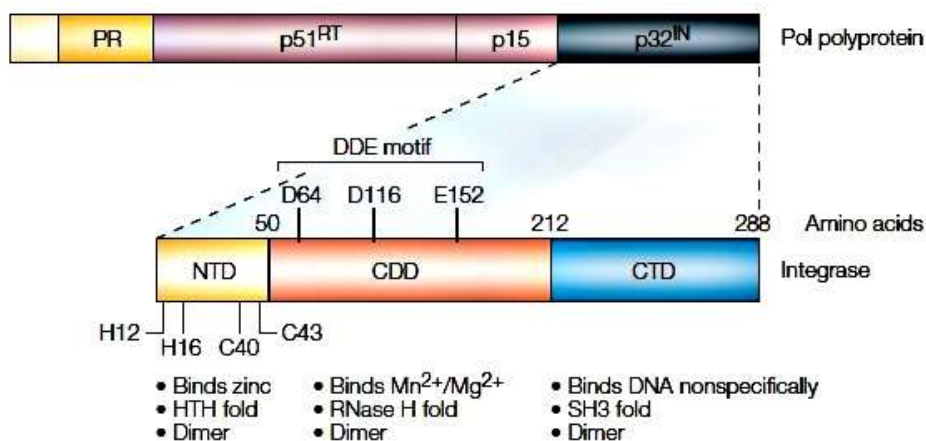


Figura 6: Domínios da integrase (Pommier, 2005)

Os primeiros 50 aminoácidos (1-50aa) formam o domínio N-terminal (NTD) que contém o motivo H12H16C40C43 constituído pela histidina 12 e 16 e pela cisteína 40 e 43, figura 7 (Sala et al., 2016). A presença de uma mutação em qualquer um destes quatro aminoácidos reduz a atividade enzimática da integrase (Pommier et al., 2005). O motivo HHCC forma um complexo de coordenação com um átomo de zinco, altamente conservado, estimulando a multimerização da integrase e promove a estabilização da proteína que é fundamental para estimular a atividade catalítica da integrase (Ceccherini-Silberstein, Malet, D'Arrigo, & Antinori, 2009; Engelman & Cherepanov, 2014; M. D. Andrade, 2015; Pommier et al., 2005).

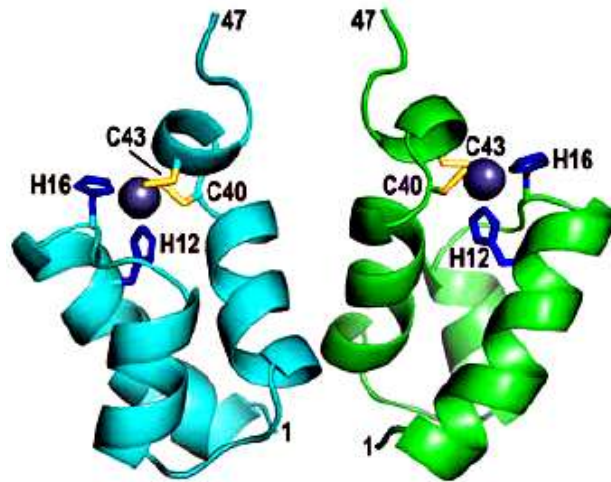


Figura 7: Domínio NTD da integrase. Os resíduos de histidina estão indicados a azul e de cisteína a amarelo. Estes encontram-se coordenados com um átomo de zinco (cinzento) (Adaptado: Engelman, 2014)

O domínio CCD é formado pelos aminoácidos que vão do 51 ao 212 e contem a tríade catalítica formada por aminoácidos ácidos, ácido aspártico (Asp-D) 64, ácido aspártico (Asp (D) 116 e ácido glutâmico (E) 152, dando origem ao motivo DDE ($D^{64}D^{116}E^{152}$), figura 8 (Lataillade, Chiarella, & Kozal, 2007; M.D. Andrade, 2015; R. W. Shafer, 2008). A tríade catalítica $D^{64}D^{116}E^{152}$ é altamente conservada em todas as integrases (Métifiot et al., 2010; Sala et al., 2016). A presença de uma mutação em qualquer um destes três resíduos ácidos anula a atividade enzimática da integrase e a replicação viral (Pommier et al., 2005).

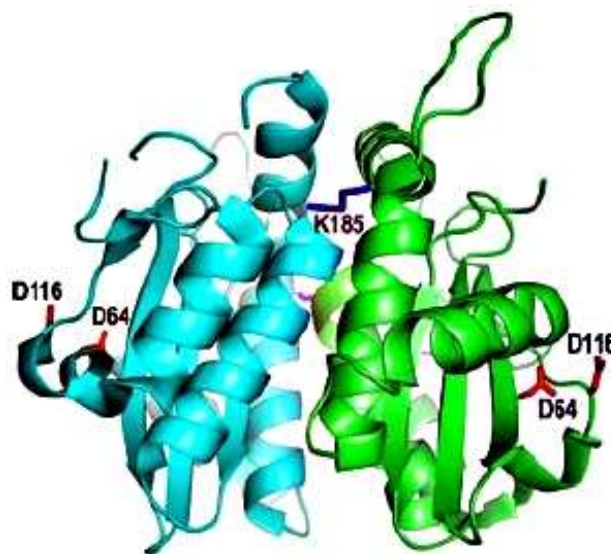


Figura 8: Domínio CCD da integrase. Os resíduos de aspartato da tríade catalítica (DDE) estão indicados a vermelho, o ácido glutâmico não é visualizado nesta estrutura. (Adaptado: Engelman, 2014)

Os dois resíduos D⁶⁴ e D¹¹⁶ formam um complexo de coordenação com iões bivalentes como o Mn²⁺ e os Mg²⁺, sendo esta ligação essencial para a atividade catalítica (Lataillade et al., 2007; Métifiot et al., 2010; Pommier et al., 2005; Sala et al., 2016).

Para além do centro catalítico, a região central também possui outros domínios funcionais e aminoácidos importantes, tal como o sinal de localização nuclear que medeia a importação nuclear do PIC e o motivo K¹⁸⁶R¹⁸⁷K¹⁸⁸ que participa na multimerização na interface dímero:dímero. Este domínio também tem alguns aminoácidos relevantes (H12, L102, A128, A129, C130, W131, W132, I161, R166, Q168, E170, H171, T174, M178, Q214L) que estão envolvidos nas ligações químicas e no contacto hidrofóbico com o LEDGF/p75 que é um cofator celular de integração essencial para a ligação da integrase à cromatina (Ceccherini-Silberstein et al., 2009). Ainda possui resíduos bem conservados como o Q148 que é crucial para a ligação ao ADN e outros como o Q62, H67, N120, N114, Q148 e N155, fundamentais no processo de integração e replicação (Lataillade et al., 2007).

Esta região central também está implicada na ligação das extremidades do ADN viral, principalmente, através dos resíduos Q148, K156 e K 159. Formam-se dímeros em cada extremidade da molécula de ADN viral, responsáveis pelo processamento 3'. Os pares de dímeros reúnem as duas extremidades do ADN viral levando à formação de um tetrâmero (dímero de dímero), na sua forma ativa que irá permitir que ocorra a etapa final da integração, ou seja, que as extremidades do ADN viral se liguem ao genoma da célula hospedeira (Delelis et al., 2008; Engelman & Cherepanov, 2014; Grandgenett, Pandey, Bera, & Aihara, 2015).

Por último temos o domínio CTD (figura 9) que fica compreendido entre os aminoácidos 213 e 288 e corresponde à região menos conservada da integrase (Sala et al., 2016). O CTD é responsável pela estabilização das ligações do ADN viral ao ADN da célula hospedeira por intermédio de uma interação inespecífica, *minimal nonspecific ADN binding region* (MDBD), localizada entre os aminoácidos 220 e 270. Esta região além de ser necessária ao processo de integração também está envolvida na multimerização da integrase e na interação com a RT (Ceccherini-Silberstein et al., 2009; Sala et al., 2016).

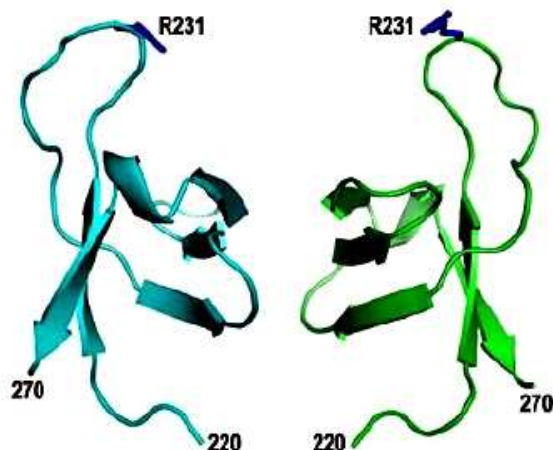


Figura 9: Domínio CTD da integrase. Os resíduos de arginina 231 (azul) que estão implicados na ligação ao ADN (Adaptado: Engelman, 2014)

A multimerização da integrase é essencial para a formação do PIC. É indispensável que a integrase esteja na sua forma dimérica para que ocorra o processamento 3'. Contrariamente, a etapa da transferência de cadeia implica que esta enzima se encontre na forma tetramérica que é estabilizada por interações com as extremidades do ADN viral, figura 10 (M. D. Andrade, 2015; Serrao, Odde, Ramkumar, & Neamati, 2009).

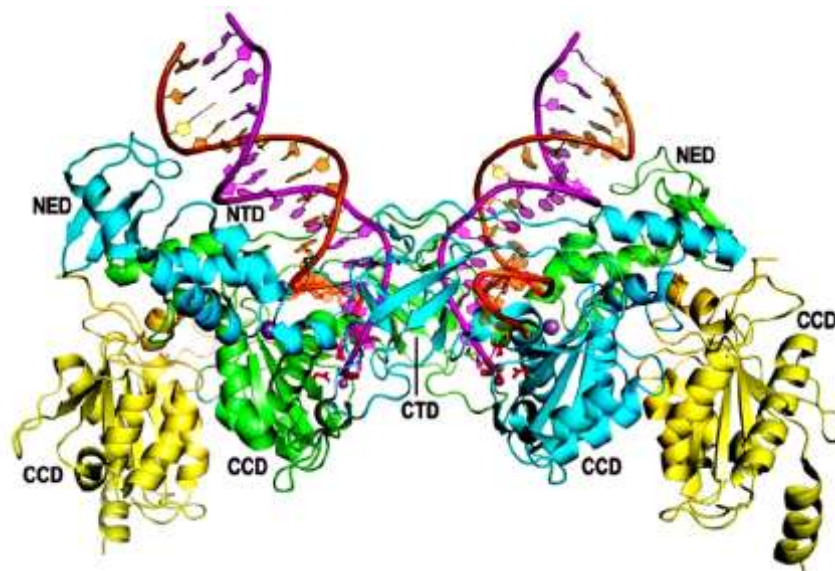


Figura 10: Tetramero. A parte central dos monómeros que contactam com o ADN viral está a azul e a verde. A parte exterior da integrase está a amarelo. As cadeias de ADN transferidas em que as extremidades têm $CA_{OH}3'$ estão a magenta enquanto as cadeias não transferidas estão a cor de laranja. As esferas cinzentas maiores correspondem ao complexo de coordenação entre o domínio NTD e o Zn^{2+} , as esferas cinzentas mais pequenas são átomos de Mn^{2+} coordenados pelos resíduos DDE (vermelho) e as extremidades de ADN viral (Adaptado: Engelman, 2014)

Embora o CCD contenha o centro catalítico, o NTD e o CTD são essenciais pois na sua ausência a integrase apenas consegue catalisar a reação de desintegração (o inverso da reação de transferência de cadeia) *in vitro*. Ou seja, para que ocorra o processamento 3' e a reação de transferência de cadeia, é fundamental que os domínios NTD e CTD se encontrem num complexo dimérico, figura 11 (Delelis et al., 2008; Pommier et al., 2005; Sala et al., 2016).

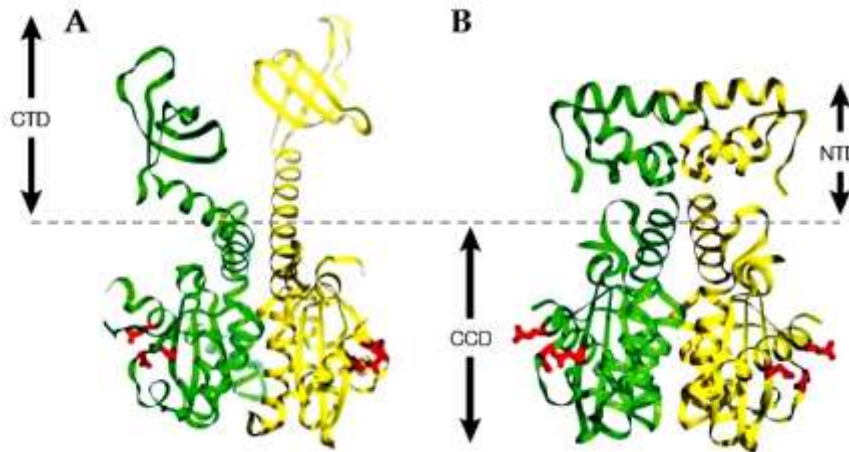


Figura 11: A vermelho está representada a tríade catalítica (motivo DDE) no domínio CCD. Estão exibidas duas subunidades diméricas, uma amarelo e outra verde. A imagem A mostra o dímero CCD-CTD, a imagem B revela o dímero NTD-CCD. (Adaptado: Pommier 2010)

Tanto o processamento 3' como a reação de transferência de cadeias requerem um cofator metálico que poderá ser o Mg^{2+} ou o Mn^{2+} . No entanto, existem evidências experimentais que demonstram que o íon Mg^{2+} é fisiologicamente mais relevante e oferece uma maior especificidade em algumas reações, o que leva a acreditar que este será o cofator mais provável *in vivo*. Assim pode-se diferenciar o que acontece na presença de um cofator ou de outro, por exemplo: (i) a integrase exibe uma atividade mais forte nuclease não específica na presença de Mn^{2+} ; (ii) a tolerância a variações na sequência nucleotídica nas extremidades do ADN viral é muito maior na presença de Mn^{2+} do que na presença de Mg^{2+} ; (iii) muitas mutações na integrase permanecem em silêncio na presença de Mn^{2+} mas o mesmo não acontece na presença de Mg^{2+} . Por exemplo, mutações no motivo HHCC afetam o processamento 3' e a integração nos testes *in vitro* que utilizam o Mg^{2+} como cofator não ocorrendo o mesmo nos testes onde se utilizou Mn^{2+} como cofator. Além disso, o zinco não tem um efeito estimulante sobre

a atividade da integrase quando se utiliza Mn^{2+} como cofator, enquanto que estimula a atividade na presença de Mg^{2+} (Delelis et al., 2008).

