

# Potencial de los inhibidores de la integrasa para deplecionar los reservorios o para impedir que se rellenen

Josep M. Llibre<sup>a</sup> y Javier Martínez-Picado<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Fundació Lluita contra la SIDA, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Barcelona, España.

<sup>b</sup>Fundació IrsiCaixa, Badalona, Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA), Barcelona, España.

El establecimiento precoz de un reservorio del virus de la inmunodeficiencia humana 1 (VIH-1) con provirus integrados en el ADN de células infectadas en estado latente impide su erradicación a pesar de mantener viremias inferiores a 50 copias/ml durante años. Si se inicia precozmente un tratamiento antirretroviral (TAR) muy supresivo, la vida media de este reservorio podría ser de sólo 4,6 meses y requerirse 7,7 años para su completa eliminación. La presencia constante de una replicación viral de bajo grado probablemente rellene indefinidamente este reservorio de células T CD4+ en reposo. Proviene probablemente tanto de la liberación de virus archivados en células latentes que se han activado como de la replicación residual de algunas células aún activadas. Ello permite también que la selección de nuevas mutantes resistentes tras un fracaso terapéutico puedan incorporarse al reservorio. Raltegravir ha demostrado reducir significativamente los tiempos en las primeras 2 fases de caída de la carga viral tras el inicio del TAR. Al iniciar la segunda fase, la carga viral era un 70% inferior en los tratados con raltegravir que con efavirenz. A través de su mecanismo de acción tardía en el ciclo celular del VIH-1 podría inducir mayores descensos en el ADN proviral que otros antirretrovirales.

Si hay ADN no integrado, aun con TAR efectivo y prolongado, bien hay replicación viral continua de bajo nivel o bien este ADN no integrado puede persistir por periodos prolongados. En ambos casos, la intensificación del TAR con raltegravir podría reportar efectos beneficiosos en la velocidad de eliminación del reservorio de VIH-1.

**Palabras clave:** Raltegravir. Reservorio VIH. Erradicación. Intensificación. Tratamiento antirretroviral.

Potential of integrase inhibitors to deplete HIV reservoirs or prevent their replenishment

**The early establishment of an HIV-1 reservoir with integrated provirus in the DNA of cells with latent infection**

hampers viral eradication, despite maintenance of viral loads lower than 50 copies/mL for years. By early initiation of highly suppressive antiretroviral therapy (ART), the half-life of this reservoir could be as short as 4.6 months and require only 7.7 years for complete elimination.

The constant presence of low-grade viral replication probably indefinitely replenishes this resting CD4+ T cell reservoir. This reservoir probably results from both the release of virus stored in latently-infected cells that have become activated and from residual replication of some still-activated cells.

This also allows new resistant mutants selected after therapeutic failure to be incorporated into the reservoir. Raltegravir has been demonstrated to significantly reduce elimination times in the first two viral decay phases after initiation of ART. On starting the second phase, the viral load was 70% lower in patients treated with raltegravir than in those treated with efavirenz. Through its late mechanism of action in the HIV-1 cell cycle, this drug could induce greater decreases in proviral DNA than other antiretroviral agents.

The presence of unintegrated HIV DNA under prolonged effective ART indicates that either there is continual low-level viral replication or that this unintegrated DNA can persist for prolonged periods. In both cases, intensification of ART with raltegravir could provide beneficial effects on the speed of elimination of the HIV-1 reservoir.

**Key words:** Raltegravir. HIV reservoir. Eradication. Intensification. Antiretroviral therapy.

La erradicación de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana 1 (VIH-1) en individuos infectados es un formidable desafío terapéutico debido a que el virus es capaz de persistir durante periodos muy prolongados (años) como información genética estable en forma de provirus integrado en el ADN de células infectadas en estado latente. La latencia viral es un estado no productivo, pero reversible, que permite a los virus evadir la respuesta inmunitaria del huésped. Este compartimento celular se establece ya en la infección aguda por el VIH-1 y parece que hasta ahora ha permanecido tremendamente estable a lo largo del tiempo a pesar de los tratamientos antirretrovirales (TAR) administrados<sup>1</sup>. El tamaño medio de este re-

Correspondencia: Dr. J.M. Llibre.  
Fundació Lluita contra la Sida, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol,  
Ctra. de Canyet, s/n. 08916 Badalona, Barcelona, España.  
Correo electrónico: jmlibre@flsida.org

servorio es de sólo 1 célula por  $10^6$  células T CD4+ en reposo.

