

**Secretaria de Estado da Saúde
Coordenadoria de Controle de Doenças
Instituto Adolfo Lutz**

**Curso de Especialização
Vigilância Laboratorial em Saúde Pública**

Juciane Soares dos Santos

**RESISTÊNCIA GENOTÍPICA
EM PACIENTES COM FALHA
VIROLÓGICA OS
ANTIRRETROVIRAIS DA
CLASSE DA INTEGRASE**

São Paulo (SP)

2019

Juciane Soares dos Santos

**RESISTÊNCIA GENOTÍPICA
AOS ANTIRRETROVIRAIS DA
CLASSE DA INTEGRASE EM
PACIENTES COM FALHA
VIROLÓGICA**

Trabalho de conclusão de curso de especialização apresentado ao Instituto Adolfo Lutz- Unidade do Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP-Doutor Antônio Guilherme de Souza como requisito parcial para obtenção do título de Especialista em Vigilância Laboratorial em Saúde Pública

Orientador: Prof. Luís Fernando de Macedo Brígido

São Paulo (SP)

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Santos, Juciane Soares

Resistência Genotípica aos antirretrovirais da Classe da Integrase em pacientes com falha Viroológica/ Juciane Soares Santos – São Paulo, 2020.

30 f. il

Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização-Vigilância Laboratorial em Saúde Pública)-Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, CEFOR/SUS-SP, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, 2020.

Área de concentração: Aplicação de técnicas moleculares para o diagnóstico de hepatites virais e HIV-1

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

1 Antirretroviral; 2 HIV; 3 Integrase; 4 Resistência

SES/CEFOR/IAL-66/2020

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

LISTA DE ABREVIATURA, SIGLAS E SÍMBOLOS

μl	Microlitro (10 ⁻⁶ Litro)
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ARV	Antirretroviral
AZT	Zidovudina
BIC	Bictegravir
CA	Capsídeo
CD4	Linfócito T auxiliar
cDNA	DNA complementar
COB	Cobocistat
CV	Carga viral
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTG	Dolutegravir
EDTA	Ácido etilenodiamino tretra-acético
ENV	envelope viral
EUA	Estados Unidos da América
EVG	Elvitegravir
FDA	U.S. Food and Drug Administration)
FTC	Emtricitabina
GAG	Grupo específico de antígenos
gp	Glicoproteína
GSS	Grau de susceptibilidade Genotípica
HAART	Terapia antirretroviral altamente eficaz
HIV	vírus da imunodeficiência humana
HSH	Homens que fazem Sexo com Homens
IAL	Instituto Adolf Lutz
IN	Integrase
INI	Inibidor de integrase
IP	Inibidor de protease

IP/r	Inibidor da protease associado a ritonavir
ITRN	Inibidores da transcriptase reversa análogo de nucleosídeo
ITRNN	Inibidores da transcriptase reversa não análogo de nucleosídeo
Kb	Kilobases
kDA	Kilodaltons
LTR	Sequências Terminais Longas Repetidas
MA	matriz
mRNA	RNA mensageiro
NC	Núcleo
nm	nanômetro
OH	Hidroxila
P450	Proteína 450
PCDT	Protocolo clínico de diretrizes terapêuticas
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
POL	polimerase
PT	Protease
PVHIV	Pessoas vivendo com HIV/AIDS
RAL	Raltegravir
REV	Regulador da expressão de proteínas virais
RNA	Ácido ribonucleico
Rpm	Rotação por minuto
RT	Transcriptase Reversa
RT PCR	PCR Retrotranscrição e Reação em Cadeia da Polimerase
RTV/r	Ritonavir associado a ritonavir
SUS	Sistema Único de Saúde
T-20	Enfuvirtide
TAF	Tenofovir alafenamina
TARV	Terapia antirretroviral
TAT	trans-ativadortransicional

UNAIDS Joint United Nations Programme on HIV/AIDS

VIF Fator de infectividade viral

VPR Proteína viral R

VPU Proteína viral U

VPX Proteína viral X

Zn²⁺Zinco

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura do vírus HIV-1.....	14
Figura 2: Organização Genômica do HIV-1	15
Figura 3: Ciclo Replicativo do HIV-1.	16
Figura 4: Representação esquemática dos domínios estruturais da enzima integrase.	19
Figura 5: Integração do cDNA ao genoma do vírus através da integrase.	20
Figura 6: Grau de Susceptibilidade Genotípica (GSS) de acordo com cada antirretroviral dos Inibidores da Integrase.....	Erro! Indicador não definido.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais antirretrovirais das classes dos ITRN, ITRNN, IP e inibidores de entrada (IE)...	18
Tabela 2: Nomes e siglas dos antirretrovirais da classe da Integrase.	21
Tabela 3: Protocolo da Reação em Cadeia de Polimerase do gene da Integrase.	27
Tabela 4: Protocolo da Reação em Cadeia de Polimerase do gene da Polimerase.	28
Tabela 5: Características demográficas e laboratoriais no momento da inclusão dos pacientes multifalhados com exposição a pelo menos um Inibidor da Integrase.	30
Tabela 6: Mutações principais e acessórias da região da Integrase.	31
Tabela 7: Percentual do uso de Raltegravir e Dolutegravir.....	32

RESUMO

A integrase, uma enzima fundamental no ciclo replicativo do HIV, é um alvo para terapia ARV que tem se mostrado muito promissor. A enzima é responsável pela integração do DNA proviral no DNA da célula hospedeira. É, portanto um potencial fármaco tanto para o uso em terapia de resgate como para uso em primeira linha de tratamento de pacientes infectados pelo HIV. Atualmente existem quatro medicamentos disponíveis para o uso da classe da integrase, Raltegravir, Elvitegravir, Bictegravir e Dolutegravir, no Brasil estão em uso na rede pública Raltegravir e dolutegravir. O objetivo desse trabalho é Avaliar a Resistência Genotípica aos medicamentos da classe da integrase em pacientes em falha virológica que faziam o uso de pelo menos um inibidor da integrase. Esses dados foram coletados no período de junho de 2015 a julho de 2019. Dos 74 pacientes com critério de inclusão de uso de pelo menos um inibidor da classe da integrase. Na análise dos subtipos da região da integrase o subtipo B foi o mais prevalente, seguido do F e BF, o subtipo c apareceu somente em três casos. Das 74 sequências analisadas, 34 (46%) sequências apresentaram mutações associada à resistência para classe da integrase, das mutações principais a mais frequente foi a Q148H seguida da G140S e N155H. A G140S apareceu todas às vezes associada a Q148H, essa associação (Q148H+G140S) esteve presente em 18 sequências. Quanto à análise do perfil de mutação em relação aos medicamentos específicos a porcentagem de resistência entre dolutegravir e Bictegravir foicomparável em todos os níveis de resistência, apresentando níveis de resistência menores em relação ao Raltegravir e Elvitegravir. O Raltegravir foi o fármaco que apresentou maior nível de resistência na categoria de alto nível de resistência, mas não apresentou resistência baixa nem intermediária. Nossos resultados mostram que o monitoramento das mutações é importante para a detecção precoce da falha do tratamento com RAL para evitar o acúmulo de mutações, e preservar a atividade de dolutegravir o acompanhamento destas mutações se faz necessárias, porque essas mutações prejudicam ação do medicamento de forma parcial ou total. A identificação dos subtipos leva a estratégias epidemiológicas mais eficazes e contribui para a escolha de esquemas de tratamentos mais efetivos. O uso do Raltegravir prévio favorece a

resistência ao Dolutegravir, que em nosso estudo não foi observada em nenhum caso que utilizou apenas este INI no seu histórico de medicamentos ARVs.

Palavras-chave: antirretrovirais, HIV, integrase, resistência.