O domínio NTD é a região preferencial para a ligação de dois fatores de transcrição celular INI1 e o LEDGF/p75 durante a formação do PIC (Pommier et al., 2005).

1.10.1 Processo de Integração

A integração do ADN do VIH-1 no ADN célula hospedeira é fundamental para a continuação da infeção. Após a transcrição reversa do ARN genómico do VIH-1, o ADN de cadeia dupla resultante serve de substrato a duas reações catalisadas pela integrase (Arts & Hazuda, 2012).

No citoplasma, a integrase reconhece sequências específicas nos terminais longos de repetição (LTR) do ADN viral que são compostos por três regiões: U3-R-U5 (Engelman & Cherepanov, 2014; Fikkert et al., 2003; Freed, 2001), que se encontram adjacentes às extremidades 5' e 3' (U5 e U3, respetivamente) (Engelman & Cherepanov, 2014). Mutações nesta sequência anulam completamente a atividade da integrase (Delelis et al., 2008). Existe uma duplicação de U3 e U5 durante a transcrição reversa de modo a que o ADN contenha uma cópia de 5'-U3RU5-3' em ambas as extremidades (Engelman & Cherepanov, 2014). Ocorre, assim, a ligação da integrase à região LTR de cada extremidade do ADN viral. Posteriormente ocorre o processamento 3' a partir da extremidade 3' da sequência LTR U3 e U5, a integrase catalisa uma clivagem endonucleotídica dos dinucleótidos 3'-GT adjacentes a dinucleótidos altamente conservados CA, criando extremidades 3'OH livres, figura 12 (Dayer, 2016; Delelis et al., 2008; M. D. Andrade, 2015; Métifiot et al., 2010; Pommier et al., 2005).

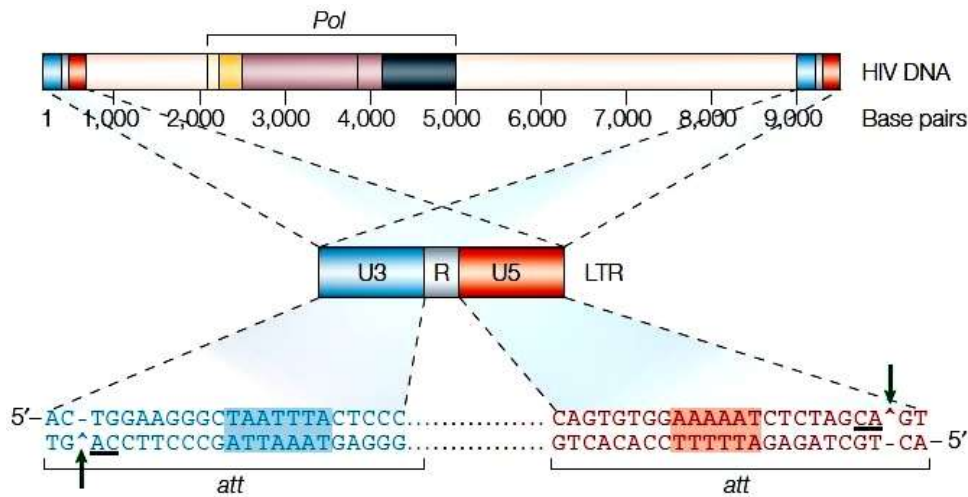


Figura 12: Terminais longos de repetição (LTR) em ambas as extremidades do ADN viral. Consistem em três elementos consecutivos, U3-R-U5, repetidos na mesma orientação. A sequência na extremidade U3 (azul) e U5 (vermelha) repete-se nas extremidades do ADN viral após a transcrição reversa. A integração requer as sequências corretas em ambas as extremidades do ADN proviral (*att* sites). O processamento 3' catalisa a remoção (setas verticais verdes) na extremidade 3' do ADN viral do dinucleótipo CA (sublinhado), gerando desse modo dois dinucleótidos (5'-GT) (um de cada extremidade 3' viral) e extremidades 3'-OH reativas. (Pommier, 2005)

O processamento 3' corresponde a um ataque nucleófilo por uma molécula de água (Delelis et al., 2008; Métifiot et al., 2010). Embora, existam outros agentes nucleófilos, estes conduzem a uma clivagem endonucleotídica não específica. Portanto, usando uma molécula de água como agente nucleófilo juntamente com o cofator Mg^{2+} aumenta-se a especificidade da clivagem (Delelis et al., 2008). Após o processamento 3', ocorre a entrada do PIC para o núcleo, figura 13. O PIC é composto por ADN linear, proteínas virais como a IN, RT, CA, matriz (MA), proteína viral R (Vpr) e por outras proteínas celulares. A IN também parece desempenhar um papel importante no transporte nuclear do PIC juntamente com outras proteínas virais e celulares (Grandgenett et al., 2015; M. D. Andrade, 2015; Métifiot et al., 2010).

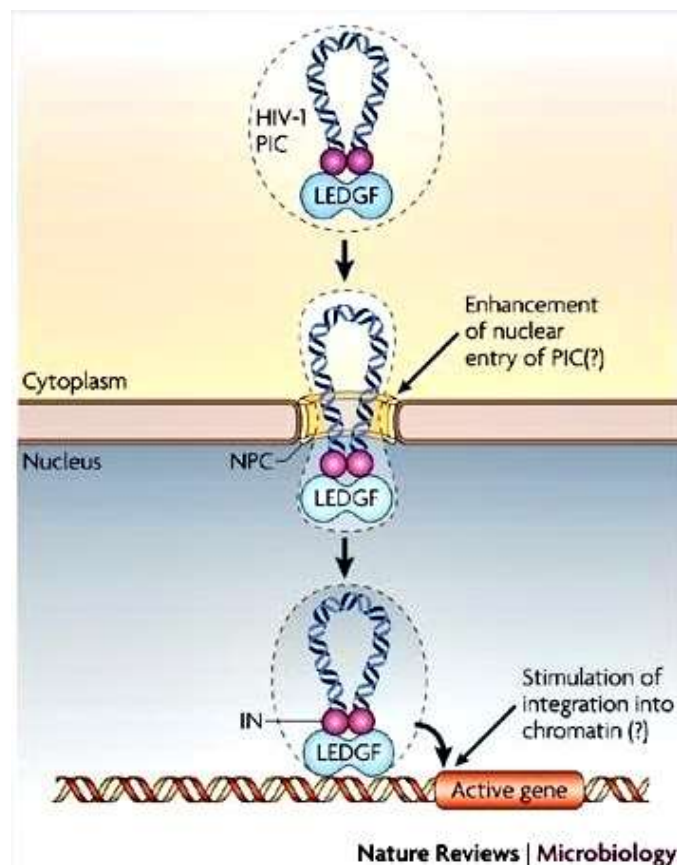


Figura 13: Entrada do PIC no núcleo

(Adaptado de: http://www.nature.com/nrmicro/journal/v5/n3/fig_tab/nrmicro1579_F4.html)

A clivagem do ADN é utilizada como substrato para se realizar a reação de transferência de cadeia, em que ocorre a inserção covalente do ADN viral no genoma da célula infetada. Após a entrada do PIC no núcleo, a integrase utiliza as extremidades 3'OH livres como substrato para que ocorra uma única etapa de transesterificação que envolve um ataque nucleófilo e conseqüentemente a rutura de uma ligação fosfodiéster no ADN da célula hospedeira, separadas por cinco pares de bases sendo as extremidades 3'-OH do ADN viral (geradas pelo processamento 3') ligadas às extremidades 5'P da célula hospedeira. Desta reação surgem duas bases nas extremidades 5' do ADN viral e dois segmentos de cadeia simples, com 5pb cada, presentes nas extremidades do local de integração, figura 14. (A. Engelman, 2013; Arts & Hazuda, 2012; Blanco, Whitlock, Milinkovic, & Moyle, 2015; Dayer, 2016; Delelis et al., 2008; Grandgenett et al., 2015; Krishnan & Engelman, 2012; M. D. Andrade, 2015; Métifiot et al., 2010; Pommier et al., 2005).

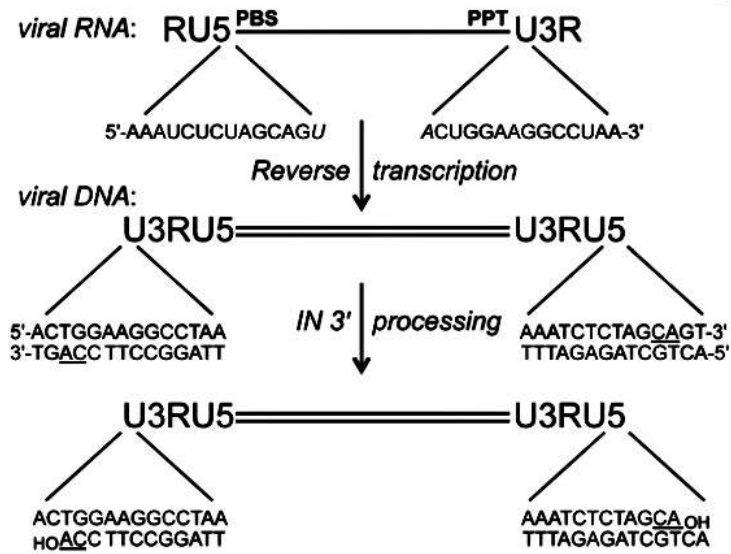


Figura 14: Formação de uma dupla cadeia linear de ADN, por transcrição reversa, com U3RU5 terminais longos de repetição. A posição do dinucleótido CA na extremidade 3' determina que o processamento 3' é necessário para a formação das extremidades 3'-CAOH no ADN viral. (Engelman, 2014)

Por fim, ocorre a etapa final que consiste na reparação do ADN através da remoção dos nucleótidos não emparelhados na extremidade 5', seguida do preenchimento das duas regiões de cadeia simples com nucleótidos complementares através da duplicação de cinco bases do ADN celular de cada extremidade. Conjuntamente, a reposição das ligações fosfodiéster anteriormente destruídas permitem a duplicação da região alvo da integração. Todo este processo requer a ação de proteínas de reparação celular, figura 15 (Métifiot et al., 2010; Pommier et al., 2005).

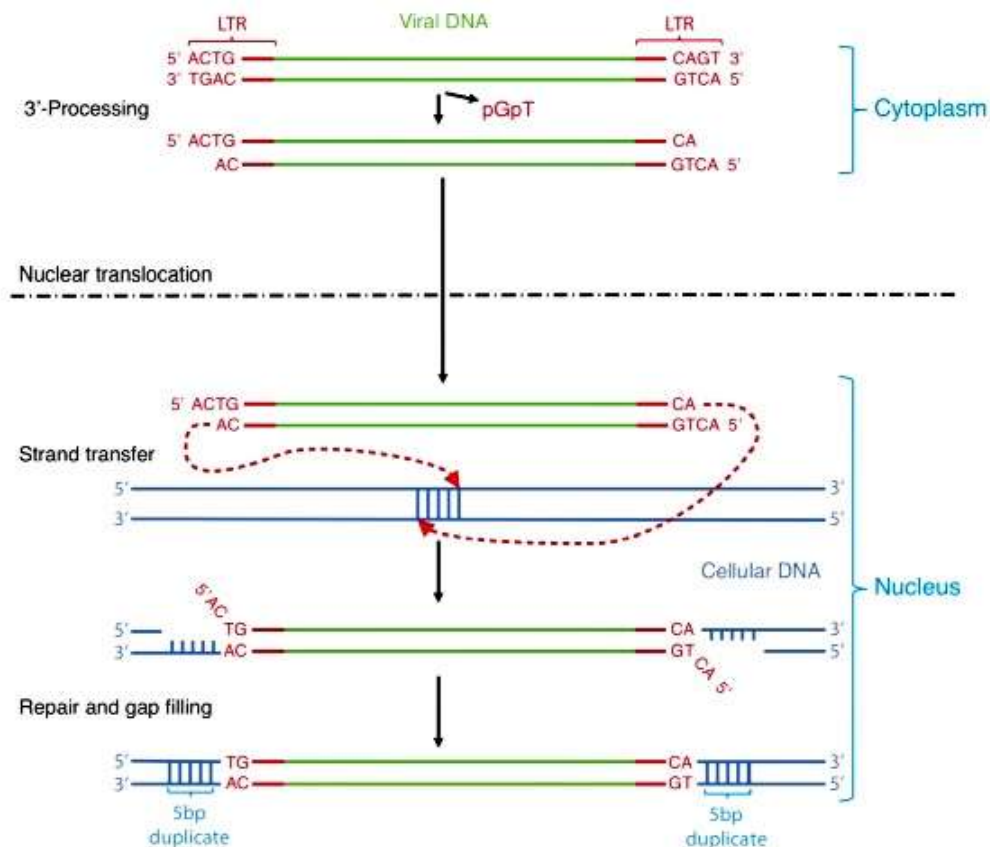


Figura 15: Processo de integração (Métifiot, 2010)

Assim, no processo de integração retroviral do VIH-1 podem-se identificar várias etapas, constituindo cada uma delas um potencial alvo terapêutico (Lataillade et al., 2007):

- (1) – Formação de um complexo estável entre a integrase e sequências específicas do ADN viral ao nível das LTR
- (2) – Processamento 3'
- (3) – Translocação do complexo de pré-integração (PIC)
- (4) – Reação de transferência de cadeia
- (5) – Reparação do ADN

1.10.2 Inibidores da integrase InSTIs

Os inibidores da enzima integrase do VIH-1 representam, assim, um dos avanços mais importantes e mais recentes no tratamento da infeção por este vírus. Esta classe de

fármacos tem características clínicas muito favoráveis: elevada potência antiviral com uma rápida diminuição de ARN viral (carga viral), boa tolerância, bom perfil de segurança e reduzidas interações farmacológicas significativas devido ao seu mecanismo de ação. Consequentemente ainda não foi identificada resistência cruzada com outras classes de fármacos (Blanco et al., 2015).

Diversos modelos de inibidores da integrase que atuam em etapas distintas do processo de integração foram estudados, tais como: os ácidos diceto (L-708,906; L-731,988; S-1360) ou compostos que contenham este ácido como o 5-CITEP, assim como os protótipos L870,810 e L-CA inibem a reação de transferência de cadeia, o FZ41 inibe o processamento 3' e o V-165 é responsável pela inibição da ligação da IN ao ADN. Embora diferentes fármacos fossem investigados apenas três conseguiram ser aprovados pela FDA, o Raltegravir (MK-0518), o Elvitegravir (GS-9137) e o Dolutegravir (MK-2048). Este último, aprovado mais recentemente, pertence a uma segunda geração de inibidores da integrase, embora todos atuem da mesma forma, por inibição da reação de transferência de cadeia (Grandgenett et al., 2015; Lataillade et al., 2007).

Os inibidores da transferência de cadeia interagem com o local ativo da IN e com as extremidades LTR no processamento 3' no PIC citoplasmático. Desta forma, a inativação do complexo previne a integração no ADN celular (Grandgenett et al., 2015).