Cuando los pacientes inician un TAR efectivo la entrada de nuevos virus en el reservorio se ve severamente restringida. Desgraciadamente, su salida del reservorio también se ve restringida, debido a que el TAR revierte el estado de hiperactivación inmunológica asociado al estado virémico.

No obstante, un pequeño número de células latentes infectadas se activan cada día y, hasta la actualidad, una vez se suspende el TAR se observa invariablemente un restablecimiento en la viremia plasmática. Debido a la capacidad del VIH-1 para expandirse exponencialmente en ausencia de presión farmacológica, es posible que incluso una sola célula infectada residual pueda permitir este repunte virológico.

Distintos análisis han confirmado la persistencia de este reservorio durante períodos incluso mayores de 5 años de un TAR completamente supresivo<sup>2</sup>. El genoma del VIH-1 persiste en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) a pesar de mantener una viremia indetectable de forma mantenida mediante un TAR. En estas células el virus sobreviviría simplemente como información genética. Por tanto, no se vería afectado por la respuesta inmunitaria o los fármacos antirretrovirales<sup>3</sup>.

Diversos estudios previos han establecido el concepto de que este reservorio latente del VIH-1 en el compartimiento de células T CD4+ en reposo era totalmente quiescente en ausencia de estímulos activadores<sup>4</sup>. La vida media de este reservorio se cifró en 44,2 meses en pacientes con carga viral mantenida por debajo de 50 copias/ml durante 7 años. Con ello, se requerirían 73,4 años de TAR supresivo mantenido para conseguir su erradicación<sup>5</sup>.

Sin embargo, este cálculo actualmente está sujeto a un gran debate. Recientemente se ha recalculado en 7 pacientes la vida media del reservorio utilizando los TAR actuales altamente efectivos e iniciando el TAR precozmente en el curso de la infección (< 3 meses desde el inicio de los síntomas de primoinfección). Los tiempos de eliminación del reservorio podrían acortarse significativamente. La vida media de este reservorio podría ser, en este nuevo escenario, de sólo 4,6 (1,9-8,7) meses, y podría requerir sólo 7,7 (3,1-14,5) años de TAR supresivo para su completa eliminación<sup>2</sup>. Sorprendentemente, en estos sujetos que iniciaron su TAR precozmente, en los primeros 12-24 meses de TAR la frecuencia de infección latente es 10-100 veces menor que la observada habitualmente: entre 2,5 y 15 células infectadas por billón de células T CD4+ en reposo.

Por otra parte, hemos ido acumulando evidencias que indican que en realidad, a pesar de la persistencia de supresión virológica completa y mantenida por debajo de 50 copias/ml de ARN de VIH-1, sigue existiendo una replicación viral baja que puede ir rellorando reservorios y prolongando continuamente la vida media de erradicación del VIH-1.

## Establecimiento del reservorio latente

Todos los individuos infectados por VIH-1 tienen células T CD4+ en reposo infectadas con genoma viral integrado en estado latente. Sin embargo, estas células son muy resistentes a la infección por el VIH y su integración en ellas

no es tan sencilla. Sólo una pequeña fracción de estas células expresan concentraciones detectables de CCR5<sup>1</sup>. Incluso cuando el virus consigue entrar, la transcripción inversa del ARN se realiza muy lentamente en estas células y compite con procesos regulados por APOBEC3G<sup>6</sup>. Además, hay un bloqueo a nivel de importe nuclear del ADN retrotranscrito del VIH-1. De hecho, en pacientes virémicos puede detectarse ADN de VIH-1 en células en reposo, pero representa mayoritariamente provirus lábiles no integrados. Actualmente parece más probable que esta latencia resulte de una infección de células T CD4+ activadas altamente permisivas, y que posteriormente algunos de estos linfoblastos infectados pasen a un estado quiescente que es no permisivo para la expresión de genes virales (fig. 1)<sup>7</sup>. La vida media de estos linfoblastos es muy corta (aproximadamente, 1 día), y no se conoce con exactitud cómo estas células evitan la citopatogenia viral y se evaden de la vigilancia de los linfocitos T citolíticos del huésped para establecer la latencia. Se especula que este proceso es especialmente prominente en el tejido linfoide intestinal, en el que se establece rápidamente el reservorio latente ya durante la infección aguda por VIH-1<sup>8</sup>.