ABSTRACT

Integrase, a key enzyme in the replicative cycle of HIV, is a target for arv therapy that has been very promising. The enzyme is responsible for integrating proviral DNA into host cell DNA. It is therefore a potential drug for both rescue therapy and first-line use in treating HIV-infected patients. There are currently four drugs available for use in the integrase class, Raltegravir, Elvitegravir, Bictegravir and Dolutegravir, in Brazil are in use in the public network Raltegravir and dolutegravir. The aim of this paper is to evaluate Genotypic Resistance to integrase class drugs in patients with virologic failure who were using at least one integrase inhibitor. These data were collected from June 2015 to July 2019. Of the 74 patients with inclusion criteria for use of at least one integrase class inhibitor. In the analysis of subtypes of the integrase region, subtype B was the most prevalent, followed by F and BF, subtype c appeared only in three cases. Of the 74 sequences analyzed, 34 (46%) sequences showed integrase resistance-associated mutations. Of the major mutations, Q148H followed by G140S and N155H.A G140S appeared every time associated with Q148H, this association (Q148H + G140S) was present in 18 sequences. In the analysis of the mutation profile in relation to specific drugs, the resistance percentage between dolutegravir and Bictegravir were comparable in all resistance levels, presenting lower resistance levels compared to Raltegravir and Elvitegravir. Raltegravir was the drug that presented the highest resistance level in the high resistance category, but did not present low or intermediate resistance. Our results show that mutation monitoring is important for early detection of ADR treatment failure to prevent mutation accumulation, and preserving the activity of dolutegravir follow-up of these mutations is necessary because these mutations impair drug action in such a way. partial or total. Identification of subtypes leads to more effective epidemiological strategies and contributes to the choice of more effective treatment regimens. The use of previous Raltegravir favors resistance to Dolutegravir, which in our study was not observed in any case that used only this INI in their history of ARVs.

Key words:antirretroviral, HIV, integrase, resistance.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Histórico e Dados Epidemiológicos	13
1.2. Agente Etiológico	14
1.2.1. Morfologia e Classificação do HIV-1	14
1.3. Ciclo Replicativo	15
1.4. Terapia Antirretroviral (TARV)	16
1.5. Integrase	19
1.5.1. Raltegravir	21
1.5.2. Elvitegravir	21
1.5.3. Bictegravir	22
1.5.4. Dolutegravir	22
1.6. Mutações de resistência associadas aos Inibidores da Integrase (INI)	23
2. OBJETIVOS	24
2.1. Objetivo Geral	24
2.2. Objetivo Específicos	Erro! Indicador não definido.
3. METODOLOGIA	25
3.1. População de Estudo	25
3.2. Metodologia Laboratorial	25
3.2.1. Amostra Biológica	25
3.2.2. Extração e Quantificação do RNA viral	26
3.2.3. Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)	26
3.2.4. Sequenciamento dos produtos amplificados	28
3.3. Análises Moleculares	29
3.3.1. Subtipo Viral	29
3.3.2. Grau de Susceptibilidade aos Antirretrovirais	29
3.3.3. Avaliação das Mutações de Resistência	29
3.4. Análises Estatísticas	29
4. RESULTADOS	30
4.1. População do estudo	30
5. DISCUSSÃO	33
6. CONCLUSÕES	37
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico e Dados Epidemiológicos

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) é o agente causador da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). Os primeiros casos de AIDS foram diagnosticados no início da década de 80 nos Estados Unidos (EUA), quando um número crescente de homens que faziam sexo com homens (HSH) que não apresentavam história pregressa de imunodeficiência, começaram a apresentar sarcoma de kaposi, pneumonia causada por *pneumocystis carinii* e um importante comprometimento do sistema imune (CDC 2019).

A doença se expandiu rapidamente tornando-se uma epidemia mundial. Em 1983 foi identificado o agente etiológico, tratava-se de um retrovírus conhecido hoje como HIV-1 e em 1986 foi identificado o segundo agente etiológico também pertencente à família Retroviridae, similar ao HIV-1, denominado HIV-2, que quando comparado ao primeiro é considerado menos agressivo (Brasil, 20019). O HIV tipo 1 é responsável pela maioria dos casos de infecção por HIV no mundo (Santos et al.,2014).

Segundo dados globais do Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS (UNAIDS, 2019), estima-se que atualmente há 37,9 milhões de pessoas em todo o mundo vivendo com HIV-1. Desde o início da epidemia,74,9 milhões de pessoas foram infectadas pelo vírus e 32 milhões de pessoas morreram em decorrência da AIDS, sendo a África Subsaariana o local com maior número de casos. Em 2018 havia cerca de 1,7 milhão de novas infecções por HIV-1 no mundo em comparação com 2,9 milhões em 1997.

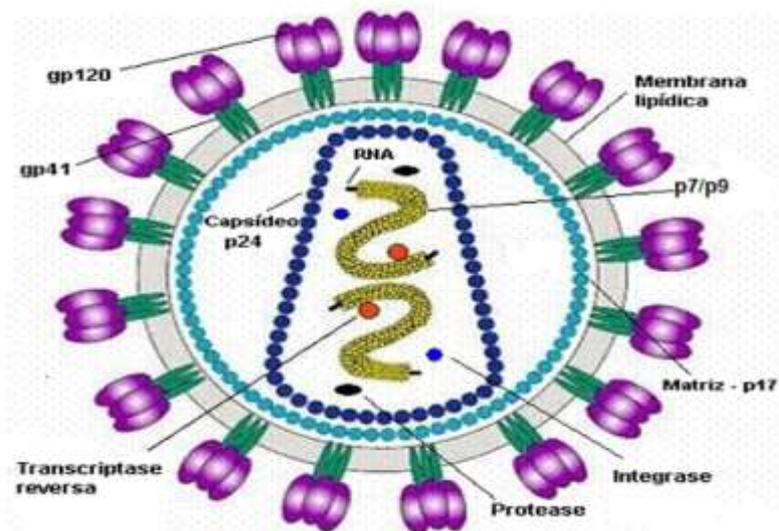
No Brasil, de 2007 até junho de 2018, foram notificados 247.795 casos de infecção pelo HIV-1, sendo a região sudeste a que apresenta o maior número de casos. Desde o ano de 2012, observa-se uma diminuição na taxa de detecção do HIV no Brasil, que passou de 21,7/100.000 habitantes do ano para 18,3/100.000 habitantes em 2017, configurando um decréscimo de 15,7%; A detecção precoce do vírus e o início do tratamento mais cedo são responsáveis pela redução dos casos de AIDS (Brasil, 2018).

1.2. Agente Etiológico

1.2.1. Morfologia e Classificação do HIV-1

O HIV é um retrovírus, pertencente ao gênero *Lentivirus* da família *Retroviridae*, com genoma composto por duas fitas simples de RNA capaz de provocar infecções persistentes e com evolução lenta. Apresenta forma esférica de 100 a 120 nm de diâmetro (Sierra et al,2005). Em sua superfície encontra-se o envelope viral, proveniente da célula hospedeira, composto por lipídios e proteínas e constituído por duas glicoproteínas a gp120 e a gp41. A gp120 se encontra mais externamente, responsável pela ligação do vírus com a célula hospedeira, que está ligada a gp 41 por uma transmembrana que atravessa o envelope viral. Internamente, possui um segundo envoltório, uma estrutura proteica denominada matriz (p17) que tem como função proteger o capsídeo viral. A proteína p24 forma o nucleocapsídeo viral, onde se encontram as duas fitas de RNA, a enzima transcriptase reversa (RT), integrase (IN) e a protease (PT) (Fanales-Belasio, 2010; Engelman&Cherepanov,2012) que irão atuar na replicação viral (Figura1).

Figura 1: Estrutura do vírus HIV-1



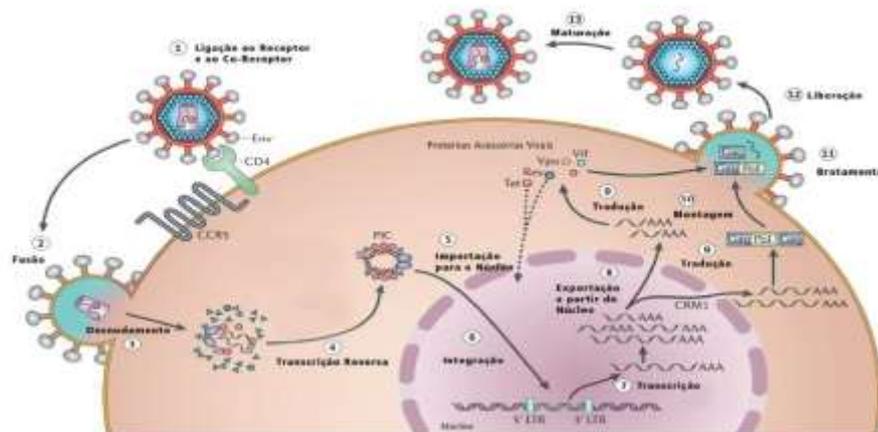
Fonte: (Adaptado de <https://web.stanford.edu/group/virus/retro/2005gongishmail/HIV.html>)

O genoma do HIV mede cerca de 9,8 Kb (Kilobases), composto por genes que ficam localizados na região denominada Long Terminal Repeat (LTR), são classificados em genes estruturais, regulatórios e acessórios. Os três genes estruturais são: *gag*, *env* e *pol*. O gene *gag* codifica proteínas que dão origem da matriz proteica (p17), o capsídeo viral (p24) e as proteínas nucleares (p7e p9). O

DNA de fita dupla liga-se a integrase e juntos migram para o núcleo, dentro do núcleo a enzima integrase do HIV integra o DNA do vírus ao DNA da célula hospedeira, que passa a ser chamado de provírus, o vírus então passa a controlar a síntese celular, iniciando, no núcleo da célula hospedeira a produção de RNA que será utilizado na síntese de proteínas e do genoma viral que irão compor novas partículas virais.