Os fármacos atualmente disponíveis e que pertencem aos inibidores da integrase (InSTIs) têm como alvo a reação de transferência de cadeia e, por isso, podem ser designados por inibidores de transferência de cadeia da integrase (InSTIs) (Arts & Hazuda, 2012).

Na transferência de cadeia, os inibidores da integrase ligam-se ao domínio do centro catalítico da enzima e competem pela ligação com o ADN do hospedeiro (Grandgenett et al., 2015; Engelman & Cherepanov, 2014; Messiaen et al., 2013).

O mecanismo de ação dos InSTIs passa por uma etapa que consiste na ligação de um complexo específico entre a integrase e o ADN viral e outra onde ocorre uma interação com dois íons metálicos Mg^{2+} , que são cofatores essenciais, no local ativo da integrase e no ADN. Portanto, todos os InSTIs envolvem duas etapas essenciais: um farmacóforo de diceto ácido dos InSTIs liga-se ao íon metálico bivalente, no local ativo

da IN, removendo os magnésios deste local, e um grupo hidrofóbico, que interage com o ADN viral, assim como, com a enzima no complexo. Estes inibidores de transferência de cadeia são inibidores interfaciais, uma vez que se ligam num local ao nível da interface de duas (ou mais) moléculas unidas entre si formando um complexo funcional. No caso dos inibidores da reação de transferência de cadeia a interface é formada pelos nucleótidos CA da extremidade do ADN viral e por resíduos específicos da IN (Arts & Hazuda, 2012; Grandgenett et al., 2015).

Em 2007, foi aprovado pela FDA o primeiro inibidor da integrase, o Raltegravir (fig 16) (RAL, Isentress® também conhecido como MK-0518). Como os diceto ácidos, o mecanismo de inibição do RAL é específico para o passo de transferência de cadeia durante o processo de integração, envolvendo uma quelação de um ou dois metais no local ativo da IN após o processo de ligação das extremidades do ADN viral (Arts & Hazuda, 2012; Engelman & Cherepanov, 2014; Grandgenett et al., 2015; Messiaen et al., 2013; Métifiot et al., 2010) .

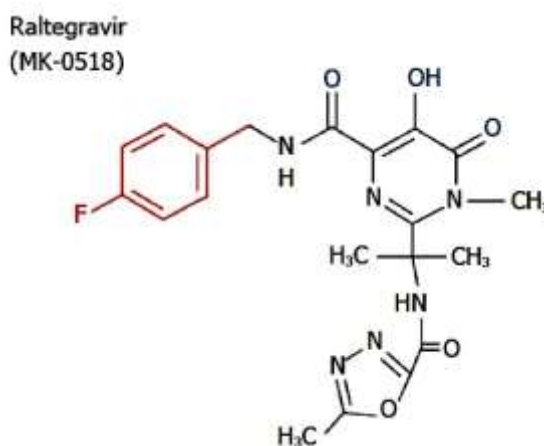


Figura 16: Raltegravir (Grandgenett, 2015)

A ligação do RAL induz uma deslocação do ADN viral dentro do local ativo da IN, movendo a extremidade 3'-A dos nucleótidos conservados CA. O RAL também estabelece interações Van Der Waals (VDW) com o dinucleótido CA e a quarta guanina da extremidade da cadeia não clivada (pb com o C conservado), figura 17 (Métifiot et al., 2010).

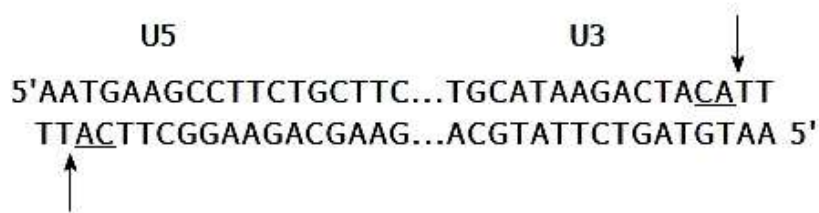


Figura 17: Dinucleótidos CA e a 4ª guanina (Grandgenett, 2015)

Adicionalmente, o RAL também se liga aos aminoácidos P145 e Q146 através de ligações van der waals. Com o P145 por interações hidrofóbicas e com o Y143 por interações *stacking*. O RAL também forma interações polares com a tríade catalítica (DDE) e com os dois Mg^{2+} . Este modo de ligação é consistente com o paradigma da inibição interfacial, segundo o qual este fármaco foi proposto para se ligar na interface da IN e ao seu substrato de ADN na sequência 3'-P (Métifiot et al., 2010).

Ammar (2016) e seus colaboradores concluíram que o substrato de ADN viral é o primeiro local de ligação dos InSTIs, através da descoberta de uma boa correlação entre a afinidade destes inibidores para a ligação ao ADN viral processado e a sua eficácia na inibição do processo de transferência de cadeia. O sucesso do RAL deve-se ao facto de “encaixar na cavidade” aberta pelo processamento 3' (3'-Pr) na extremidade do ADN viral, onde os inibidores partilham fortes interações electrostáticas com os iões Mg^{2+} e forças Van der Waals com os átomos dos nucleótidos do ADN, essenciais para o sucesso das reações de transferência de cadeia. O complexo 3'Pr- Mg^{2+} é, em si, um local de alta especificidade para a ligação do RAL (Ammar et al., 2016).

Posteriormente à aprovação do RAL, surge o Elvitegravir (EVG, GS-9137, JTK-303), que é mais potente que o primeiro, embora necessite da co-utilização de um potenciador, o cobicistat, figura 18 (Grandgenett et al., 2015; Métifiot et al., 2010). Contudo, este apresenta alguma toxicidade não específica em células não infetadas. (Métifiot et al., 2010). A sua co-administração com cobicistat aumenta a concentração sistémica de EVG, o que permite uma única toma diária deste fármaco (Mesplède & Wainberg, 2015).

Elvitegravir
(GS-9137/JTK-303)

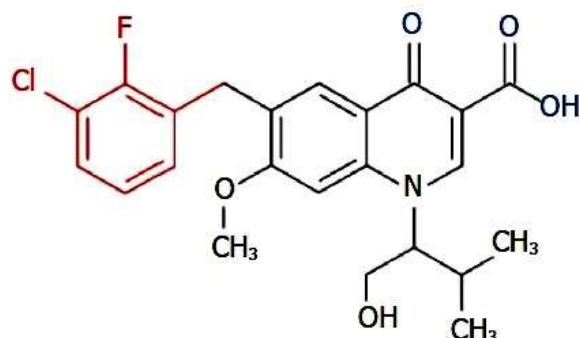


Figura 18: Elvitegravir (Grandgenett, 2015)

De um modo similar ao RAL, o EVG liga-se como um inibidor interfacial no centro catalítico da IN. Estabelece interações van der Waals com os nucleótidos CA e a quarta guanina da extremidade 3' da cadeia não clivada e induz um deslocamento do ADN viral (Métifiot et al., 2010).

Relativamente às interações fármaco-proteína, o EVG exibe interações mais próximas com o aminoácido P145. A comparação das estruturas cristalinas do RAL e do EVG mostra que o Y143, que mantém interações *stacking* fortes com o anel oxadiazol do RAL, não apresenta interações fortes com o EVG (Métifiot et al., 2010).

O Dolutegravir (DTG, GSK-1349572) foi o último inibidor da integrase a ficar disponível, tendo sido aprovado pela FDA apenas em 2013, figura 19. Este fármaco é ativo contra as estirpes virais resistentes ao RAL e ao EVG causadas pela presença de mutações na região da IN. A inibição por ação deste fármaco envolve a quelação de íons bivalentes dentro do local ativo, através da ligação dos dois cátions metálicos ao inibidor, tal como no RAL e no EVG (Grandgenett et al., 2015; Métifiot et al., 2010). Este fármaco também demonstrou ter uma elevada eficácia, reduzidos efeitos adversos, uma elevada barreira genética e um bom perfil de segurança (Andany & Walmsley, 2016; Fernández-Caballero et al., 2016).

Dolutegravir
(S/GSK 1349572)

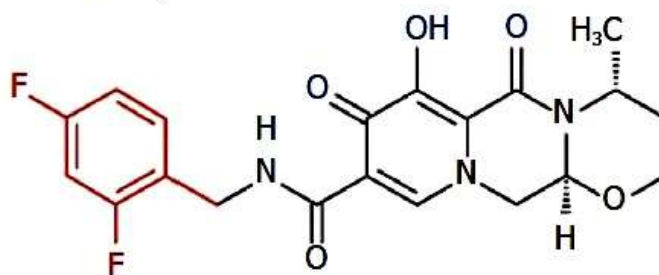


Figura 19: Dolutegravir (Grandgenett, 2015)

1.10.3 Caracterização de mutações associadas à resistência

Existem dois tipos de mutações: as primárias (*major mutations*) e as secundárias (*minor mutations*). As primeiras reduzem por si só a suscetibilidade aos antirretrovirais apresentando uma determinada especificidade em relação aos fármacos, ou seja, uma mesma mutação pode ser considerada para um determinado fármaco como principal e para outro como secundária. Contrariamente, as mutações secundárias não conferem níveis significativos de resistência aos fármacos quando presentes isoladamente, apenas reduzem a suscetibilidade aos fármacos de um modo significativo em presença de mutações principais de resistência, uma vez que contribuem para a melhoria da capacidade do vírus em se adaptar e replicar, o chamado *fitness* viral (Blanco et al., 2015; Shafer, 2002).

Os antirretrovirais podem ser classificados com base na sua barreira genética, ou seja, um fármaco de baixa barreira genética é um fármaco em que o aparecimento de resistência é fácil, basta uma alteração genética (1 mutação) e ocorre resistência de alto grau ao fármaco. Como se verifica, para o RAL e para o EVG (Han et al., 2016). Por sua vez, um fármaco com alta barreira genética, necessita da acumulação de várias mutações (3 ou mais mutações), para que ocorra resistência de alto grau.

1.10.4 Mutações associadas à resistência aos inibidores da integrase

Segundo a IAS-USA, as mutações que contribuem para a resistência aos inibidores da integrase (Figura 7) agrupam-se em combinações específicas de mutações

principais (selecionadas, em primeiro lugar, na presença do inibidor e normalmente associadas a decréscimos significativos na suscetibilidade viral) e mutações acessórias (Wensing et al., 2015).

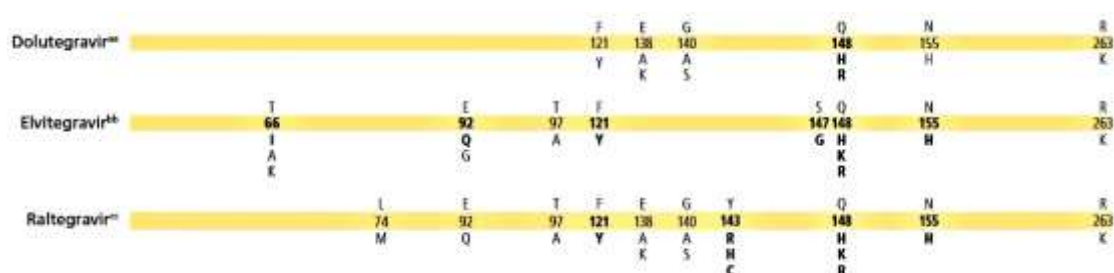


Figura 20: Mutações que contribuem para a resistência aos inibidores da integrase, segundo a IAS-USA (Annemarie, 2014; Internacional Antiviral Society – USA, Disponível em: <http://www.iasusa.org/>).

Algumas mutações acessórias como a L74I, T97A, E138K, V151I, G163R, V165I, V201I, I203M e T206S ocorrem como polimorfismos naturais e podem influenciar a taxa de desenvolvimento de resistências nos vírus que contenham estas mutações quando se inicia terapêutica com inibidores da IN (Han et al., 2016; Mbisa, Martin, & Cane, 2011).

A resistência aos InSTIs surge a partir de uma seleção de variantes virais com mutações genéticas que levam à alteração do alvo enzimático, seja por alteração conformacional no DC da enzima ou por perturbações na coordenação dos íons metálicos (Mg^{2+}) resultando numa reduzida afinidade do inibidor para o seu alvo terapêutico, a integrase (Arts & Hazuda, 2012; Lataillade et al., 2007).

As mutações no gene da integrase, responsáveis pela resistência ao RAL, são definidas como mutações primárias: Y143, N155 e Q148 (Han et al., 2016). Por esta razão este fármaco é considerado ter baixa barreira genética, figura 21. Estas mutações primárias estão normalmente associadas a mutações secundárias específicas (Casadellà et al., 2015).

À mutação N155(H) associam-se as mutações E92Q, V151L, T97A, G163R e L74M. As associações da mutação Q148(K/R/H) são as mutações G140S/A e E138K que são as mais comuns (Arts & Hazuda, 2012; Blanco et al., 2015; Casadellà et al., 2015; Mesplède & Wainberg, 2015; M. A. Wainberg et al., 2016).

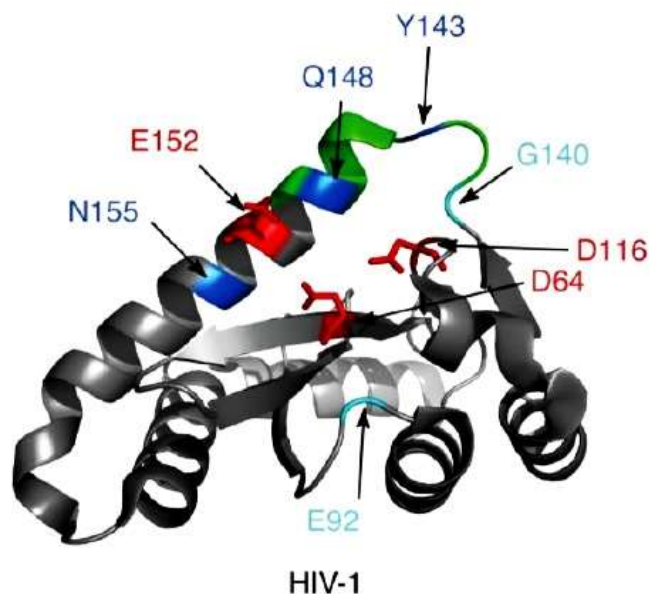


Figura 21: Mutações que contribuem para a resistência ao RAL

A falência ao ELV está maioritariamente relacionada com as mutações T66I, S147G, T97A e também com as mutações que provocam resistência ao RAL (E92Q, Q148 R/H/K e N155H) (Han et al., 2016; Malet et al., 2015). A exposição ao EVG induz o aparecimento de mutações secundárias como H51Y, T66A/K, V72I, Q95K, E138K, G140 C/S, E157Q, S230R, L68I/V, S119R/G, S153Y, K160N, R166S, E170A e R263K. O fator de resistência induzida pela dupla mutação G140S-Q148H é maior com EVG que com RAL (Canducci et al., 2011; Métifiot et al., 2010; Varadarajan et al., 2016). Existe resistência cruzada entre o RAL e o ELV porque as mutações acabam por acontecer nos mesmos codões (155 e 148) para os dois fármacos (Han et al., 2016; Malet et al., 2015; M. A. Wainberg et al., 2016), ou seja, o doente adquire resistência a um fármaco após a sua utilização gerando, simultaneamente, resistência a um outro fármaco, do mesmo grupo, ao qual nunca esteve exposto.