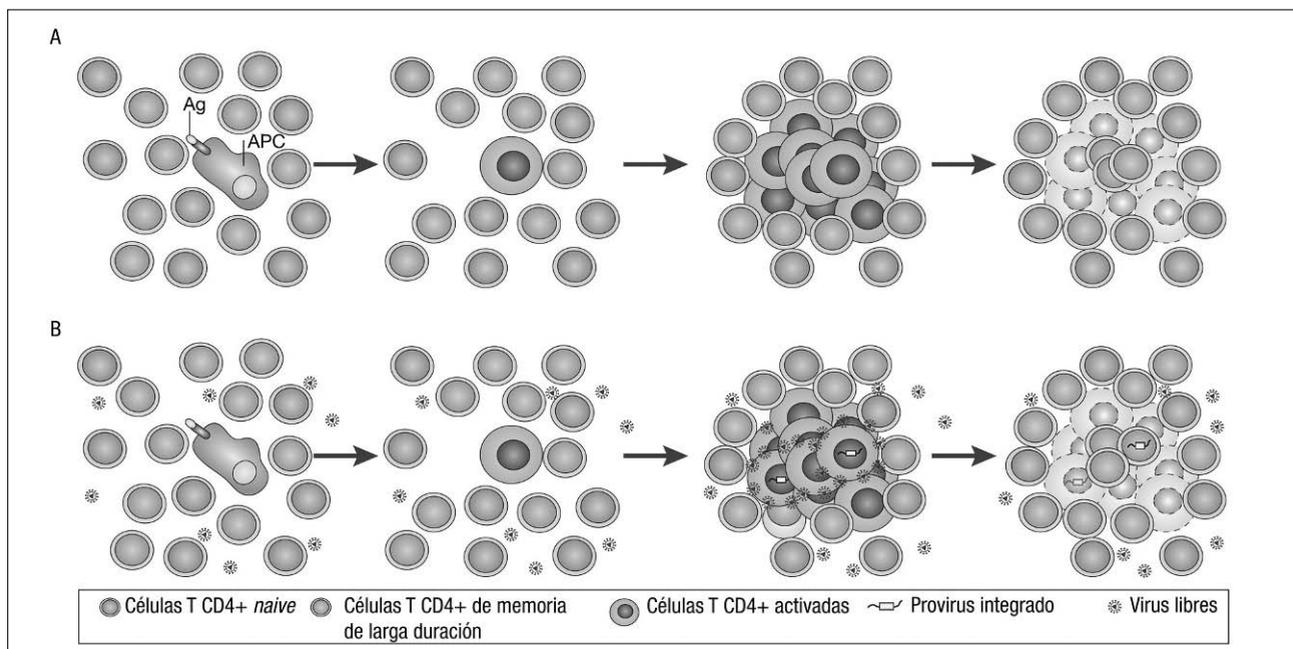
Esta latencia en parte es debida a la ausencia de formas nucleares de factores clave para la transcripción del huésped en estas células en reposo, como el factor  $\lambda$ B y el factor nuclear para la activación de las células T, necesarios para la expresión eficiente de los genes de VIH-1<sup>1</sup>. Otros factores que contribuyen a la latencia son los defectos en la elongación transcripcional, fallos para exportar la estructura que codifica el ARN del VIH-1 y el fallo de proteínas reguladoras<sup>9</sup>. El resultado final es la reversión de la célula activada a un estado de reposo, una célula con una longevidad extrema que posee una forma transcripcionalmente silente de VIH-1 codificada, una célula T de memoria.

No obstante, aunque el VIH-1 puede establecer este estado de latencia, éste no parece necesario para la persistencia del virus. La infección por VIH-1 se mantiene por ciclos continuos de replicación activa durante todo el curso de la enfermedad. Parece que esta latencia se trata más de una consecuencia accidental de los cambios fisiológicos profundos que sufrirían algunas células activas infectadas que revierten a este estado latente<sup>10</sup>.

En cualquier caso, existe un constante depósito de nuevos virus en el reservorio a lo largo de todo el curso de la enfermedad. La mayor evidencia de este hecho es que cuando se seleccionan resistencias mediante el TAR inadecuadamente supresivo, estos VIH-1 resistentes pueden ser detectados en el reservorio<sup>11</sup>. De hecho, el 50% de los pacientes tratados con TAR y con ARN del VIH-1 persistentemente menor de 50 copias/ml tienen efectivamente ARN > 2,5 copias/ml<sup>12</sup>.