Todos os RNAs produzidos saem do núcleo, indo para o citoplasma da célula, onde ocorre a produção de proteína virais que são quebradas em subunidades, através da enzima protease. As proteínas virais produzidas são responsáveis pela produção de novos genomas virais e pela formação da estrutura viral externa, formando novas partículas virais que serão liberadas pela célula hospedeira (Cunico et al,2008) (Figura 3).

Figura 3: Ciclo Replicativo do HIV-1.



Fonte: Manual Técnico para o Diagnóstico da Infecção pelo HIV em Adultos e Crianças.

1.4. Terapia Antirretroviral (TARV)

Os antirretrovirais (ARV) são medicamentos usados no tratamento do HIV-1 e agem bloqueando as diferentes fases do ciclo de replicação do vírus no hospedeiro. O tratamento com os ARVs tem modificado a história natural da doença, aumentando o tempo e a qualidade de vida das pessoas vivendo com HIV/AIDS (PVHIV). O primeiromedicamento que surgiu na década de 1980 foi o Zidovudina (AZT) sendo o primeiro inibidor da transcriptase reversa análogo de nucleotídeo (ITRN) indicado para o tratamento de AIDS (Vinicius,2002).

Com o desenvolvimento de novas drogas nos anos seguintes, o tratamento passou a ser composto por dois medicamentos, terapia dupla, com o uso de dois ITRN. (Roberta et al,2006). Em 1995 foi aprovado o primeiro inibidor da protease (IP), e em 1996 com o surgimento de novos antirretrovirais, foram criadas estratégias terapêuticas através da terapia tripla, composta por dois ITRN e um IP ou dois ITRN e um ITRNN (Jota, 2002; Roberta et al,2006; Rossi,2012) que é conhecida como terapia Antirretrovira IAltamente Eficaz (HAART, do inglês Highly active anti-retroviral therapy). Hoje no Brasil,segundo o Protocolo Clínicas e Diretrizes Terapêuticas (PCDT) do Ministério da Saúde (2018) para manejo da infecção pelo HIV-1 em adulto,o tratamento deve incluir combinações de dois ITRNs associados a uma outra classe de antirretrovirais (ITRNN, IP/r ou INI). Essa terapia tripla modificou a evolução para AIDS ajudando a potencializar o tratamento, suprimindo o HIV, atuando na melhora do quadro clínico do pacientee aumentando a expectativa de vida das PVHIV/AIDS(Jota ,2002).

No Brasil, o Ministério da Saúde (MS), através da política de medicamentos de AIDS tem garantido o acesso universal à terapia antirretroviral gratuita desde 1996, com a publicação da Lei 9.313(Coutinho, 2018; Brasil, 2008),sendo o primeiro país em desenvolvimento a adotar uma política pública de acesso à Terapia Antirretroviral (Brasil, 2008).

O momento propício para o início da terapia antirretroviral ainda é uma questão que causa inúmeras discussões. A contagem de TCD4⁺ é o indicador mais importante para definir o início do tratamento e avaliar o risco de progressão para AIDS e morte(MS, 2013), mas desde 2013, através do SUS, é garantido tratamento para todas as pessoas vivendo com HIV independentemente da contagem de TCD4+ (Coutinho, 2018; Brasil,2018)

O tratamento dos indivíduos infectados não erradica a infecção, mas impede a replicação do vírus, suprimindo a carga viral (CV) plasmática (Brasil, 2013). O sucesso do tratamento é alcançado pela indetecção de CVapós seis meses do início ou troca do esquema TARV, após ter atingido carga viral indetectável e/ou por não surgirem doenças associadas ao HIV/Aids, que pode ser consequência da má adesão ao tratamento, resistência viral ou baixa potência do regime de tratamento (Brasil,2018).

Atualmente existem vários medicamentos disponíveis para o tratamento do HIV-1, distribuídos em classes de antirretrovirais que interferem em diferentes fases de ciclo de vida do vírus. As classes de antirretrovirais estão divididas em: inibidores de transcriptase reversa análogos de nucleotídeos e nucleotídeos (ITRN), Inibidores de Transcriptase Reversa Não análogos de Nucleotídeos (ITRNN), Inibidores de Protease (IP), inibidores de fusão antagonistas de CCR5 e inibidores da integrase (INI) (Levy, 2010).

Os ITRNs são moléculas análogas aos nucleotídeos da célula, com ausência do grupo hidroxila na posição 3', o que impede a inserção de novos nucleotídeos, interrompendo a continuidade da transcrição. (Clavel e Hance, 2004). Os ITRNNs agem diretamente na enzima transcriptase reversa, são inibidores não competitivos, que se ligam a um sítio alostérico da enzima transcriptase reversa e essa ligação reduz a mobilidade e flexibilidade da enzima, interferindo na atividade de transcrição do RNA viral em DNA (Cunico et al,2008; Clavel e Hance,2004).

Os ARVS da classe dos IPs inibem o sítio ativo da enzima e impedem a liberação de proteínas resultando na formação de um vírus imaturo e não infeccioso (Cunico W et al,2008; Clavel e Hance,2004). Os inibidores de fusão atuam no domínio HR1 da glicoproteína gp41, sendo essa glicoproteína responsável pela fusão da membrana viral com a célula. O Enfuvirtide (T-20) é o único medicamento desta classe licenciado para uso clínico (Clavel e Hance,2004). Os antagonistas CCR5 são fármacos que impedem a ligação do vírus a correceptores estruturais da célula hospedeira. O Maraviroque é o único antagonista licenciado para uso clínico até o momento, efetivo somente em vírus R5, sendo necessário a determinação do tropismo através da realização de um teste fenotípico ou genotípico para determinar a presença de variantes CCR5 (McArthur,2008). A tabela 1 mostra os ARVs descritos acima.

Tabela 1: Principais antirretrovirais das classes dos ITRN, ITRNN, IP e inibidores de entrada (IE).

ITRN	ITRNN	IP	IE
Zidovudina (AZT)	Neviparina (NVP)	Atazanavir (ATV)	Enfuvirtida (T-20)
Abacavir (ABC)	Efavirenz (EFV)	Darunavir (DRV)	Maraviroque (MVQ)
Tenofovir (TDF)	Etravina (ETR)	Ritonavir (RTV/r)	

Lamivudina (3TC)	Tipranavi (TPV)
	Lopinavir (LPV/r)

Integrase

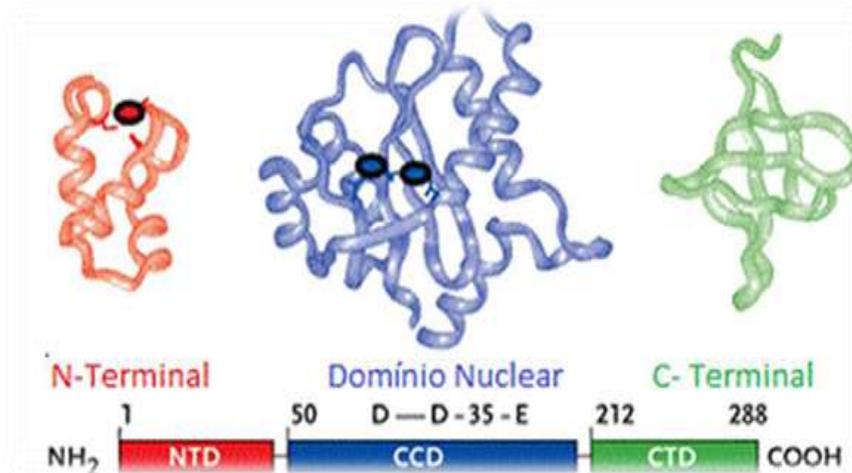
A integrase é um alvo que tem se mostrado muito promissor, é uma enzima fundamental no ciclo replicativo do HIV, sendo responsável pela inserção do DNA viral ao genoma da célula hospedeira, permitindo assim a continuidade do ciclo replicativo do vírus.