Quando cessa o tratamento com RAL ou EVG as mutações de resistência depressa desaparecem, demonstrando que têm um grande impacto no *fitness* do vírus, não esquecendo, no entanto, que se mantêm como populações minoritárias e que, caso o fármaco seja de novo introduzido, as mutações voltam a surgir rapidamente por ação da pressão farmacológica. As mutações primárias são frequentemente acompanhadas por uma ou mais mutações secundárias específicas, de modo a aumentar a resistência ou restaurar a *fitness* viral ou ambos (Mbisa et al., 2011).

O DTG pertence a uma segunda geração de inibidores da integrase revelando uma barreira genética muito superior à do RAL e à do ELV (Hardy et al., 2015a; M. A. Wainberg et al., 2016).

As mutações envolvidas na resistência ao DTG têm ocorrido nas posições F121, S153, G118, E138 e R263 (M. A. Wainberg et al., 2016; M. a Wainberg, Mesplède, & Quashie, 2012). Acresce ainda o facto de as mutações até agora descritas para o DTG não cruzarem com os InSTIs de primeira geração.

A associação da mutação H51Y com a mutação primária R263K aumenta a resistência ao DTG. Também se verificou, noutros estudos, que a combinação da R263K com a M50I, G118R, T66I, N155H ou M184I/V aumentam ligeiramente a resistência ao DTG mas não restabelecem a capacidade de replicação viral (M. A. Wainberg et al., 2016). Embora a mutação R263K confira uma baixa resistência ao DTG, esta reduz significativamente a infeção viral porque afeta a capacidade de replicação do vírus (*fitness* viral), impedindo a progressão da replicação viral (Llibre et al., 2014).

O DTG é eficaz na presença da maioria das mutações que conferem resistência ao RAL e ao EVG, como a N155, Y143, T66 e E92Q, exceto na presença da mutação Q148 em que este fármaco não consegue atuar de uma forma eficaz, principalmente, quando a esta mutação se associa, pelo menos uma das seguintes mutações: G140SAC, L74I e E138AKT (Hardy et al., 2015b; Malet et al., 2015). Esta mutação cumulativamente com outras que têm maior impacto numa terapêutica com DTG reduzem a sua eficácia, por isso, este fármaco é recomendado a doentes resistentes ao RAL e ao EVG que não possuam a mutação Q148K/R/H associada a duas ou mais mutações secundárias (Han et al., 2016; Hardy et al., 2015a).

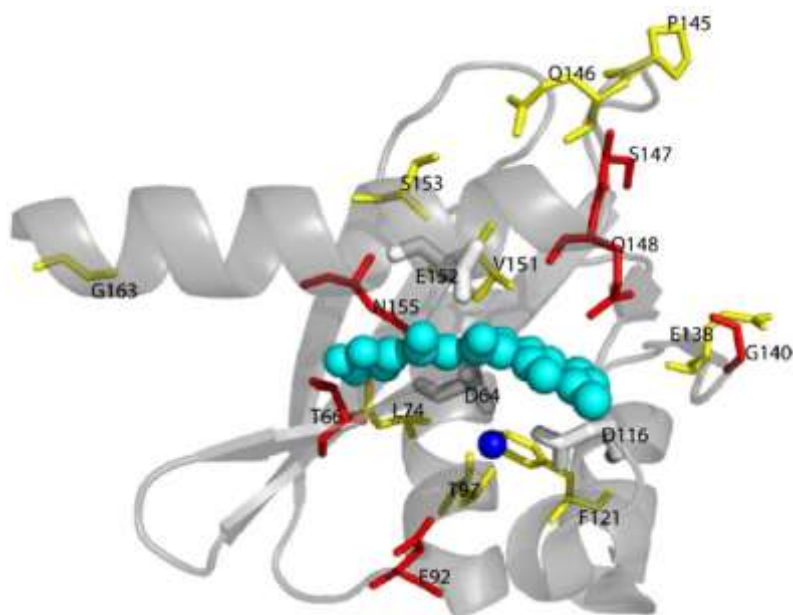


Figura 22: Mutações no domínio CCD que conferem resistência aos inibidores da integrase (Blanco, 2015)

Embora, existam mutações de resistência na integrase, os três InSTIs comercialmente disponíveis, são altamente eficazes no tratamento de pacientes naïve assim como de pacientes que já fizeram previamente tratamento com antirretrovirais de outras classes e possuem múltiplas resistências a estes fármacos (Han et al., 2016).

2. Objetivos

Os objetivos principais deste estudo consistiam em:

- Identificar as mutações de resistência aos inibidores da integrase em doentes infetados por VIH-1, em falência virológica sob regimes terapêuticos com inibidores da integrase.
- Determinar a prevalência de cada mutação (isolada ou em associação) na população estudada;
- Determinar se existe correlação entre o género e a presença ou ausência de resistência;
- Identificar se existe correlação entre os subtipos VIH e o padrão de resistência aos inibidores da integrase;
- Relacionar a presença de mutações com os diferentes regimes terapêuticos.

3. Materiais e Métodos

No laboratório de biologia molecular do Hospital Egas Moniz, não procedi à realização do protocolo, apenas acompanhei todo o processo, desde a extração do ARN viral, à obtenção das sequências de ADNc para melhor compreender cada etapa, pois o conjunto de todas estas etapas permitiram chegar à informação necessária para a concretização deste estudo. Passo a explicar o processo pelo qual se obtêm as sequências que detetam as resistências aos inibidores da integrase, a partir das amostras de sangue dos doentes.

3.1 População

Entre 2009 e 2016, analisou-se retrospectivamente o perfil de resistência aos inibidores da integrase de sequências pertencentes a vírus de 367 indivíduos infetados com VIH-1 e que fizeram esquemas terapêuticos que incluíam inibidores da integrase - 213 (58%) indivíduos do sexo masculino e 154 (42%) do sexo feminino. A idade dos indivíduos variou entre os 7 e os 83 anos, sendo a média das idades aproximadamente a 47.

3.2 Métodos

3.2.1 Extração do ARN viral

Extrair o ARN viral do VIH-1, a partir do plasma dos doentes, recorrendo ao sistema automatizado Nuclisens[®] easyMag[®] (BioMérieux), cujo princípio se baseia em duas etapas. A primeira etapa é a lise viral e a segunda é a purificação dos ácidos nucleicos. Como se pode ver na fig. 23, inicialmente, os ácidos nucleicos são capturados por partículas magnéticas de sílica, durante a incubação das amostras lisadas (A). De seguida, o dispositivo magnético Nuclisens[®] easyMag[®] atrai toda a sílica magnética, permitindo que o sistema purifique os ácidos nucleicos através de lavagens sucessivas (B). Segue-se um período de aquecimento que possibilita a libertação dos ácidos nucleicos da sílica (C). Por fim, as partículas magnéticas de sílica são separadas a partir do eluído através do dispositivo magnético (D).

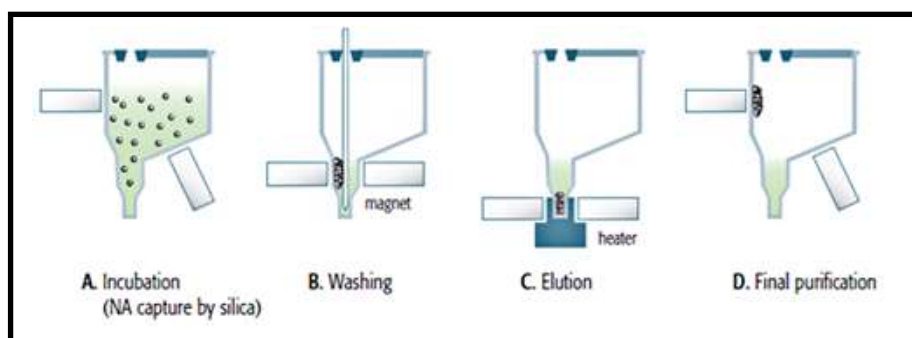


Figura 23: Procedimento equipamento automático Nuclisens[®] easyMag[®] (BioMérieux) para extração de ácidos nucleicos. A - Incubação, B – Lavagem. C – Eluição. D – Purificação final.

3.2.2 Amplificação da região da integrase

Realizar transcrição reversa para converter o ARN em ADNc com intervenção da enzima transcriptase reversa (RT), responsável pela produção de uma cadeia única de ADNc a partir do ARN viral. De seguida, realizar uma *Polimerase Chain Reaction* (PCR). A RT e a PCR realizam-se num passo único (RT-PCR). Amplificar segundo o protocolo do kit ViroSeq[™] VIH-1 Integrase Genotyping Kit (Celera).

Preparar a RT-PCR master mix numa área de pré-amplificação e de acordo com os dados enumerados na tabela 1.

Tabela 1: RT-PCR master mix para uma amostra

Reagente	Volume para uma reacção (µL)
RT-PCR Submix	36
RT-PCR Enzyme Mix	2.0
UNG, heat-labile	1.0
ARNse Inhibitor	1.0
Volume total	40.0

Master mix:

RT-PCR Submix: tampão Tris/KLC/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ com DTT e MgCl_2 , <0,1% dATP, dCTP, dGTP, dTTP, dUTP, oligonucleótidos sintéticos não infecciosos de VIH-1.

RT-PCR Enzyme Mix: transcriptase reversa *Omniscript* e *Sensiscip*, taq ADN polymerase HotStar.

UNG, Heat Labile: ≥ 1 U/ μL Uracil-ADN Glicosilase termo-lábil em 50% de glicerol.

ARNse Inhibitor: 20 U/ μL inibidor da ARNse em 50% de glicerol.

Manter todas as enzimas entre 2 a 8°C ou no gelo durante a preparação da master mix. Conservar a master mix preparada à temperatura ambiente. Adicionar 40 μL da RT-PCR master mix a cada poço da placa de reação ou tubo de reação. De seguida, adicionar 10 μL do ARN extraído aos tubos de reação. Fechar os tubos. Homogeneizar no vórtex, e centrifugar. Programar os ciclos de amplificação no termociclador e iniciar de acordo com o descrito na tabela 2.

Tabela 2: Ciclos de amplificação da RT-PCR da integrase

Fase	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Número de ciclos
UNG	20	10:00	-
Transcrição reversa	55	30:00	-
Ativação da PCR	95	15:00	-
Desnaturação	94	00:15	
Emparelhamento	55	00:30	45
Extensão	68	01:30	
Extensão	68	7:00	-
Manter	4	Manter	-

3.2.3 Quantificação dos produtos da RT-PCR

Descongelar o marcador de peso molecular ADN e colocar o tampão “Loading Buffer” à temperatura ambiente (15°C – 25°C). De seguida preparar o gel de agarose a

1% usando TBE 1X com 0,5 µg/mL de GelRed. Cada amostra, deverá conter, 5 µL *Loading buffer* com 5 µL de produto PCR não purificado. Na posição 1 e 2 do gel adicionar 6 µL e 3 µL, respectivamente, de marcador de peso molecular. Nas restantes posições adicionar 10 µL de cada amostra. A eletroforese realiza-se a 10 V/cm até que o bromofenol tenha migrado pelo menos 5 cm no gel de agarose. Analisar o gel no transiluminador. Por fim, avaliar a quantidade dos produtos de PCR em cada amostra por comparação da intensidade de cada banda com a intensidade das bandas do marcador de acordo com a tabela 3.

Tabela 3: Tabela de referência para a quantificação dos produtos RT-PCR

Bandas do marcador de peso molecular	Tamanho (Kb)	Linha 6 µL (ng)	Linha 3 µL (ng)
Primeira	2,0	100	50
Segunda	1,2	60	30
Terceira	0,8	40	20

3.2.4 Protocolo de purificação – Exosap

Manter o reagente PCR cleanup no gelo e adicionar 3 µL deste reagente a cada tubo que contém 5 µL de produto do RT-PCR. Fechar os tubos. Homogeneizar no vortéx. Programar o ciclo de acordo com a tabela 4.

Tabela 4: Tempos usados na purificação

Temperatura (°C)	Tempo (min)
37	15:00
80	15:00
4	Manter

Transferir 10 µL do produto de RT-PCR purificado para um novo tubo. Diluir o produto de PCR purificado com água destilada de acordo com a tabela 5, antes de prosseguir com o ciclo de sequenciação.

Tabela 5: Valores de diluição para produtos de RT-PCR purificados

Intensidade da banda	Diluição
>20 ng	1:10 (10µL de produto purificado e 90 µL de água destilada)
20 ng	1:4 (10µL de produto purificado e 30 µL de água destilada)

Homogeneizar cada amostra diluída no vórtex, durante 3 a 5 segundos e depois fazer uma breve centrifugação.

3.2.5 Ciclo de sequenciação e purificação

Descongelar, à temperatura ambiente e protegidos da luz, os quatro *primers* de sequenciação, VIH Int SEQ Mix A, VIH Int SEQ Mix B, VIH Int SEQ Mix C, VIH Int SEQ Mix D, formados por uma mistura de BigDye[®] Terminator Ready Reaction Mix e oligonucleótidos. Depois, adicionar 12 µL de cada *primer* a 8 µL de produto purificado e diluído, selar a placa e fazer uma breve centrifugação. Por último, efetuar os ciclos de sequenciação de acordo com os parâmetros da tabela 6.

Tabela 6: Ciclos utilizados na amplificação do gene da integrase

Temperatura (°C)	Duração	Número de ciclos
96	00:10	
50	00:05	25
60	4:00	
4	Manter	-

3.2.6 Purificação da sequência com etanol e acetato de sódio

Preparar uma solução de acetato de sódio/etanol (2 µL de acetato de sódio 3,0M e pH 5,2 + 50 µL de etanol 100%). Adicionar 52 µL desta solução a cada reação de sequenciação. Selar as placas e homogeneizar no vórtex ou invertendo três vezes. De

seguida centrifugar a 2000 rpm durante 20 minutos, e assim que esta acabar, destapar sem perturbar os pellets. Passar imediatamente, um papel absorvente em cima da placa e inverte-la. Voltar a centrifugar 150 rpm durante 1 minuto e adicionar 150 µL de etanol a 70% a cada poço. Centrifugar novamente a 2000 rpm por 5 minutos e voltar a passar um papel absorvente em cima da placa e a inverte-la. Por fim fazer uma última centrifugação, outra vez a 150 rpm durante 1 minuto, e quando esta acabar e a secagem estiver completa, selar as placas e guarda-las no escuro a 15°C-25°C.

3.2.7 Detecção da sequência de ADNc

Ressuspender os produtos purificados do ciclo de sequenciação em 20 µL de formamida Hi-Di a cada placa com amostra. Fechar a placa e homogeneizar no vórtex durante 10-15 segundos e fazer uma breve centrifugação. Preparar e instalar a placa na plataforma do sequenciador para efetuar a deteção das sequências através do ABI Prism[®]3130x / Genetic Analyzer. Editar as sequências, interpretar e trabalhar as sequências obtidas em termos de qualidade, por comparação com a sequência consenso. Guardar as sequências editadas em formato *fasta*.

3.2.8 Análise das sequências obtidas

Carregar numa base de dados – RegaDB – as sequências aptas do ABI Prism[®]3130x / Genetic Analyzer, juntamente com toda a informação clínica de que se dispõe relativamente à amostra/doente. Interpretar a resistência aos inibidores da integrase, através de três algoritmos, REGA (Bélgica), Stanford (E.U.A.) e ANRS (França). Estes algoritmos com pequenas diferenças e com base nas mutações presentes na sequência, fornecem a informação relativamente aos antirretrovirais disponíveis, como suscetível, resistente ou intermédio. Esta informação é fundamental para o clínico que segue o doente e que desta forma pode mais facilmente otimizar um regime terapêutico para cada doente.

Para alcançar o objetivo proposto, foi selecionado um conjunto de 12 mutações associadas a resistência aos InSTIs, que são descritas e atualizadas anualmente pela International Aids Society (IAS) (Internacional Antiviral Society – USA, Disponível

em: <http://www.iasusa.org/>). Após a seleção das mutações foi feita uma pesquisa (*query*) na base de dados Rega DB em que se pretendia obter todas as amostras de doentes a fazer InSTIs. Os dados obtidos por esta pesquisa foram, posteriormente, transferidos para um ficheiro excel. Para cada linha obtida da *query* da base RegaDB foi pesquisado individualmente a presença ou ausência das mutações pertencentes ao grupo das 12 mutações seleccionadas. Foram também introduzidos neste ficheiro o sexo, a idade dos doentes, subtipo do vírus e as classes terapêuticas administradas. Toda a análise foi realizada recorrendo ao excel e ao spss através do teste χ^2 com correção de continuidade de Yates e teste exato de Fisher.

4. Resultados

Neste estudo foram analisadas 367 amostras, isto é, uma amostra por cada doente. Embora, em alguns dos doentes, estivesse disponível mais do que uma amostra, por critério, foi apenas selecionada uma sequência por doente.

Após análise dos dados, verificou-se que os subtipos do VIH-1 encontrados nestes indivíduos são diversos, mas há uma prevalência maior do subtipo G (33%, n=121) e do subtipo B (26%, n=94). Estes dois subtipos correspondem, portanto, a 59% dos indivíduos. Com uma percentagem muito semelhante enquadram-se os que pertencem ao subtipo C (11%, n=39) e ao CRF02_AG (10%, n=38). O subtipo F e A estão representados no mesmo número de indivíduos (24) correspondendo, cada um, a 6% da amostra. Em relação aos outros subtipos, foram considerados todos cuja frequência era igual ou inferior a 7, entre eles estão os subtipos D, CRF06_cpx, CRF14_BG; H; B/G; A/G; CRF01_AE; J; U/A e U/F, gráfico 1.

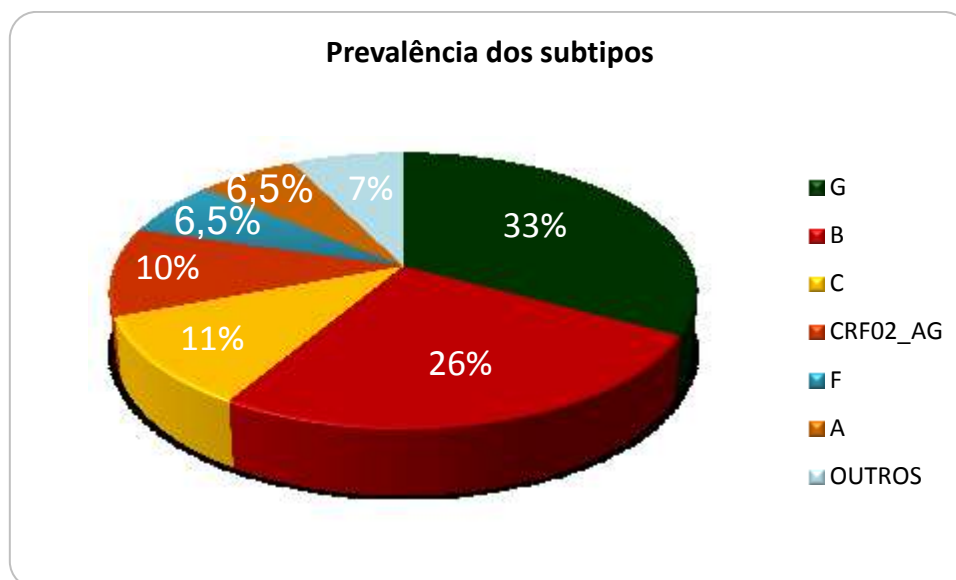


Gráfico 1: Prevalência dos subtipos VIH-1 na população estudada

Das doze mutações associadas a resistência aos inibidores da integrase, descritas pela IAS (Annemarie, 2015), foram encontradas onze nestes indivíduos, nomeadamente:

- T66IAK
- L74M

- E92QG
- T97A
- E138AK
- G140SA
- Y143RHC
- S147G
- Q148HRK
- N155H
- R263K

Relativamente às mutações identificadas, a sua distribuição é variável, sendo a mais frequente a mutação N155H que aparece em 36 indivíduos, seguida da T97A que foi detetada em 32 indivíduos. O terceiro lugar é ocupado por duas mutações, a Y143RHC e a L74M com frequência de 17. Segue-se a R263K com uma frequência de 14, e a Q148HRK e G140SA com frequência de 10. As mutações E92QG, E138AK, S147G e T66IAK, ocorreram, 8, 5, 3, 2, vezes respetivamente, e a mutação F121Y não foi encontrada, conforme está descrito no gráfico 2.

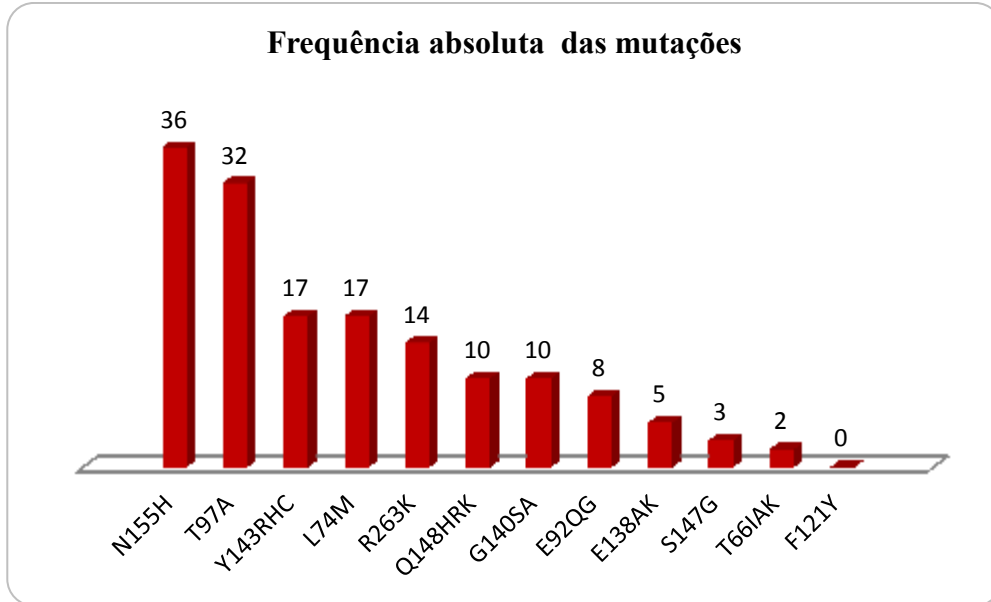


Gráfico 2: Frequência absoluta das mutações

Globalmente, da análise das sequências dos 367 indivíduos 286 (78%) não apresentam mutações de resistência para os InSTIs sendo, por isso, considerados

suscetíveis; 81 (22%) indivíduos apresentam mutações de resistência e foram considerados resistentes aos InSTIs, gráfico3.

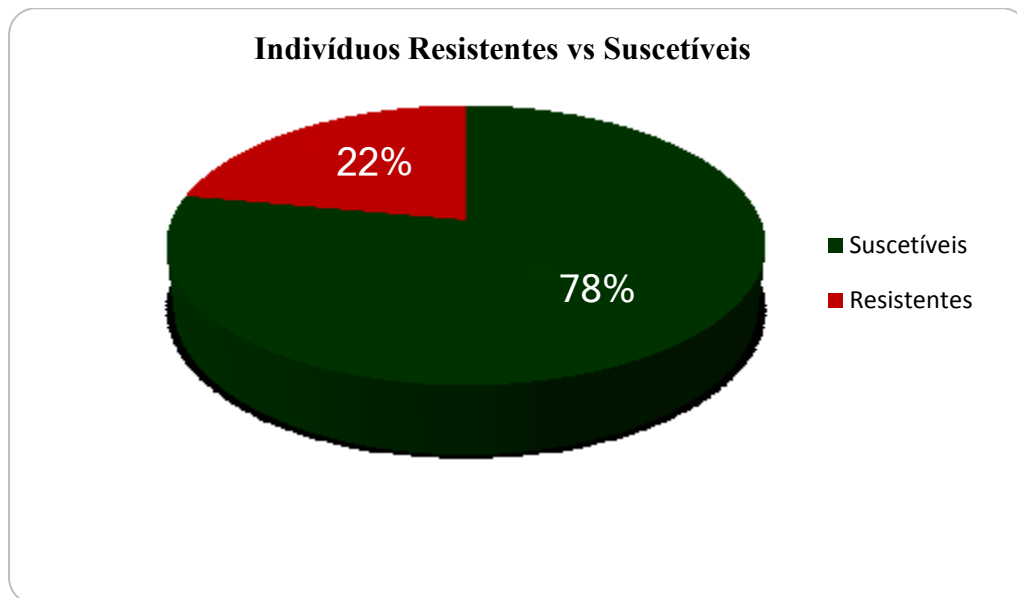


Gráfico 3: Indivíduos Resistentes vs Suscetíveis

Fazendo esta análise por gênero, constatou-se que 24% (n=48) dos indivíduos do sexo masculino apresentam resistência aos InSTIs enquanto que, os restantes 76% (n=165), são suscetíveis conforme revela o gráfico 4.

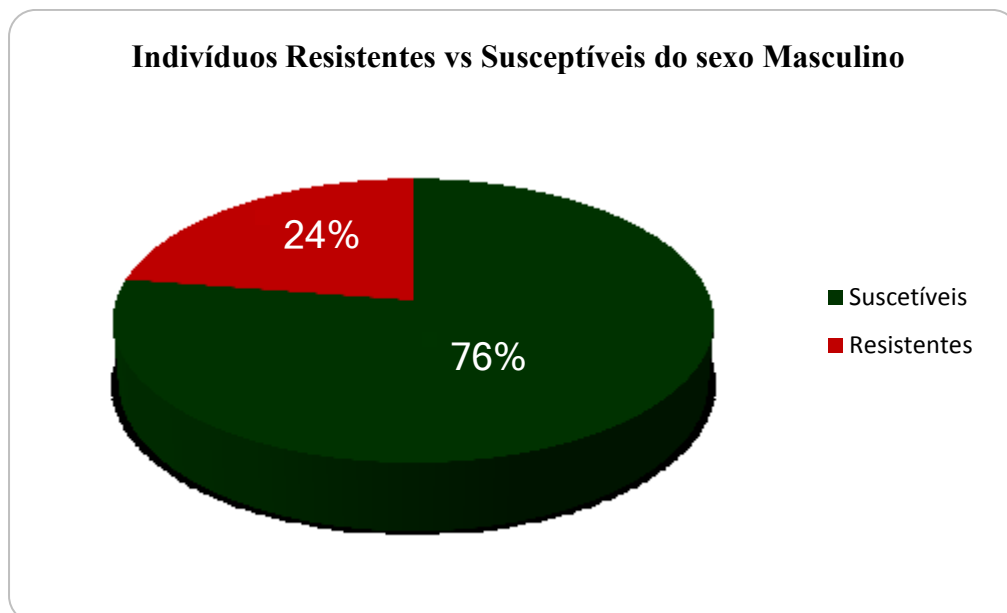


Gráfico 4: Indivíduos Resistentes vs Suscetíveis do sexo Masculino

Relativamente ao sexo feminino, apenas 21% (n=33) apresentam resistência sendo os restantes 79% (n=121) suscetíveis, como se pode ver no gráfico 5.

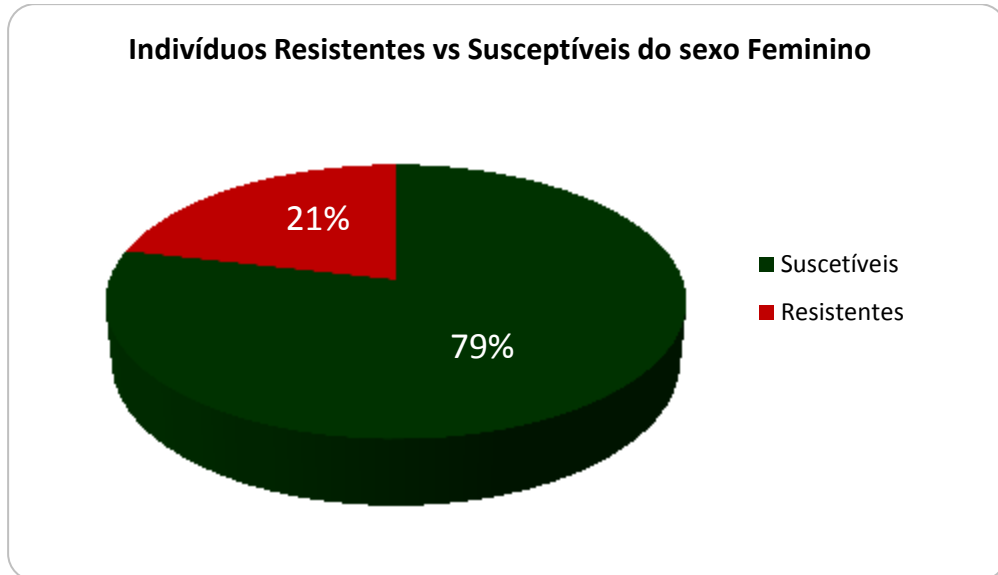


Gráfico 5: Indivíduos Resistentes vs Suscetíveis do sexo Feminino

A resistência em relação ao género não é estatisticamente significativa – feminino 0,214286 e masculino 0,225352 (teste exato de Fisher), ou seja, não há relação entre o aparecimento de resistência e o género, uma vez que apresentam valores muito próximos. A resistência aos inibidores da integrase sendo baixa, é semelhante em ambos os géneros.