A enzima integrase tem 32 KDa, possui 288 aminoácidos codificados pelo gene *Pol* do HIV-1, sendo constituída por três domínios: N-terminal composto pelos aminoácidos 1 ao 50 e possui regiões que são altamente conservadas (H12, H15, C40, e C43) que se ligam ao Zn^{+2} , promovendo a multimerização da integrase (Santos et al,2014)

O domínio catalítico, é composto pelos aminoácidos 51 até o 212 e também possui regiões altamente conservadas (D64, D116 e E152) (Santos et al,2014)

O último domínio constituído pelos aminoácidos 213 até o 288, é o C-terminal, que se liga ao DNA do hospedeiro de forma inespecífica e orienta a ligação do DNA viral durante o processo de integração (Chiu et al ,2004; Santos et al,2014) (Figura4).

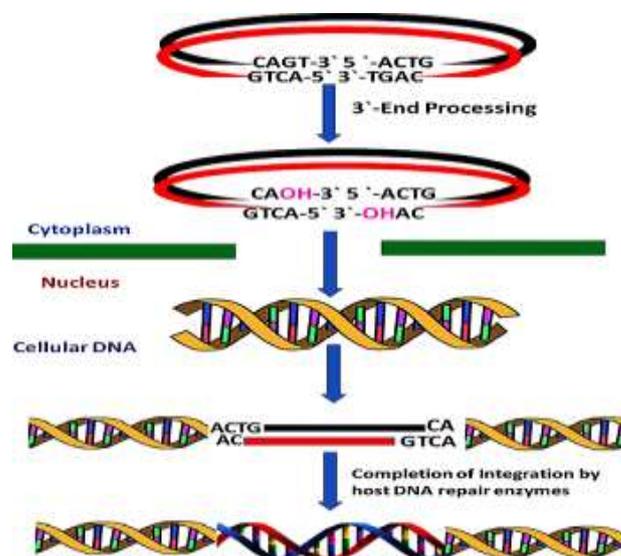
Figura 4: Representação esquemática dos domínios estruturais da enzima integrase.



Fonte: (Adaptado de LOW; MUESING, 2006)

A integração se inicia no citoplasma da célula, com a formação de um complexo estável do DNA viral dupla hélice com regiões LTR, posteriormente ocorre a remoção de dois nucleotídeos de cada extremidade 3' que expõe o grupo OH 3' terminal dinucleotídeo CA, o grupo hidroxila do terminal 3'-OH será o nucleófilo que a integrase necessita para a reação de transferência de cadeia, que ocorre após a entrada do complexo de pré integração no núcleo (santos et al,2014) que consiste na junção das terminações 3'-OH do DNA viral com 5'-fosfato do DNA do hospedeiro, seguidas de etapas de reparação e ligação, a etapa de reparo das fitas é provavelmente catalisada por enzimas da célula hospedeira (Temesgen & Siral,2008; Santos et al, 2014).

Figura 5: Integração do cDNA ao genoma do vírus através da integrase



Fonte: Artigo Pankaj Wadhwa et al ,2018

Vários motivos fazem os inibidores da integrase uma classe promissora no tratamento da infecção pelo HIV; em primeiro lugar a células humanas não apresentam enzimas integrase, o que faz da classe uma enzima específica contra o vírus e com menor toxicidade se comparado aos outros fármacos (TR ou IP), por exemplo, além de apresentar atividade contra cepas resistentes aos ITRN e IP (Santos et al, 2014), portanto, são drogas fundamentais para o esquema de resgate (Nunes,2016). Por ser uma enzima mais conservada tem menor variabilidade genética e maior dificuldade para apresentar mutações associadas com a resistência (Esprinz,2016).

Atualmente existem quatro medicamentos da classe de inibidores da integrase, como citados na tabela a seguir:

Tabela 2: Nomes e siglas dos antirretrovirais da classe da Integrase.

Inibidores da Integrase	
<i>Nome</i>	<i>Sigla</i>
Bictegravir	BIC
Dolutegravir	DTG
Elvitegravir	EVG
Raltegravir	RAL

Fonte: Autor,2019.

1.4.1. Raltegravir

O Raltegravir (RAL), Conhecido pelo nome comercial de Isentress® produzido pela MERCK & CO.,(Espeseth,2000) aprovado em outubro de 2007 pelo FDA, e no Brasil incluído na terapia antirretroviral no final de 2008 para o resgate de pacientes multifalhados (Brasil,2008), sendo um medicamento usado tanto em adultos como em crianças.

1.4.2. Elvitegravir

O Elvitegraviré um IN que se liga aos cátions de magnésio e inibe a reação de transferência das fitas de DNA viral ao genoma hospedeiro (Bhattacharya et al ,2009).

Foi o segundo inibidor da integrase aprovado e liberado para uso clínico (Sprinz,2016), apresenta uma vantagem sobre o Ral, podendo ser utilizado apenas 1 x ao dia, o Elvitegravir quando administrado juntamente com Ritonavir(r) ou Cobocistat (COB), desenvolvido pela Gilead Science, que age como um reforço farmacológico inibindo o citocromo P450, apresenta uma atividade superior (Elion et al,2011; Sprinz,2016).

1.4.3. Bictegravir

Um novo antirretroviral, fabricado pela Gilead Sciences, com o nome comercial de *Biktarvy*, co-formulado , em um único comprimido apresenta uma combinação tripla de 50mg de Bictegravir(BIC), Emtricitabina(FTC),200mg de tenofovir alafenamida (TAF) 25mg. No Brasil ainda não é utilizado, ele recebeu aprovação regulatória da Agencia Europeia de medicamentos em julho de 2018 e também é aprovado nos Estados Unidos (aidsmap,2018) Biktarvy é indicado nos EUA como um regime completo para o tratamento da infecção pelo HIV-1 em pacientes virgens de tratamento, também é indicado para pacientes adultos que são virologicamente suprimidos com carga viral estável por pelo menos 3 meses que não apresentam histórico de falha no tratamento com o uso de Biktarvy(FTC,TAF)(Gilead Sciences,2019).

1.4.4. Dolutegravir

Dolutegravir (DTG) faz parte de uma nova geração de medicamentos com uma melhor barreira genética, que possibilita ser administrado uma vez ao dia, sem uso de booster, sua alta barreira genética diminui as chances de provocar resistência (Nunes,2016; Kbayashiet al,2011). Um medicamento que foi desenvolvido pelas indústrias Shionogi, GlaxoSmithKline e ViiV Healthcare, licenciado pela FDA no ano de 2013 para uso clínico em pacientes que nunca foram tratados ou multiexperimentados e pacientes com exposição ao RAL e EVG (Eron et al,2011).Em 2016 a OMS passou a recomendar o DTG como alternativa em primeira

linha de tratamento para a infecção do vírus (UNAIDS), Além disso, DTG demonstrou elevada supressão virológica nos estudos clínicos randomizados.

O DTG é um fármaco de segunda geração da classe dos inibidores de integrase e muito eficiente contra variantes virais resistentes ao Raltegravir (Canduci et al,2001; Underwood et al,2012).

1.5. Mutações de resistência associadas aos Inibidores da Integrase (INI)

A resistência aos ARVs é resultado de mutações que surgem nas enzimas virais que são alvo de agentes antirretrovirais, é um mecanismo de seleção natural ou seja, com a pressão seletiva que o vírus sofre do meio ambiente em que vive, cepas virais mais resistentes prevalecem na presença de medicamentos (Brasil,2019).

A resistência a RAL tem sido associada a vias diferentes: Q148H/K/R, N155H, T66K, G140SAC e a Y143R/C (STANFOR,2019) sendo definidas por duas ou mais mutações associadas, uma mutação principal e uma ou mais mutações acessórias, essas quando aparecem isoladas (sem a presença de mutações principais) na presença do medicamento causam pouco ou nenhum efeito na susceptibilidade aos inibidores de integrase (Cavalcanti,2015). As mutações nos códons 155, 143 e 148 tem maior efeito na susceptibilidade e se localizam próximo ao domínio catalítico da enzima. A mutação principal Q148H/R/ quando associada as mutações secundárias L74M, E138A, E138K ou G140S causam maior impacto na susceptibilidade aos antirretrovirais, A via Q148H/R/K quando presente diminui susceptibilidade a RAL e EVG (manual técnico de genotipagem,2019; (Hazuda et al ,2007; Cavalcante,2015).

A via N155H diminui a susceptibilidade para RAL e EVG e também é selecionada em pacientes fazendo uso de DTG, quando presente aparece associada a L74m, E92Q e G163R (Brasil,2019; Hazuda et al,2007).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a Resistência Genotípica aos medicamentos da classe da integrase em pacientes com falha virológica.

2.2. Objetivos Específicos

- Analisar sequências de pacientes em falha virológica geradas no IAL entre 2015 à 2019;
- Identificar os subtipos das sequências da região daIntegrase;

- Identificar as mutações associadas na alteração na susceptibilidade aos medicamentos inibidores de integrase e outras classes.

3. METODOLOGIA

3.1. População de Estudo

Neste estudo foram incluídos pacientes com exposição à terapia antirretroviral da classe dos inibidores de integrase encaminhados ao laboratório de Genotipagem do HIV, Centro de Virologia, do Instituto Adolfo Lutz (IAL) – Central, no Estado de São Paulo, no período de julho de 2015 a agosto de 2019.

3.2. Metodologia Laboratorial

3.2.1. Amostra Biológica

As amostras foram coletadas em dois tubos de sangue total contendo EDTA (ácido etileno diamino tetra acético) e encaminhadas para o laboratório em no

máximo 6 horas após a coleta. As amostras foram centrifugadas a 2000 rpm por 20 minutos para a separação do plasma. Foram separadas alíquotas de 1000ul do plasma em tubo de *eppendorf* que foram armazenadas a temperatura de -70° C até o processamento.

3.2.2. Extração e Quantificação do RNA viral

A extração do RNA viral foi realizada a partir de 140 μ l do plasma, utilizando o QIAmp Viral Mini Kit (Quiagen) de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação da carga viral (CV) foi realizada a partir do método bDNA (Versant3.0Siemens, Erlanged, Alemanha) ou Abbott Real TIME HIV-1(ABBOTT Molecular, INC).

3.2.3. Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

A amplificação da região da IN, PT e RT do HIV, a partir do RNA extraído foram realizados em duas etapas (One step RT-PCR). A primeira etapa da reação consiste na retrotranscrição e amplificação (RT-PCR) e a segunda etapa de amplificação (Nested-PCR). A tabela abaixo apresenta o protocolo da reação utilizada para região da integrase.

Tabela 3: Protocolo da Reação em Cadeia de Polimerase do gene da Integrase.

INTEGRASE			
PCR		nested-PCR	
Reagentes	1x/μL	Reagentes	1x/μL
Nuclease Free Water	25,25	Go Taq Green Master Mix 2x	12,5
10x PCR Buffer High Fidelity	5	Primer: KVL 70 10 pm/μL	1
50 mM MgSO ₄	2	Primer: KVL 84 10 pM/μL	1
10 mM dNTP	1,5	Nuclease Free Water	8
0,1 M DTT	2,5	Amostra (proveniente do 1º PCR)	2,5
Inibidor RNase (Biolabs) 40 U/μL	0,25		
RT Superscript III 200 U/μL	0,25		
Taq Platinum High Fidelity 5 U/μL	0,25		
Primer: KVL 68 10 pM/μL (F)	1		
Primer: KVL 69 10 pM/μL (R)	1		
condições de ciclagem			
	50°C - 30 minutos		94°C - 2 minutos
	94°C - 3 minutos		94°C - 30 seg
35 ciclos	94°C - 30 seg/ 53°C - 30 seg	35 ciclos	53°C - 30 seg
	68°C - 2 min. e 30 seg		72°C - 1 min. e 30 seg.
	68°C- 10 min.		72°C- 7min.
Primers	sequência(5' - 3')	Primes	sequência(5' - 3')
KVL 68	AGGAGCAGAACTTCTATGTAGATGG	KVL 70 (F)	TTCRGGATYAGAAGTAAAYATAGTAACAG
KVL 69	TTCTTCCTGCCATAGGARATGCCTAAG	KVL 84 ()	TCCTGTATGCARACCCCAATATG

Fonte: Autor, 2019.

Os genes PT e RT foram amplificados utilizando o TRUGENE HIV-1 Genotypic Assay OpenGeneR DNA System (Siemens Helthcare Diagnostics, Tarrytown, NY) ou por metodologia *in house* de One Step RT-PCR descrita na tabela abaixo:

Tabela 4: Protocolo da Reação em Cadeia de Polimerase do gene da Polimerase.

Polimerase- PT/RT			
PCR		nested-PCR	
Reagentes	1x/μL	Reagentes	1x/μL
Nuclease Free Water	26,25	Go Taq Green Master Mix 2x	12,5
10x PCR Buffer High Fidelity	5	Primer: PR3 10 pm/μL	1
50 mM MgSO ₄	2	Primer: RT12 10 pm/μL	1
10 mM dNTP	1,5	Nuclease Free Water	8
0,1 M DTT	2,5	Amostra (proveniente do 1º PCR)	2,5
Inibidor RNase (Biolabs) 40 U/μL	0,25		
RT Superscript III 200 U/μL	0,25		
Taq Platinum <i>High Fidelity</i> 5 U/μL	0,25		
Primer: GAG2 (F) 10 pm/μL	1		
Primer: RT137 (R) 10 pm/μL	1		
condições de ciclagem			
	50°C - 30 minutos		94°C - 3 minutos
	94°C - 5 minutos		94°C - 30 seg
18 ciclos	94°C - 30 seg/ 50°C - 30 seg	35 ciclos	55°C - 30 seg
	68°C - 2 min. e 30 seg		72°C - 1 min. e 30 seg.
			72°C - 10 min.
17 ciclos	94°C - 30 seg/ 53°C - 30 seg		72°C 10 min.
	68°C - 2 min. e 30 seg.		
	68°C-10 min.		
Primers	sequência(5' - 3')	Primes	sequência(5' - 3')
GAG2	GAGGAAGCTGCAGAATGGG	PR3	AGAGCCAACAGCCCCACCA
RT137	TTCTGTATGTCTTGCAGTCCAGC	RT12	ATCAGGATGGAGTTTCATAACCCATCCA

Fonte: Autor,2019.

Os produtos do *Nested* PCR da INT, PT e RT foram quantificados por gel de agarose a 1%, Em tampão TBE (Tris/Borato/EDTA) 0,5X corado com Sybr SafeR (Life Technologie, USA) utilizando Low DNA Mass Ladder (Life Technologies, USA) como marcador.

3.2.4. Sequenciamento dos produtos amplificados

Os produtos amplificados das regiões da INT, PT e RT foram sequenciados através do Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready REACTION-ABI PrismR (Life Technologies, USA). Para cada região amplificada foram utilizados quatros primes com volume final de 10ul por reação. As condições de ciclagem utilizadas foram 25 ciclos de 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos.

A purificação e do produto das reações de sequenciamento dos genes da IN, PT e RT foram realizadas com etanol e acetato de sódio de acordo com o protocolo recomendado pela Life Technologies. Após a etapa de precipitação adicionou-se 10ul de Formamida HIDI (Life Technologies, USA) para cada amostra, em seguida foram desnaturadas em termociclador a 95°C por 3 minutos e imediatamente resfriada em gelo para serem sequenciadas utilizando o analisador automático

ABI3130XL Genetic Analyzer (Life Technologies, USA). Os cromatogramas foram analisados utilizando o software Sequencher 4.7 (Benevides, USA).

3.3. Análises Moleculares

3.3.1. Subtipo Viral

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

3.3.2. Grau de Susceptibilidade aos Antirretrovirais

A determinação da susceptibilidade do vírus aos diferentes fármacos foi determinada segundo o algoritmo Stanford HIVdb. A susceptibilidade aos antirretrovirais foram pontuadas para cada ARV disponível. A pontuação de cada medicação utilizado por cada paciente foi calculada de acordo com os cinco níveis possíveis de susceptibilidade e resistência determinada pelo site: 1 ponto se o ARV apresentou susceptibilidade; 0,75 resistência potencialmente baixa; 0,5 baixo nível de resistência; 0,25 resistência intermediária e 0 alto nível de resistência.

3.3.3. Avaliação das Mutações de Resistência

As mutações associadas à resistência aos INIs, IP, NRTI, NNRTI foram determinadas a partir do algoritmo de Stanford HIVdb

Análises Estatísticas

Os dados foram analisados no programa estatístico Stata v10 (Stata Corp, USA). Os resultados das variáveis contínuas foram expressos como mediana e intervalo interquartil (IQR: 25th-75th).