Neste estudo 40% (n=33) dos indivíduos analisados, que apresentam resistência, são resistentes devido à presença de uma única mutação. Enquanto os restantes 60% (n=48) apresentam resistência provocada por associação de duas (n=28), três (n=15) ou quatro (n=5) mutações, gráfico 6.

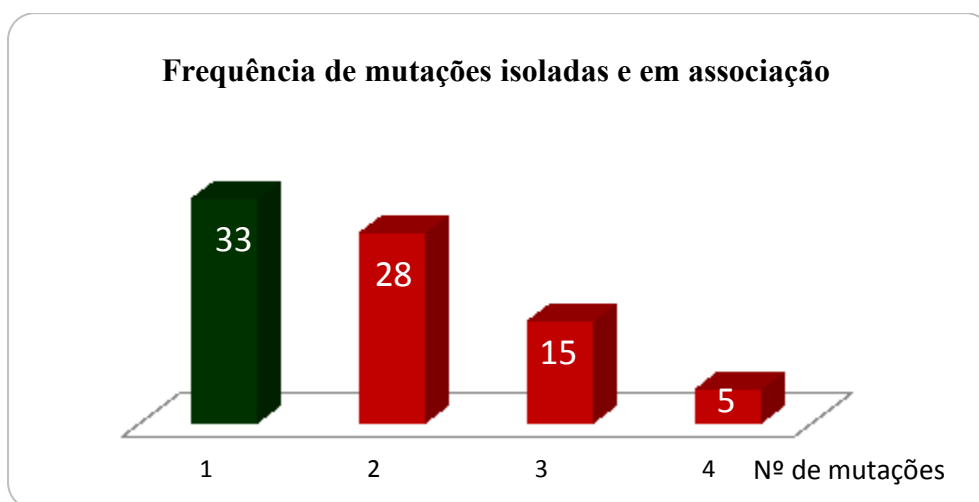


Gráfico 6: Frequência de mutações isoladas e em associação

No que respeita às mutações isoladas destaca-se a N155H, por se encontrar em 20 doentes, comparativamente com as outras mutações que apresentam frequências bastante inferiores, gráfico 7.

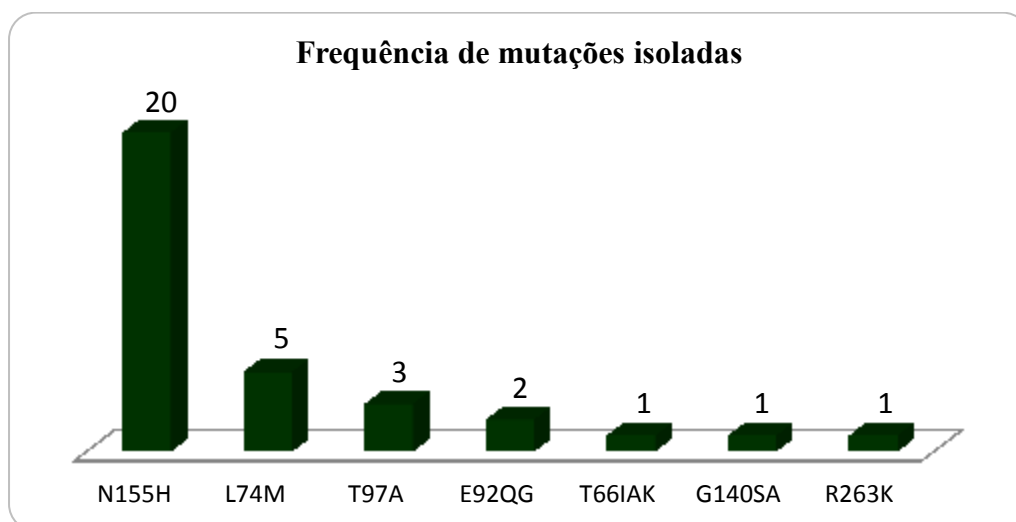


Gráfico 7: Frequência de mutações isoladas

Também é significativo o número de doentes com duas mutações associadas, correspondendo a 30% dos resistentes, apresentando a associação das mutações T97A com a N155H a frequência mais elevada, gráfico 8.

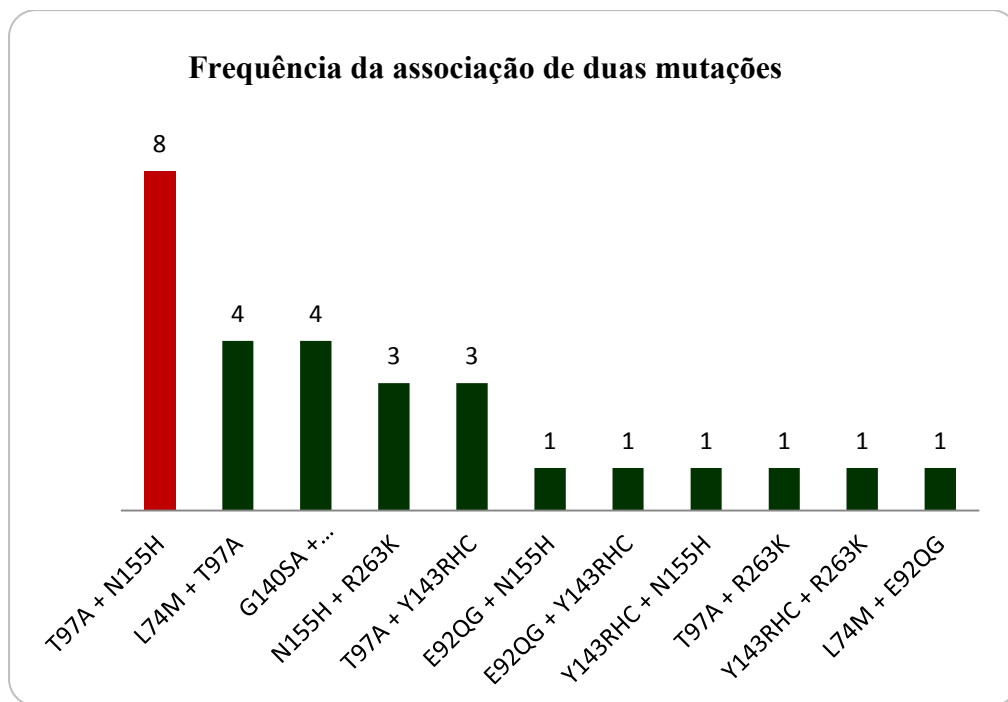


Gráfico 8: Frequência da associação de duas mutações

20% (n=15) dos doentes resistentes apresentam uma associação de três mutações, sobressaindo a associação das mutações L74M, T97A e Y143RHC, gráfico 9.

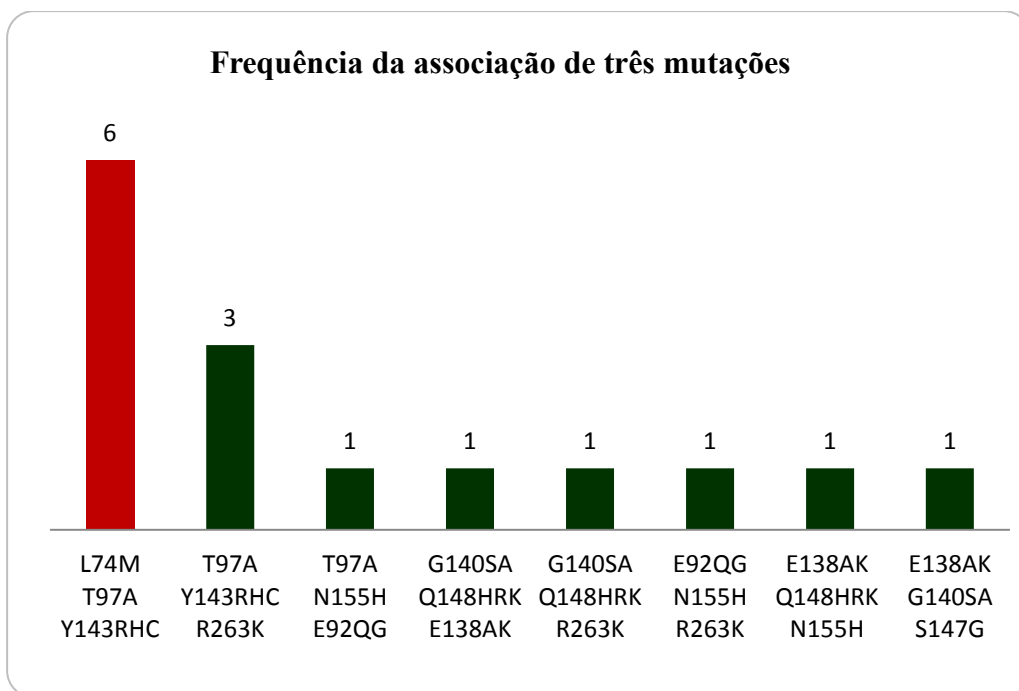


Gráfico 9: Frequência da associação de três mutações

Apenas cinco doentes apresentam uma associação de quatro mutações, nomeadamente:

- L74M + T97A + Y143RHC + R263K
- T97A + G140SA + Q148HRK + R263K
- T97A + E92QG + Y143RHC + R263K
- E138AK+ G140SA + S147G + Q148HRK
- T66IAK+ E138AK + S147G + Q148HRK

Realizou-se o teste χ^2 com correção de continuidade de Yates, através do programa SPSS, para validar a hipótese “a presença de mutações não é independente em relação ao subtipo”, para um nível de confiança de 95% com $\alpha=5\%$.

Tabela 7: Análise das mutações relevantes entre o subtipo B e G

Mutações	p-value
140	0,011
148	0,002
66	0,377
74	0,652
97	0,375
92	0,07
121	Não calculável
138	0,857
143	0,693
147	0,377
155	0,674
263	0,652

Após cálculos efetuados, considera-se que as mutações são globalmente independentes do subtipo, uma vez que a diferença encontrada não é estatisticamente significativa ($p \geq 0,05$). No entanto, as mutações das posições 140 e 148 são exceção, uma vez que estas tendem a surgir com maior facilidade no subtipo B, $p=0,011$ e $p=0,002$ respetivamente.

O mesmo método, e nível de confiança, foi utilizado para validar uma segunda hipótese “a presença de mutações para os InSTIs e as outras classes terapêuticas utilizadas são independentes”. Esta hipótese foi investigada numa amostra de doentes que não tiveram sucesso terapêutico com os InSTIs e que tinham sido previamente ou concomitantemente sujeitos a uma terapêutica com antirretrovirais que pertencem a outras classes terapêuticas: NRTIs, NNRTIs e IPs.

O estudo estatístico desta hipótese demonstrou que a mesma é válida, isto é, a ocorrência de mutações na região da integrase é independente das classes terapêuticas NRTIs, NNRTIs e IPs, pois obteve-se um $p=0,295$, isto é, elas só surgem na presença dos InSTIs, as restantes classes não favorecem nem desfavorecem o aparecimento de mutações na região da integrase.

5. Discussão de Resultados

O presente estudo foi realizado numa população constituída por um total de 367 doentes, dos quais 213 homens e 154 mulheres.

Averiguou-se a possível relação entre o género do doente e a resistência aos inibidores da integrase, verificando-se, através do teste exato de Fisher, que nenhum dos géneros apresentava propensão para a ocorrência de um ou mais tipos de mutações (p feminino = 0,214286 e p masculino = 0,225352). No estudo de Hurt, também não se encontrou qualquer relação entre a presença de mutações e o género dos indivíduos, $p=0,29$ (Hurt, Sebastian, Hicks, & Eron, 2014).

Iniciou-se este estudo com a identificação dos diferentes subtipos presentes na amostra, entre os quais: G, B, C, CRF02_AG, F, A, D, CRF06_cpx, CRF14_BG, H, B/G, A/G, CRF01_AE, J, U/A, U/F, destacando-se o subtipo G do qual fazem parte 121 indivíduos (33%), seguido do B com 94 indivíduos (26%) e a terceira posição é ocupada pelo subtipo C com 39 indivíduos (11%). Tal como neste estudo, Hemelaar e os seus colaboradores também identificaram diversos subtipos na sua investigação, contudo a maior parte desses indivíduos pertenciam ao subtipo C (48%) (Hemelaar, Gouws, Ghys, & Osmanov, 2013), que corresponde a quase 50% das infeções por VIH-1 existentes em todo o mundo (Han et al., 2016). Embora tenham sido identificados, neste estudo, uma diversidade de subtipos, a maior percentagem corresponde ao subtipo G mas a maioria dos estudos utiliza o subtipo B como referência, referindo os outros subtipos como um todo – subtipos não-B (Blanco, Varghese, Rhee, Gatell, & Shafer, 2011; Patel et al., 2014; Seki et al., 2015; Shimura et al., 2008).

A primeira linha de resistência aos inibidores da integrase é constituída pelas mutações primárias N155, Y143 e Q148 (Mbisa, Martin, & Cane, 2011; Quashie, Mesplède, & Wainberg, 2013) mas, no presente estudo, deste conjunto de mutações, apenas a N155 foi encontrada isolada.

Relativamente ao universo de mutações encontradas isoladamente, a N155H foi a que apresentou maior prevalência tal como no estudo de Doyle e colaboradores (Doyle et al., 2015). A presença isolada das mutações G140, E92, T66 e R263 estão de acordo com os estudos de Doyle e Quashie (Doyle et al., 2015; Quashie et al., 2013). Embora no presente estudo a L74M e a T97A tenham sido encontradas isoladas, nos

estudos referenciados apenas se encontram associadas a outras. Tal como no estudo de Quashie também não foram encontradas as mutações E138 e S147 isoladamente (Quashie et al., 2013).

No que respeita às associações de duas mutações, os conjuntos N155H + T97A, Q148HRK + G140SA, Y143RHC + T97A, N155H + E92QG, Y143RHC + E92QG e N155H + Y143RHC foram também encontradas nos estudos de Doyle, Mbisa, Quashi, e Wainberg (Doyle et al., 2015; Mbisa et al., 2011; Quashie et al., 2013; Wainberg, Han, & Mesplède, 2016). A associação N155H + R263K foi apenas referenciada no estudo de Anstett (Anstett, Fusco, Cutillas, Mesplede, & Wainberg, 2015). As restantes associações encontradas não se encontram referenciadas em nenhum destes estudos. No estudo de Quashie não foram identificadas as associações N155 com S147 nem N155 com G140, assim como no estudo efetuado (Quashie et al., 2013).