4. RESULTADOS

4.1. População do estudo

Neste trabalho foram incluídos um total de 74 sequência genéticas, multifalhados do estado de São Paulo, incluídos entre os anos de 2015 a 2019. Esta população era 60,3% (44) do sexo masculino, com idade mediana de 45 anos (34-51). Apresentavam viremia com mediana de 3,26 log e contagem de células TCD4 de 269 células/mm³ a tabela abaixo apresenta os resultados demográficos, clínicos e um resumo dos achados das sequencias analisadas.

Tabela 5: Características demográficas e laboratoriais no momento da inclusão dos pacientes multifalhados com exposição a pelo menos um Inibidor da Integrase.

Variáveis	Total
Número de Pacientes	74
Sexo Masculino (%)	44 (60,3%)
Idade (em anos)	45 (34 - 51)
Número de Esquemas	6 (4 - 7)
Contagem de T CD4+ ¹	269 (156 - 433)
CV de HIV -1 RNA ²	3,26 (2,63 -4,49)
Subtipos (%)	
HIV-1 B	63 (85,1%)
HIV-1 C	3 (4,1%)
HIV-1 F	4 (5,4%)
HIV-1 BF	4 (5,4%)
Mutações (%)	
ITRN	49 (78,0%)
ITRNN	39 (62,0%)
IP	36 (57,0%)
INT	34 (46,0%)

¹céls/mm³

²log10

Resultados expressos como mediana e amplitude interquartil

Mutações de acordo com o Stanford HIV Resistancedb

TARV: Terapia Antirretroviral; CV: Carga Viral; ITRN: Inibidores da Transcriptase Reversa de

Nucleosídeos; ITRNN: Inibidores da Transcriptase Reversa Não-análogos de Nucleosídeos;

IP: Inibidores da Protease; INI: Inibidores da Integrase.

O subtipo B foi presente em 63 sequências (85,1%) do gene da integrase seguido do subtipo C presente em 3 sequências (4,1%) , sequências do subtipo F

foram encontradas em 4 sequências (5,4%) e a forma recombinante BF também em 4 sequências.

Das 74 sequências analisadas, 46% (34/74) apresentaram mutações associada à resistência para classe da integrase. Desses 74 pacientes em uso de inibidores de integrase apresentaram mutações para ITRN 78% (49/74) enquanto que 39 apresentaram mutações para ITRNN 62% (39/74) Já na classe dos IPs 57% de sequências (36/74) foi identificada alguma DRM.

Das 34 sequências que apresentaram mutações para classe dos inibidores da integrase, os ITRN (24/34) foi a classe que mais apresentou mutações, seguido da classe dos IPs (20/34) e ITRNN foi a classe que menos apresentou mutação (17/34).

Das mutações principais para INI a mais frequente foi a Q148H seguida da G140S e N155H. A G140S apareceu todas as vezes associada a Q148H, essa associação (Q148H+G140S) esteve presente em 18 sequências. As mutações acessórias que mais apareceram foi a mutação T97A sempre associada a N155H, outras mutações observadas com o códon N155H foram: G163R, G140S, Q148H, E138AT, E157Q e Y143R. As acessórias menos frequentes foi A128T e a G149G/A. A tabela abaixo ilustra a frequência de mutações.

Tabela 6: Mutações principais e acessórias da região da Integrase.

Mutações da Integrase		Número (%)
Principais		
E138KAT		7 (9,33%)
G140SA		18 (24,00%)
Y143R		2 (2,67%)
S147G		2 (2,67%)
Q148HR		19 (25,33%)
N155H		14 (18,67%)
Acessórias		
A128T		1 (1,33%)
D232N		2 (2,67%)
E157Q		3 (4,00%)
G163R		4 (5,33%)
G149GA		1 (1,33%)
T97A		9 (12,00%)
V151I		3 (4,00%)

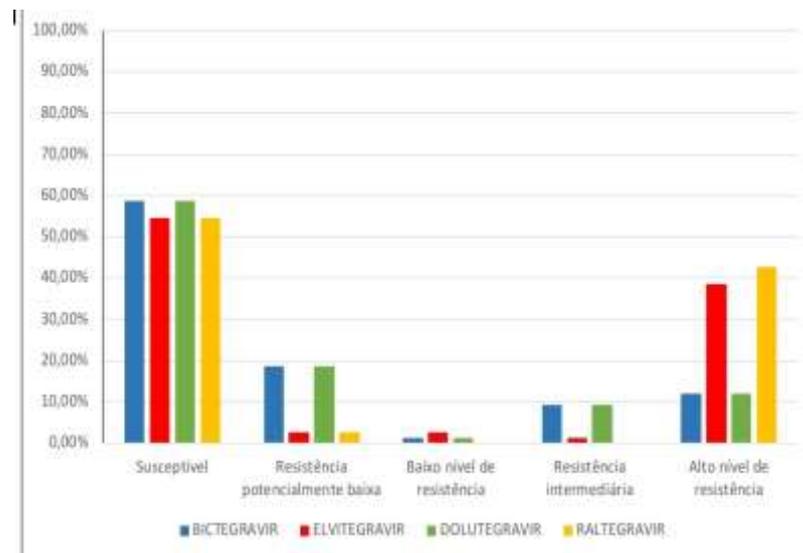
Dos 74 pacientes analisados 57 estavam em uso de RAL, 10 pacientes usaram RAL e passaram a usar DTG, 6 pacientes fizeram uso de DTG.

Tabela 7: Percentual do uso de Raltegravir e Dolutegravir.

Variáveis	%	% com Mutação
Uso de RAL	57 (77,0%)	27 (79,0%)
Uso de DTG após RAL	10 (13,5%)	6 (17,7%)
Uso de DTG	6 (8,1%)	0 (0,0%)
Uso de RAL após DTG	1 (1,4%)	1 (100,0%)

Quando se analisa o perfil de mutação em relação aos medicamentos específicos, notamos que existe uma variação do impacto destas mutações na atividade dos medicamentos. Como descrito na metodologia, o gss resume este efeito. O gráfico abaixo mostra os GSS em pacientes que fizeram o uso de inibidores da integrase.

Gráfico de Grau de Susceptibilidade Genotípica (GSS) de acordo com cada antirretroviral dos Inibidores da Integrase



A porcentagem de resistência entre dolutegravir e Bictegravir foram comparáveis em todos os níveis de resistência, apresentando níveis de resistência menores em relação ao Raltegravir e Elvitegravir.

O Raltegravir foi o fármaco que apresentou maior nível de resistência na categoria de alto nível de resistência, mas não apresentou resistência baixa nem intermediária. O Elvitegravir apresentou uma porcentagem 5% menor no alto nível de resistência em relação ao Raltegravir.

5. DISCUSSÃO

A integrase uma enzima importante como alvo terapêutico para controle da epidemia. O impacto da variabilidade genética na evolução da resistência ainda é caracterizado. Esta uma das principais características do HIV-1, sendo o monitoramento dessa diversidade genômica fundamental para uma efetiva epidemiologia molecular e monitoramento da emergência das resistências. Hoje existem descritos na literatura 9 subtipos (variando de A-K) além de formas recombinantes circulantes (CRF) (Riedel,2015).

Em nosso estudo o subtipo B foi presente na maioria das seqüências, sendo que os subtipos F e recombinante BF também foram identificados. O subtipo C foi o menos frequente, presente em 3 casos. No estudo Silva, 2019 o subtipo B é o mais predominante no Brasil, seguido da forma recombinante BF e F, na análise do estudo IAMARINO et al, (2012) realizado no estado de São Paulo, das 157 seqüências analisadas, também prevaleceu o subtipo B (128), o subtipo C foi identificado em apenas uma seqüência. Segundo BRIGIDO et al,2010 há um crescimento do subtipo C entre os casos que falharam na terapia no estado de São Paulo.

O impacto da variabilidade genética na evolução da resistência ainda é caracterizado. Esta uma das principais características do HIV-1, sendo o monitoramento dessa diversidade genômica fundamental para uma efetiva epidemiologia molecular e monitoramento da emergência das resistências. Hoje existem descritos na literatura 9 subtipos (variando de A-K) além de formas recombinantes circulantes (CRF) (Riedel,2015).

Nas 74 amostras foi observada uma alta taxa de mutações de resistência para classes de ITRN, ITRNN e IP e 46% (34/74) da população analisada neste estudo tem alguma mutação de resistência para região da integrase, das seqüências com mutação para INI a classe ITRN foi a classe que mais apresentou mutações. Raltegravir foi a primeira droga de INIs a ser usada no Brasil para o tratamento da

infecção pelo HIV-1, através de estudos clínicos mostrou-se uma droga com bom perfil de resistência e uma queda rápida da carga viral do indivíduo e a partir de outros estudos foi relatado a limitada barreira genética contra mutações de resistência e falhas do tratamento em esquemas contendo RAL (Sprinz,2016).

O quanto antes for detectado a falha do tratamento em esquemas que utilizam RAL maior a chance para preservar a atividade de dolutegravir

No estudo clínico SPRING-2 um total de 822 pacientes foram separados randomicamente para receberem dolutegravir 50 mg uma vez ao dia ou RAL (400mg) em combinação temofovir/Emtricitabina ou Abacavir/lamivudina, na semana 48 ,82% dos que fizeram uso de dolutegravir e 71% no grupo RAL alcançaram níveis indetectáveis, comprovando a não inferioridade de dolutegravir (ANTUNES ,2017).

A avaliação das mutações em pacientes com falha virológica que utilizam outras classes de medicamentos permite avaliar a necessidade de incorporação de novos medicamentos que tornem o esquema mais efetivo, como por exemplo, os medicamentos de novas classes, principalmente nos casos em que ocorre múltiplas falhas, quando as opções de ARV já se encontram bastante limitadas pela presença de diferentes mutações de resistência. O surgimento de resistência a medicamentos dessa classe pode ser um problema, uma vez que pacientes resistentes as terapias atualmente utilizadas, como inibidores da transcriptase reversa e protease, podem se beneficiar do tratamento com inibidores de integrase através da terapia de resgate, e a diminuição da atividade desta classe neste caso pode trazer consequências negativas ao controle da epidemia. Os ITRN apresentam uma barreira genética pequena, basta uma ou duas mutações no seu sitio de ligação para que seja selecionado um alto nível de resistência a todos os antirretrovirais desta classe (Silva, 2009), já os IP apresentam em geral uma maior barreira genética quando comparados ás classes dos ITRN e ITRNN sendo necessária uma quantidade maior de mutações para que ocorra a perda completa de susceptibilidade. (Moola, 2016). Estudos em adultos mostraram que Ral é efetivo tanto pra o HIV-1 selvagem como contra as cepas resistentes aos IP, ITRN e ITRNN e em adultos virgens experimentados em TARV (Brasil, 2008).

O INI dolutegravir, por exemplo, é um fármaco com uma boa atuação na supressão da replicação viral, utilizado em combinação com fármacos de outras classes apresenta um bom desempenho.

No estudo clínico SINGLE foram incluídos 822 indivíduos separados randomicamente, um grupo recebeu uma vez ao dia 50 mg de dolutegravir juntamente com Abacavir/lamivudina (ABC/3TC) e o outro Efavirenz/tenofovir/Emtricitabina (EFV/TDF/ETC), em um comprimido único, até a semana 144 ,71% dos pacientes que receberam dolutegravir alcançaram níveis indetectáveis, enquanto que os pacientes que receberam (EFV//TDF/ETC) 63%. (ANTUNES, 2017). O ensaio clínico FLAMINGO também mostrou superioridade do tratamento com 50mg uma vez ao dia com dolutegravir quando comparado ao tratamento com darunavir/ritonavir (800,100mg) uma vez ao dia (ambos associados com tenofovir/Emtricitabina ou Abacavir /lamivudina). Na semana 96 ,80% no grupo de dolutegravir e 68%no grupo darunavir/ritonavir alcançaram níveis indetectáveis(Cloutet et al,2004; ANTUNES,2017)

Neste estudo além das mutações que conferem resistência para Raltegravir Q148H/R/K, N155H, Y143R/H/K, G140S/A, Também estavam presente as mutações E138KAT e S147G que de acordo com o algoritmo de Stanford HIV db, 2019 são consideradas mutações principais deresistência aos INI. As mutações E92Q e T66 não foram observadas neste estudo.Foi observado que a mutação N155H apareceu na maioria das vezes com a mutação T97A que sozinha tem um efeito mínimo, mas em combinação com outras mutações principais impacta negativamente sobre a atividade de RAL e susceptibilidade de DTG (Brasil, 2019),O EVG não foi incluído neste estudo porquê no Brasil não está disponível. No estudo realizado por CAVALCANTI et al, 2015 avaliou as sequências de integrase de pacientes em falha virológica durante o uso de RAL, 68% apresentaram mutações para Raltegravir e quatro principais mutações de resistência foram descritas(Q148H/R/K,N155H,E92Q e Y143R/H/C) amutação principal mais frequente foi Q148HKR seguida da N155H.A mutação Q148H/R/K geralmente vinha associada a mutação G140S,esta combinação de mutações ocorre em pacientes expostos a RAL e EVG e reduz a susceptibilidade a DTG.(Brasil,2019)

Dos seis pacientes que foram expostos somente a DTG nenhum apresentou mutação de resistência a DTG, 5 pacientes faziam o uso de DTG a menos de 1 ano

e apenas 1 fazia uso do medicamento à 2 anos. O tempo de exposição a o DTG ainda é relativamente novo, em 2016 a OMS passou a recomendar o DTG como alternativa de primeira linha de tratamento e a partir de fevereiro de 2017 através da portaria número 35 de 28/09/2016, DTG passou a ser incorporado como tratamento de primeira linha no tratamento da infecção pelo HIV No âmbito do sistema único de saúde (SUS) (Brasil, 2016).

Nesta análise os medicamentos dedolutegravir e Bictegravir mostraram-se totalmente susceptíveis em 58% dos casos. RAL foi o fármaco que apresentou maior nível de resistência muito parecido com EVG, esses dois fármacos costumam, na maior parte das vezes, apresentar resistência cruzada, com um perfil de resistência semelhante, mas não afeta DTG, que permanece ativo. Dolutegravir faz parte da segunda geração de INIs e apresenta um bom perfil farmacocinético, apresenta uma barreira superior aos outros antirretrovirais da classe (Ral e EVG) (Nunes, 2016).

6. CONCLUSÕES

O monitoramento das mutações é importante para a detecção precoce da falha do tratamento com RAL para evitar o acúmulo de mutações, e preservar a atividade de dolutegravir além de presença de mutações de resistência ser algo prejudicial para as pessoas que vivem com HIV, o acompanhamento destas mutações se faz necessárias, porque essas mutações prejudicam ação do medicamento de forma parcial ou total, levando a replicação viral e favorecendo a evolução da doença. A identificação dos subtipos leva a estratégias epidemiológicas mais eficazes e contribui para a escolha de esquemas de tratamentos mais efetivos. O uso do Raltegravir prévio favorece a resistência ao Dolutegravir, que em nosso estudo não foi observada em nenhum caso que utilizou apenas este INI no seu histórico de medicamentos ARVs. Estudo com maior amostragem são necessários para validar estas observações, que contudo são compatíveis com os achados da literatura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Benko DM, Schwartz S, Pavlakis GN, Felber BK. A novel human immunodeficiency virus type 1 protein, tev, shares sequences with tat, env, and rev proteins. *J. Virol.* 1990 Jun;64 (6):2505-18

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

Benko DM, Schwartz S, Pavlakis GN, Felber BK. A novel human immunodeficiency virus type 1 protein, tev, shares sequences with tat, env, and rev proteins. *J. Virol.* 1990 Jun;64 (6):2505-18

Brasil. Ministério da Saúde. AIDS: etiologia, clínica, diagnóstico e tratamento. Brasília: 2002, Unidade de assistência. Disponível em: www.aids.gov.br. (Acesso em: 16/09/2019.)

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual técnico para avaliação de exames de genotipagem do HIV; Brasília, 2019.

Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 35 de 28 de setembro de 2016. Torna pública a decisão de incorporar o uso do dolutegravir e darunavir para o tratamento da infecção pelo HIV, no âmbito do Sistema Único de Saúde – SUS Diário Oficial da União, Brasília, DF. n. 188, página 701.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais. Boletim Epidemiológico: HIV AIDS 2018. Brasília, v.49, n.53, Jun. de 2007 á jul. 2018. Disponível em <http://www.aids.gov.br/boletim-epidemiologico.hiv-aids-2018>.