No que concerne às associações de três mutações apenas quatro conjuntos se encontram referenciados noutros estudos, a saber, Y143RHC + T97A + L74M, Q148HRK + E138KA + G140SA, N155H + E92QG + T97A, e N155H + E92QG + R263K (Anstett et al., 2015; Doyle et al., 2015; Mbisa et al., 2011; Quashie et al., 2013; Wainberg et al., 2016).

Neste estudo identificaram-se as seguintes associações de quatro mutações: L74M + T97A + Y143RHC + R263K; T97A + G140SA + Q148HRK + R263K; T97A + E92QG + Y143RHC + R263K; E138AK + G140SA + S147G + Q148HRK; T66IAK + E138AK + S147G + Q148HRK, não descritas na bibliografia consultada. É importante referir que em três destas associações o facto da mutação Q148 estar associada à G140, e/ou à E138 e/ou à S147 confere um alto grau de resistência a todos os InSTIs disponíveis atualmente, excluindo esta classe nos regimes terapêutico subsequentes. A mutação R263K confere uma baixa resistência ao DTG, e as associações L74M + T97A + Y143RHC + R263K e T97A + E92QG + Y143RHC + R263K, embora responsáveis pela alta resistência ao RAL e ao EVG, permitem a utilização de DTG.

A mutação Q148HRK, confere maior resistência aos InSTIs, representando o primeiro passo com um alto nível de resistência cruzada ao DTG (Varghese, Pinsky, Smith, Klein, & Shafer, 2016). Embora, neste estudo, esta mutação tenha sido detetada apenas em dez doentes, o facto de se encontrar em associação com outras, impede uma terapêutica com DTG.

Todos os doentes, no presente estudo, que apresentaram a associação das mutações Q148HRK e G140SA eram resistentes. Contudo, no estudo de Varghese e colaboradores foi identificado um paciente, com a associação Q148N e G140S, que não demonstrou falência virológica e manteve a resposta imunológica. Embora o teste de resistência genotípico considere este indivíduo com uma resistência intermédia ao RAL e ao EVG devido à presença de G140S, o facto de o doente continuar a responder à terapêutica levou os clínicos a não fazer qualquer alteração na medicação, surgindo assim uma mutação Q148N inovadora capaz de gerar suscetibilidade aos InSTIs (Varghese et al., 2016).

As mutações T66I e E92Q contribuem significativamente para resistência ao EVG e as mutações E138K e S147G isoladas contribuem para uma diminuição na suscetibilidade ao EVG, mas quando em associação com a mutação T66I ou E92Q há um grande aumento na resistência a este fármaco (Mbisa et al., 2011; Shimura et al., 2008). Na amostra estudada, a muito baixa frequência destas mutações são indicadoras de que a utilização do EVG nesta população é muito reduzida.

Relativamente à primeira hipótese testada “a presença de mutações não é independente em relação ao subtipo” apenas se verificou ser estatisticamente significativa para as mutações nas posições 140 e 148 que prevalecem no subtipo B. Este resultado está em conformidade com o obtido no estudo de Doyle e colaboradores efetuado e pode ser explicado pelo facto de, na maioria das sequências do subtipo B, ser apenas necessária a substituição de um único nucleótido para que o aminoácido glicina seja substituído pela serina no codão 140 da integrase. Nos subtipos não-B é necessário substituir dois nucleótidos para que ocorra a mesma alteração de aminoácidos, aumentando assim a barreira genética para o aparecimento de mutações na posição 140. Por outro lado, a ocorrência de mutações no codão 140 influencia o aparecimento da Q148H/R/K, explicando-se assim a prevalência desta mutação no subtipo B (Doyle et al., 2015), tal como o resultado obtido no estudo efetuado.

A validade da segunda hipótese “a presença de mutações para os InSTIs e as outras classes terapêuticas são independentes” significa que o insucesso terapêutico com os InSTIs não se deve ao tratamento prévio com antirretrovirais das classes NRTIs, NNRTIs e IPs, uma vez que as mutações responsáveis pela resistência ao InSTIs só

surtem após tratamento com esta classe terapêutica, tal como é demonstrado no estudo de Winters (Winters et al., 2012).

É importante referir que as mutações seleccionadas pelo RAL e pelo EVG dão origem a resistência cruzada entre estes dois fármacos. Das mutações descritas, a que poderá ter maior impacto numa terapêutica com DTG é a mutação Q148 quando juntamente com mais 2 ou 3 mutações na integrase. O facto de, na população estudada, a frequência das associações, nas quais consta a Q148, ser muito baixa, é importante para que o DTG possa ser utilizado em doentes com resistência ao RAL e/ou ao EVG.

A baixa frequência de determinadas mutações pode estar relacionada com a terapêutica efetuada, nomeadamente com a suspensão do consumo de um determinado fármaco assim que há falência virológica, evitando a acumulação de mutações por toma continuada sob falência virológica.

Deste modo, haveriam mutações que deixariam de conferir vantagem ao vírus e, por isso, a tendência para a sua reversão, embora se saiba que permanecem como populações minoritárias e que se ocorrer de novo a mesma pressão farmacológica voltam a emergir.

É importante analisar os regimes terapêuticos seguidos pelos doentes e as mutações mais prevalentes sob efeito de determinado fármaco, como também, o impacto da introdução do DTG nos regimes terapêuticos desde 2015, e constatar sobretudo se o DTG, um fármaco de alta barreira genética, virá contribuir para um decréscimo da resistência aos inibidores da integrase nos doentes infetados por VIH-1.

6. Conclusão

Na população em estudo, 78% dos indivíduos não apresentam mutações de resistência aos InSTIs, o que à partida significa maior probabilidade de sucesso terapêutico, isto é, embora o vírus não seja eliminado impede-se a sua multiplicação.

Apesar de 78% dos indivíduos não terem mutações de resistência, todos se encontram sob insucesso terapêutico, o que pode ser justificado com base em diversas hipóteses: má adesão à terapêutica, ou seja, se um indivíduo não toma o fármaco, então não irão aparecer mutações de resistência; realizar a colheita tardiamente, isto é, se um doente estiver sob falência virológica e interromper o tratamento mas esperar um ou dois meses para realizar a colheita, então há possibilidade de as mutações reverterem e assim no momento da colheita estas já não existem; as mutações podem ser indetetáveis quando estamos presente uma carga viral baixa e a última hipótese é a falência terapêutica dever-se às outras classes e não aos InSTIs já que estes fazem parte de regimes que contenham fármacos de outras classes terapêuticos.

Nos restantes 22%, o aparecimento de resistências aos inibidores da integrase está associado à presença de mutações no gene da integrase. Estas mutações vão influenciar a resposta dos doentes à terapêutica, quando utilizam os fármacos inibidores da integrase como o RAL, o EVG e o DTG, impedindo a sua ação.

A elevada prevalência das mutações N155H e T97A é indicadora de resistência ao RAL, justificada pelo facto de ser o fármaco disponível e utilizado há mais tempo. O RAL e o ELV têm resistência cruzada e por isso, atualmente a única opção disponível dentro dos INI, para os doentes que têm resistência a um destes fármacos, é o DTG.

A reduzida prevalência das mutações associadas ao EVG (T66I e S147G, E92Q, Q148), assim como a associação Q148 com a G140, deve-se à pouca utilização deste fármaco no tratamento do VIH, nesta população.

A prevalência, relativamente baixa, das mutações Q148HRK e R263K na população estudada, favorece o tratamento subsequente com DTG, uma vez que são as mutações responsáveis pela diminuição da suscetibilidade a este fármaco.

Os inibidores da integrase constituem uma classe de fármacos de maior importância, uma vez que apresentam uma elevada potência antiviral, boa tolerância,

bom perfil de segurança e reduzidas interações farmacológicas, propriedades que os colocam na vanguarda dos regimes terapêuticos. Face ao exposto, a continuidade de investigação nesta área é da maior relevância, por poder contribuir para colmatar as limitações impostas pela resistência, facilitando assim o sucesso terapêutico dos doentes infetados com VIH, face à sua dependência de tratamento durante toda a vida.

7. Bibliografia

- A. Engelman, P. C. (2013). The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. *Nature Reviews Microbiology*, *10*(4), 279–290. <http://doi.org/10.1038/nrmicro2747>.The
- Alсахافي, N., Debbeche, O., Sodroski, J., & Finzi, A. (2015). Effects of the I559P gp41 change on the conformation and function of the human immunodeficiency virus (HIV-1) membrane envelope glycoprotein trimer. *PLoS ONE*, *10*(4), 1–26. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0122111>
- Ammar, F. F., Hobaika, Z., Abdel-Azeim, S., Zargarian, L., Maroun, R. G., & Femandjian, S. (2016). A targeted DNA substrate mechanism for the inhibition of HIV-1 integrase by inhibitors with antiretroviral activity. *FEBS Open Bio*, *6*(4), 234–250. <http://doi.org/10.1002/2211-5463.12025>
- Andany, N., & Walmsley, S. L. (2016). What ‘s new for antiretroviral treatment in women with HIV. *Journal of Virus Eradication*, *2*(1), 67–77.
- Arts, E. J., & Hazuda, D. J. (2012). HIV-1 antiretroviral drug therapy. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *2*(4). <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a007161>
- Bhatti, A. B., Usman, M., & Kandi, V. (2016). Current Scenario of HIV/AIDS, Treatment Options, and Major Challenges with Compliance to Antiretroviral Therapy. *Curēusus*, *8*(3), e515. <http://doi.org/10.7759/cureus.515>
- Blanco, J. L., Varghese, V., Rhee, S. Y., Gatell, J. M., & Shafer, R. W. (2011). HIV-1 integrase inhibitor resistance and its clinical implications. *Journal of Infectious Diseases*, *203*(9), 1204–1214. <http://doi.org/10.1093/infdis/jir025>
- Blanco, J. L., Whitlock, G., Milinkovic, A., & Moyle, G. (2015). HIV integrase inhibitors: a new era in the treatment of HIV. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, *16*(9), 1313–1324. <http://doi.org/10.1517/14656566.2015.1044436>
- Canducci, F., Ceresola, E. R., Boeri, E., Spagnuolo, V., Cossarini, F., Castagna, A., ... Clementi, M. (2011). Cross-resistance profile of the novel integrase inhibitor dolutegravir (S/GSK1349572) using clonal viral variants selected in patients failing raltegravir. *Journal of Infectious Diseases*, *204*(11), 1811–1815. <http://doi.org/10.1093/infdis/jir636>
- Casadellà, M., van Ham, P. M., Noguera-Julian, M., van Kessel, A., Pou, C., Hofstra, L. M., ... Paredes, R. (2015). Primary resistance to integrase strand-transfer inhibitors in Europe. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *70*(10), 2885–2888. <http://doi.org/10.1093/jac/dkv202>
- Ceccherini-Silberstein, F., Malet, I., D'Arrigo, R., & Antinori, A. (2009). Characterization and Structural Analysis of HIV-1 Integrase Conservation. *Aids Reviews*, *11*(1), 17–29. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3056336&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Chen, X., Tsiang, M., Yu, F., Hung, M., Jones, G. S., Zeynalzadegan, a., ... Chen, J.

- M. (2008). Modeling, Analysis, and Validation of a Novel HIV Integrase Structure Provide Insights into the Binding Modes of Potent Integrase Inhibitors. *Journal of Molecular Biology*, 380(3), 504–519. <http://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.04.054>
- Clavel, F., Guétard, D., Brun-Vézinte, F., Chamaret, S., Rey, M., Laurent, A. G., ... Champalimaud, J. L. (1986). Isolation of a New Human Retrovirus from West African Patients with AIDS. *Science*, 233(4761), 343–346. <http://doi.org/10.1126/science.2425430>
- Cohen, M. S., Chen, Y. Q., McCauley, M., Gamble, T., Hosseinipour, M. C., Kumarasamy, N., ... Fleming, T. R. (2016). Antiretroviral Therapy for the Prevention of HIV-1 Transmission. *New England Journal of Medicine*, 375(9), 830–839. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa1600693>
- Craigie, R., & Bushman, F. D. (2013). HIV DNA Integration. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689–1699. <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Dampier, W., Nonnemacher, M. R., Mell, J., Earl, J., Ehrlich, G. D., Pirrone, V., ... Wigdahl, B. (2016). HIV-1 genetic variation resulting in the development of new quasispecies continues to be encountered in the peripheral blood of well-suppressed patients. *PLoS ONE*, 11(5), 1–15. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0155382>
- Dayer, M. R. (2016). Comparison of Newly Assembled Full Length HIV-1 Integrase With Prototype Foamy Virus Integrase: Structure-Function Prospective, 9(5). <http://doi.org/10.5812/jjm.29773.Research>
- De Clercq, E. (2009). Anti-HIV drugs: 25 compounds approved within 25 years after the discovery of HIV. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 33(4), 307–320. <http://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.10.010>
- Deeks, S. G. (2003). Treatment of antiretroviral-drug-resistant HIV-1 infection. *Lancet*, 362(9400), 2002–2011. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)15022-2](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)15022-2)
- Delelis, O., Carayon, K., Saïb, A., Deprez, E., Mouscadet, J.-F., Mawsawi, L. Al, ... Goff, S. (2008). Integrase and integration: biochemical activities of HIV-1 integrase. *Retrovirology*, 5(1), 114. <http://doi.org/10.1186/1742-4690-5-114>
- Desrosiers, R. C. (1990). The Simian Immunodeficiency Viruses. *Annual Review of Immunology*, 8(1), 557–578. <http://doi.org/10.1146/annurev.iy.08.040190.003013>
- Engelman, A., & Cherepanov, P. (2014). Retroviral Integrase Structure and DNA Recombination Mechanism. *Microbiology Spectrum*, 2(6), 1–22. <http://doi.org/10.1128/microbiolspec.MDNA3-0024-2014>
- Fernández-Caballero, J. Á., Chueca, N., Álvarez, M., Mérida, M. D., López, J., Sánchez, J. A., ... García, F. (2016). Usefulness of Integrase resistance testing in proviral HIV-1 DNA in patients with Raltegravir prior failure. *BMC Infectious Diseases*, 16(1), 197. <http://doi.org/10.1186/s12879-016-1545-8>
- Fernández-Ortega, C., Ramírez, A., Casillas, D., Paneque, T., Ubieta, R., Dubed, M., ... Betancourt, L. (2016). Identification of vimentin as a potential therapeutic target against HIV infection. *Viruses*, 8(6). <http://doi.org/10.3390/v8060098>

- Fikkert, V., Van Maele, B., Vercammen, J., Hantson, A., Van Remoortel, B., Michiels, M., ... Witvrouw, M. (2003). Development of resistance against diketo derivatives of human immunodeficiency virus type 1 by progressive accumulation of integrase mutations. *Journal of Virology*, 77(21), 11459–11470. <http://doi.org/10.1128/JVI.77.21.11459-11470.2003>
- Forsman, A., & Weiss, R. A. (2008). Why is HIV a pathogen? *Trends in Microbiology*, 16(12), 555–560. <http://doi.org/10.1016/j.tim.2008.09.004>
- Frankel, A. D., Francisco, S., & Young, J. a T. (1998). HIV-1 : Fifteen Proteins and an RNA, 1–25.
- Freed, E. O. (2001). HIV-1 replication. *Somatic Cell and Molecular Genetics*, 26(1–6), 13–33. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12465460>
- Gao, F., Bailes, E., Robertson, D. L., Chen, Y., Rodenburg, C. M., Michael, S. F., ... Hahn, B. H. (1999). Origin of HIV-1 in the chimpanzee Pan troglodytes troglodytes. *Nature*, 397(6718), 436–441. <http://doi.org/10.1038/17130>
- Gelderblom, H. R., Ozel, M., Hausmann, E. H. S., Winkel, T., Pauli, G., & Koch, M. a. (1988). Fine Structure of Human Immunodeficiency Virus (Hiv), Immunolocalization of Structural Proteins and Virus-Cell Relation. *Micron and Microscopia*, 19(1), 41–60.
- Grandgenett, D. P., Pandey, K. K., Bera, S., & Aihara, H. (2015). Multifunctional facets of retrovirus integrase. *World Journal of Biological Chemistry*, 6(3), 83–94. <http://doi.org/10.4331/wjbc.v6.i3.83>
- Hajduczki, A., Bundoc, V., & Berger, E. (2015). Developing soluble mimetics of the chemokine receptor CCR5 for the study of HIV Env / receptor interactions (CCR6P . 216).
- Han, Y.-S., Mesplède, T., & Wainberg, M. A. (2016). Differences among HIV-1 subtypes in drug resistance against integrase inhibitors. *Infection, Genetics and Evolution*. <http://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.06.047>
- Hardy, I., Brenner, B., Quashie, P., Thomas, R., Petropoulos, C., Huang, W., ... Roger, M. (2015a). Evolution of a novel pathway leading to dolutegravir resistance in a patient harbouring N155H and multiclass drug resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(2), 405–411. <http://doi.org/10.1093/jac/dku387>
- Hardy, I., Brenner, B., Quashie, P., Thomas, R., Petropoulos, C., Huang, W., ... Roger, M. (2015b). Evolution of a novel pathway leading to dolutegravir resistance in a patient harbouring N155H and multiclass drug resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(2), 405–411. <http://doi.org/10.1093/jac/dku387>
- Hemelaar, J., Gouws, E., Ghys, P. D., & Osmanov, S. (2013). Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000– 2007. *Pmc*, 25(5), 679–689. <http://doi.org/10.1097/QAD.0b013e328342ff93.Global>
- Hu, W.-S., & Hughes, S. H. (2012). HIV-1 Reverse Transcription. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(10), a006882–a006882. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a006882>

- Hurt, C. B., Sebastian, J., Hicks, C. B., & Eron, J. J. (2014). Resistance to HIV integrase strand transfer inhibitors among clinical specimens in the united states, 2009-2012. *Clinical Infectious Diseases*, *58*(3), 423–431. <http://doi.org/10.1093/cid/cit697>
- International Committee on Taxonomy of Viruses. (2015). ICTV Master Species List 2015. Retrieved from http://talk.ictvonline.org/files/ictv_documents/m/msl/5208/download.aspx
- Jayappa, K. D., Ao, Z., Wang, X., Moulana, J., Shekhar, S., Yang, X., & Yao, X. (2015). Human immunodeficiency virus type 1 employs the cellular dynein light chain 1 protein for reverse transcription through interaction with its integrase protein. *Journal of Virology*, *89*(7), 3497–3511. <http://doi.org/10.1128/JVI.03347-14>
- Johnson, V. a, Brun-Vezinet, F., Clotet, B., Gunthard, H. F., Kuritzkes, D. R., Pillay, D., ... Richman, D. D. (2008). Update of the Drug Resistance Mutations HIV in -1. *Topics in HIV Medicine : A Publication of the International AIDS Society, USA*, *16*(5), 138–145.
- Kluge, S. F., Mack, K., Iyer, S. S., Pujol, F. M., Hegele, A., Learn, G. H., ... Kirchhoff, F. (2014). Nef proteins of epidemic HIV-1 group O strains antagonize human tetherin. *Cell Host and Microbe*, *16*(5), 639–650. <http://doi.org/10.1016/j.chom.2014.10.002>
- Krishnan, L., & Engelman, A. (2012). Retroviral integrase proteins and HIV-1 DNA integration. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(49), 40858–40866. <http://doi.org/10.1074/jbc.R112.397760>
- Langs-Barlow, A., & Paintsil, E. (2014). Impact of human immunodeficiency virus type-1 sequence diversity on antiretroviral therapy outcomes. *Viruses*, *6*(10), 3855–3872. <http://doi.org/10.3390/v6103855>
- Lataillade, M., Chiarella, J., & Kozal, M. J. (2007). Natural polymorphism of the HIV-1 integrase gene and mutations associated with integrase inhibitor resistance. *Antiviral Therapy*, *12*(4), 563–570.
- Llibre, J. M., Pulido, F., García, F., Deltoro, M. G., Blanco, J. L., & Delgado, R. (2014). Genetic barrier to resistance for dolutegravir. *AIDS Reviews*, *17*(1), 59–68.
- M. D. Andrade, A. M. S. (2015). Retroviral Integrase: Then and Now. *Annual Review of Virology*, *2*(1), 241–264. <http://doi.org/10.1146/annurev-virology-100114-055043>
- Malet, I., Thierry, E., Wirden, M., Lebourgeois, S., Subra, F., Katlama, C., ... Delelis, O. (2015). Combination of two pathways involved in raltegravir resistance confers dolutegravir resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *70*(10), 2870–2880. <http://doi.org/10.1093/jac/dkv197>
- Martins, H. C., Shivaji, T., & Saúde, D.-G. da. (2015). *Infeção VIH/SIDA: a situação em Portugal a 31 de dezembro de 2014*. (Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA, Ed.) (INSA, IP). Lisboa: Documento VIH/SIDA, n° 146.
- Mbisa, J. L., Martin, S. a., & Cane, P. a. (2011). Patterns of resistance development with integrase inhibitors in HIV. *Infection and Drug Resistance*, *4*(1), 65–76. <http://doi.org/10.2147/IDR.S7775>

- McCutchan, F. E. (2006). Global Epidemiology of HIV. *J. Med. Virol*, (78), S7–S12. <http://doi.org/10.1002/jmv>
- Mesplède, T., & Wainberg, M. A. (2015). Resistance against integrase strand transfer inhibitors and relevance to HIV persistence. *Viruses*, 7(7), 3703–3718. <http://doi.org/10.3390/v7072790>
- Messiaen, P., Wensing, A. M. J., Fun, A., Nijhuis, M., Brusselaers, N., & Vandekerckhove, L. (2013). Clinical Use of HIV Integrase Inhibitors: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE*, 8(1). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0052562>
- Métifiot, M., Marchand, C., Maddali, K., & Pommier, Y. (2010). Resistance to Integrase Inhibitors. *Viruses*, 2(7), 1347–1367. <http://doi.org/10.3390/v2071347>
- Miller, M. D., Farnet, C. M., & Bushman, F. D. (1997). Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. *Journal of Virology*, 71(7), 5382–5390.
- Miller, M. T., Tuske, S., Das, K., Destefano, J. J., & Arnold, E. (2015). Structure of HIV-1 reverse transcriptase bound to a novel 38-mer hairpin template-primer DNA aptamer. *Protein Science*, 25, n/a-n/a. <http://doi.org/10.1002/pro.2776>
- Mirela, D., Ayouba, A., Esteban, A., Learn, G. H., Boué, V., & Liegeois, F. (2015). Origin of the HIV-1 group O epidemic in western lowland gorillas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(11), 1343–1352. <http://doi.org/10.1073/pnas.1502022112>
- Ode, H., Matsuda, M., Matsuoka, K., Hachiya, A., Hattori, J., Kito, Y., ... Sugiura, W. (2015). Quasispecies analyses of the HIV-1 Near-full-length genome with illumina MiSeq. *Frontiers in Microbiology*, 6(NOV), 1–11. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01258>
- Patel, P., Borkowf, C. B., Brooks, J. T., Lasry, A., Lansky, A., & Mermin, J. (2014). Estimating per-act HIV transmission risk: a systematic review. *AIDS (London, England)*, 28(10), 1509–1519. <http://doi.org/10.1097/QAD.0000000000000298>
- Peeters, M., D'Arc, M., & Delaporte, E. (2014). The origin and diversity of human retroviruses. *AIDS Reviews*, 16(1), 23–24.
- Peeters, M., & Delaporte, E. (2012). Simian retroviruses in African apes. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(6), 514–520. <http://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03843.x>
- Pommier, Y., Johnson, A. a, & Marchand, C. (2005). Integrase inhibitors to treat HIV/AIDS. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 4(March), 236–248. <http://doi.org/10.1038/nrd1660>
- Potter, S. J., Chew, C. B., Steain, M., Dwyer, D. E., & Saksena, N. K. (2004). Obstacles to successful antiretroviral treatment of HIV-1 infection: problems & perspectives. *The Indian Journal of Medical Research*, 119(6), 217–237.
- R. W. Shafer, J. M. S. (2008). HIV-1 Drug Resistance Mutations: an Updated Framework for the Second Decade of HAART. *AIDS Reviews*, 10(2), 67–84.

<http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

- Reeves, J. D., & Doms, R. W. (2002). Human immunodeficiency virus type 2. *The Journal of General Virology*, 83(1), 1253–65. <http://doi.org/10.1099/vir.0.18253-0>
- Robinson, B. A., Reed, J. C., Geary, C. D., Swain, J. V., & Lingappa, J. R. (2014). A temporospatial map that defines specific steps at which critical surfaces in the Gag MA and CA domains act during immature HIV-1 capsid assembly in cells. *Journal of Virology*, 88(10), 5718–41. <http://doi.org/10.1128/JVI.03609-13>
- Rutenberg, N., Tun, W., & Borse, N. N. (2016). Lessons learned and study results from HIVCore: an HIV implementation science initiative. *Journal of the International AIDS Society*, 19(5 (Suppl 4)), 1–4. <http://doi.org/10.7448/IAS.19.5.21194>
- Sala, M., Spensiero, A., Esposito, F., Scala, M. C., Vernieri, E., Bertamino, A., ... Gomez-Monterrey, I. M. (2016). Development and Identification of a Novel Anti-HIV-1 Peptide Derived by Modification of the N-Terminal Domain of HIV-1 Integrase. *Frontiers in Microbiology*, 7(June), 1–9. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00845>
- Serrao, E., Krishnan, L., Shun, M. C., Li, X., Cherepanov, P., Engelman, A., & Maertens, G. N. (2014). Integrase residues that determine nucleotide preferences at sites of HIV-1 integration: Implications for the mechanism of target DNA binding. *Nucleic Acids Research*, 42(8), 5164–5176. <http://doi.org/10.1093/nar/gku136>
- Serrao, E., Odde, S., Ramkumar, K., & Neamati, N. (2009). Raltegravir, elvitegravir, and metoogravir: the birth of “me-too” HIV-1 integrase inhibitors. *Retrovirology*, 6, 25. <http://doi.org/10.1186/1742-4690-6-25>
- Shafer, R. W. (2002). Genotypic Testing for Human Immunodeficiency Virus Type 1 Drug Resistance. *Society*, 15(2), 247–277. <http://doi.org/10.1128/CMR.15.2.247>
- Sharp, P. M., & Hahn, B. H. (2011). Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 1(1), 1–22. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a006841>
- Shimura, K., Kodama, E., Sakagami, Y., Matsuzaki, Y., Watanabe, W., Yamataka, K., ... Matsuoka, M. (2008). Broad antiretroviral activity and resistance profile of the novel human immunodeficiency virus integrase inhibitor elvitegravir (JTK-303/GS-9137). *Journal of Virology*, 82(2), 764–774. <http://doi.org/10.1128/JVI.01534-07>
- Sundquist, W. I., & Kräusslich, H. G. (2012). HIV-1 assembly, budding, and maturation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(7), 1–24. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a006924>
- The UK Collaborative HIV Cohort (UK CHIC) Writing Committee. (2016). Predicting virological decay in patients starting combination antiretroviral therapy. *Aids*, 30(11), 1817–1827. <http://doi.org/10.1097/QAD.0000000000001125>
- Valadas, E., & Antunes, F. (2004). HIV-2: the Portuguese Connection. *Clinical Infectious Diseases*, 39(10), 1553–1554. <http://doi.org/10.1086/425506>
- Varadarajan, J., McWilliams, M. J., Mott, B. T., Thomas, C. J., Smith, S. J., & Hughes,

- S. H. (2016). Drug resistant integrase mutants cause aberrant HIV integrations. *Retrovirology*, 13(1), 71. <http://doi.org/10.1186/s12977-016-0305-6>
- Varghese, V., Pinsky, B. A., Smith, D. S., Klein, D., & Shafer, R. W. (2016). Q148N, a Novel Integrase Inhibitor Resistance Mutation Associated with Low-Level Reduction in Elvitegravir Susceptibility. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 32(7), 702–704. <http://doi.org/10.1089/AID.2016.0038>
- Vignuzzi, M., Stone, J. K., Arnold, J. J., Cameron, C. E., & Andino, R. (2006). Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population. *Nature*, 439(7074), 344–8. <http://doi.org/10.1038/nature04388>
- Wainberg, M. A., Han, Y.-S., & Mesplède, T. (2016). Might dolutegravir be part of a functional cure for HIV? *Canadian Journal of Microbiology*, 62(5), 375–82. <http://doi.org/10.1139/cjm-2015-0725>
- Wainberg, M. a, Mesplède, T., & Quashie, P. K. (2012). The development of novel HIV integrase inhibitors and the problem of drug resistance. *Current Opinion in Virology*, 2(5), 656–662. <http://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.08.007>
- Wensing, A. M., Calvez, V., Günthard, H. F., Johnson, V. A., Paredes, R., Pillay, D., ... Richman, D. D. (2015). 2015 Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1. *IAS-USA*, 23(4), 132–141. Retrieved from http://www.iasusa.org/sites/default/files/tam/2015hiv_muta_article.pdf
- Winters, M. A., Lloyd, R. M., Shafer, R. W., Kozal, M. J., Miller, M. D., & Holodniy, M. (2012). Development of elvitegravir resistance and linkage of integrase inhibitor mutations with protease and reverse transcriptase resistance mutations. *PLoS ONE*, 7(7), 1–10. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0040514>
- World Health Organization (WHO). (2016). Global Aids Update. *World Health Organization*, (March), 1–16. <http://doi.org/ISBN 978-92-9253-062-5>