BRASIL. Ministério da Saúde/SVS/PN-DSTAIDS. Protocolo clínico e Diretrizes Terapêutica para adultos vivendo com HIV/AIDS. Brasília, 2013

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

BRÍGIDO, LFM. et al. Southern Brazil HIV Type 1 C Expansion into the State of São Paulo, Brazil. *Aids Research And Human Retroviruses*, [s.l.], v. 27, n. 3, p.339-344, mar. 2011.

Canduci F; Sampaolo M; Marizzoni MC; Boeri E; Spagnudo V; Valli A; Castagna A; Lazzarin A; Celmenti M; Gianotti N. Dynamic patient human immunodeficiency Virus type 1 Integrase gene evolution in patient receiving raltegravir-based salvage therapies. *AIDS*. 2009; 23, 455-460.

Cavalcanti, JS. Ferreira JL.; Guimarães PM.; Brígido LF. Alta frequência de resistência ao dolutegravir em pacientes que falharam em um regime de resgate contendo Raltegravir. *J. Antimicrob Chemother.* v. 70 n.3 p.926-9.2015.

Centers for Disease Control and Prevention. *Epidemiologic Notes and Reports: Pneumocystis Pneumonia – Los Angeles*. Disponível em: https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/june_5.htm. (Acesso em: 15/10/2019)

Clavel, François; HANCE, Allan J. HIV Drug Resistance. *New England Journal of Medicine*, [s.l.], v. 350, n. 10, p.1023-1035, 4 mar. 2004. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmra025195>.

Clotet, B.; Feinberg, J.; Van L.; J Khuong-Josses; Antinori MA. Demitru I.; Fehr J.; Ortiz R.; Saag m.; Harris J.; Brwnnan C.; Fujiwara T.; Min S.; ING114915. Study Team. Once-daily dolutegravir versus darunavir plus ritonavir in antirretroviral-naive adults with HIV-1 (FLSMINGO); 48 WEK results from the randomised open-label phase 3b study. *Lancet*. 2014; 28; 383 (9936):2222-31.

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

Coutinho, MFC; O'DWYER, G; FROSSARD, V. Tratamento antirretroviral: adesão e a influência da depressão em usuários com HIV/Aids atendidos na atenção primária. *Saúde em Debate*, [s.l.], v. 42, n. 116, p.148-161, jan. 2018. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0103-1104201811612>

Cunico W, Gomes CR, Vellasco WTJ. HIV- Recentes avanços na pesquisa de fármacos. *Rio de Janeiro. Química Nova*.v31, N.8, p2111-2117, 2008, Disponível em: http://quimicanova.sbq.org.br/detalhe_artigo.asp?id=1367. Acesso em; 16 de Outubro de 2019.

Engelman, Alan; Cherepanov, Peter. The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. *Nature Reviews Microbiology*, [s.l.], v. 10, n. 4, p.279-290, 16 mar. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2747>.

Eron J, Kuman P, Lazzarin A, et al. DTG um subjects with HIV exhibiting RAL resistance. Functional monotherapy resulta of VIKING study Confort II Abstract 151LB, 18th CROI, 2011, Boston.

Espeseth AS., Felock P., Wolfe A., Marc Witmer, Grobler J., Anthony N, Egbertson M., Melamed JY., Young S., Hamill T., Cole J., Hazuda DJ. HIV1 integrase inhibitors that compete with the target DNA substrate define a unique strand transfer conformation for integrase. *Biochemistry*. 2010; 10; 97: 11244–11249.

FANALES-BELASIO, Emanuele et al. HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. *Annali Dell'istituto Superiore di Sanità*, [s.l.], v. 46, n. 1, mar. 2010. Editrice Kurtis srl. http://dx.doi.org/10.4415/ANN_10_01_02.

GILEAD SCIENCES. O Biktarvy de Gilead manteve alta eficácia, sem casos de resistência emergente ao tratamento por três anos nos ensaios clínicos de fase 3 do HIV. 2019. Disponível em: <<https://www.gilead.com/news-and-press/press-room/press-releases/2019/11/gileads-biktarvy-maintained-high-efficacy-with-no-cases-of-treatment-emergent-resistance-through-three-years-in-phase-3-hiv-clinical-trials>>. Acesso em: 11 nov. 2019.

Hazuda DJ.; Miller MD.; Nguyen BY.; Zhao J. For The P005 Study Team. Resistance to the hiv-integrase inhibitor Raltegravir: analysis of protocol 005, a phase II study in patients with triple-class resistant hiv-1 infection. *Antivir Ther*. 16th International HIV

Iamarino A; Melo FL; Braconi CT, Zanotto PM. Genes B integrase do HIV-1 circulando em São Paulo, Brasil, com uma região de recombinação recorrente. *J.PloS One*. v.7 n. 4: ed.

Jota FA. 1980-2001 Uma cronologia da epidemia do hiv/aids no Brasil e no mundo. V.2. Rio de Janeiro, 2002.30p (coleção ÁBIA políticas públicas).

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

Levy, J.A. HIV e a patogenia da Aids. Editora Unifesp, 2010. Cap. 14, 363-380.

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

Nunes EP. Dolutegravir versus Raltegravir em pacientes em falha à terapia antirretroviral: estudo Sailing. São Paulo. *BJID, educação médica continuada*, v.2, n.1, p.16-23, Fevereiro 2016.

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

Riedel M; Ribas JLC. Prevalência de subtipos do HIV-1 no Brasil: uma revisão. *Caderno saúde e desenvolvimento*. v.07 n.4 ,2015

Romanelli, RMC. et al. Efetividade da terapia antirretroviral dupla e tríplice em crianças infectadas pelo HIV. *Jornal de Pediatria*, [s.l.], v. 82, n. 4, p.260-265, ago. 2006. *FapUNIFESP (SciELO)*. <http://dx.doi.org/10.1590/s0021-75572006000500006>.

Rossi SMG, Maluf ECP, Carvalho DS, Ribeiro CEL, Battaglin CRP. Impacto da terapia antirretroviral conforme diferentes consensos de tratamento da Aids no Brasil. *Rev Panam Salud Publica*. 2012;32(2):117–23.

Santos, M LA.; Albuquerque, MG.; Brito, MA. Integrase: An Important Therapeutic Target in the Fight against HIV/AIDS Infection. *Revista Virtual de Química*, [s.l.], v. 6, n. 4, p.20-35, 2014. *Sociedade Brasileira de Química (SBQ)*. <http://dx.doi.org/10.5935/1984-6835.20140058>.

Sierra, Saleta; KUPFER, Bernd; KAISER, Rolf. Basics of the virology of HIV-1 and its replication. *Journal Of Clinical Virology*, [s.l.], v. 34, n. 4, p.233-244, dez. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2005.09.004>.

Silva, FES. Avaliação da resistência genotípica ao Enfuvirtida em pacientes submetidos ao HAART. Fenotipagem virtual das cepas de HIV1 isoladas de trinta e dois pacientes que apresentaram resistência aos antirretrovirais. 2009. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009. Acesso em: 13/12/ 2019.

Souza, MVN; ALMEIDA, Mauro Vieira de. Drogas anti-VIH: passado, presente e perspectivas futuras. *Química Nova*, [s.l.], v. 26, n. 3, p.366-372, maio 2003. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422003000300014>.

Sprinz E. Uso de inibidores da integrase como agente de primeira linha no tratamento da infecção pelo HIV. São Paulo. *BJID, educação médica continuada*.v.2, n.4, p. 99-106 Agosto 2016.

STANFORD UNIVERSITY. HIV drug resistance database [on-line]. Disponível em: <<https://hivdb.stanford.edu/dr-summary/resistance-notes/INSTI/>> Acesso em: 10 ago. 2018.

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

UNAIDS. Estatísticas Globais Sobre HIV-2019. Disponível em:

UNAIDSBrasil. OMS recomenda o dolutegravir como principal opção de tratamento para o HIV em todas as populações. <https://unaids.org.br/2019/07/oms-recomenda-o-dolutegravir-como-principal-opcao-de-tratamento-para-o-hiv-em-todas-as-populacoes/>. Acesso em:20/10/2019.

Veloso ACR, FINK HTK, LIMA LMP. Resistência genotípica do Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1 aos antirretrovirais. *Com. Ciências Saúde*. 2010; 21(1): 49-60.

Wesing A M; Xalvez V; Gunthard HF; Johnson VA; Para de R; Pillay D; Shafer RW; Richman DD. 2014 Updates of the drug resistance mutations in HIV-1. Tópicos in Antiviral Mediana, 2014; p.642-650.