## Dinámica de la caída de la carga viral durante el TAR

Los estudios de dinámica viral en pacientes que recibían TAR revelaron las características de la caída del VIH-1 libre en plasma y el recambio de células productoras de virus<sup>13,14</sup>. Una vez iniciado el TAR la viremia por VIH-1 se reduce en al menos 3 fases con velocidades de caída de la viremia diferenciadas<sup>15</sup>. La primera fase ocurre durante los primeros 7-10 días y refleja el descenso de la produc-



**Figura 1.** Modelo para la generación del reservorio latente del virus de la inmunodeficiencia humana 1 (VIH-1) en células T CD4+ en reposo. A: curso normal de la respuesta de las células T CD4+. Cuando una célula T CD4+ *naive* encuentra un antígeno (Ag) presentado por una célula presentadora de antígenos (APC) sufre una transformación blástica y prolifera, generando un clon de células efectoras activadas. Cuando el Ag ha sido aclarado muchas de estas células efectoras mueren. Sin embargo, una fracción de estas células activadas sobrevive y retorna a su estado de reposo, generando las células T de memoria de larga duración, capaces de responder al mismo Ag en el futuro. B: respuesta de las células T CD4+ en un paciente con infección por el VIH-1 no tratada. El virus replica preferentemente en células T CD4+ activadas. Los linfoblastos infectados generalmente mueren rápidamente, pero excepcionalmente pueden sobrevivir un tiempo suficiente para revertirse a un estado de memoria en reposo, que no es permisivo para la replicación viral. El resultado es un provirus integrado estable pero transcricionalmente silente en una célula de vida muy prolongada. Las proporciones de células T CD4+ *naive*, de memoria y activadas varían dependiendo de varios factores, incluyendo el estado de la infección. Reproducido con permiso de los autores<sup>7</sup>.

ción de viriones predominantemente en linfoblastos T CD4+ productivamente infectados. El descenso de la viremia en esta fase es muy rápido. La concentración de VIH-1 en plasma cae aproximadamente un 99% en las primeras 2 semanas de tratamiento debido a la rápida eliminación de viriones libres con una vida media  $\leq 6$  h y a la pérdida de células productivamente infectadas con una vida media de  $\leq 1,6$  días<sup>14</sup>. En la segunda fase el descenso de la viremia está relacionado con la inhibición de la replicación del VIH-1 en células crónicamente infectadas; sobre todo, macrófagos o células T CD4+ en estados inferiores de activación. La vida media de estas células es de aproximadamente 1-4 semanas. El descenso de la viremia tiene una caída menor a la observada en la primera fase. Finalmente, en la tercera fase la caída de la viremia es extremadamente lenta, y sucede una vez la carga viral se ha situado en valores indetectables para las técnicas comerciales habitualmente utilizadas en clínica. Se cree que la fuente de la viremia en esta fase es la liberación de VIH-1 desde células T CD4+ inactivas infectadas y en estado latente que se activarían. No obstante, otras fuentes no identificadas también pueden estar implicadas en la liberación de viriones en esta fase. Las células T CD4+ del tejido linfóide intestinal no llegan a recuperarse por completo tras períodos prolongados de TAR efectivo. En pacientes con viremia suprimida hasta 9,9 años se demostró que la frecuencia de infección residual en estas células era superior a la de CMSP en pacientes avirémicos<sup>8</sup>. El

grupo de Chun<sup>8</sup> ha demostrado muy recientemente que hay infección cruzada entre estos 2 compartimentos celulares, lo que indica que las células T CD4+ del tejido linfóide intestinal pueden tener un papel relevante en la persistencia del VIH-1 en estos individuos.

El conocimiento más profundo de las causas de activación de estas células inactivas infectadas en estado latente y de los mecanismos necesarios para conseguir una completa inhibición de la replicación es determinante para conseguir progresar hacia la erradicación de este reservorio latente.

El tiempo hasta la supresión de la viremia ha sido identificado en el pasado como un indicador pronóstico importante del comportamiento de un TAR. Así, la mayor velocidad de caída de la viremia se ha extrapolado a una mayor potencia del régimen evaluado. Debido a que los distintos TAR comparados hasta la actualidad actuaban en las mismas dianas (básicamente, retrotranscriptasa y proteasa), las diferencias no habían resultado significativas.

## ¿Por qué los inhibidores de la integrasa del VIH-1 podrían tener mayor impacto en el reservorio del VIH-1?

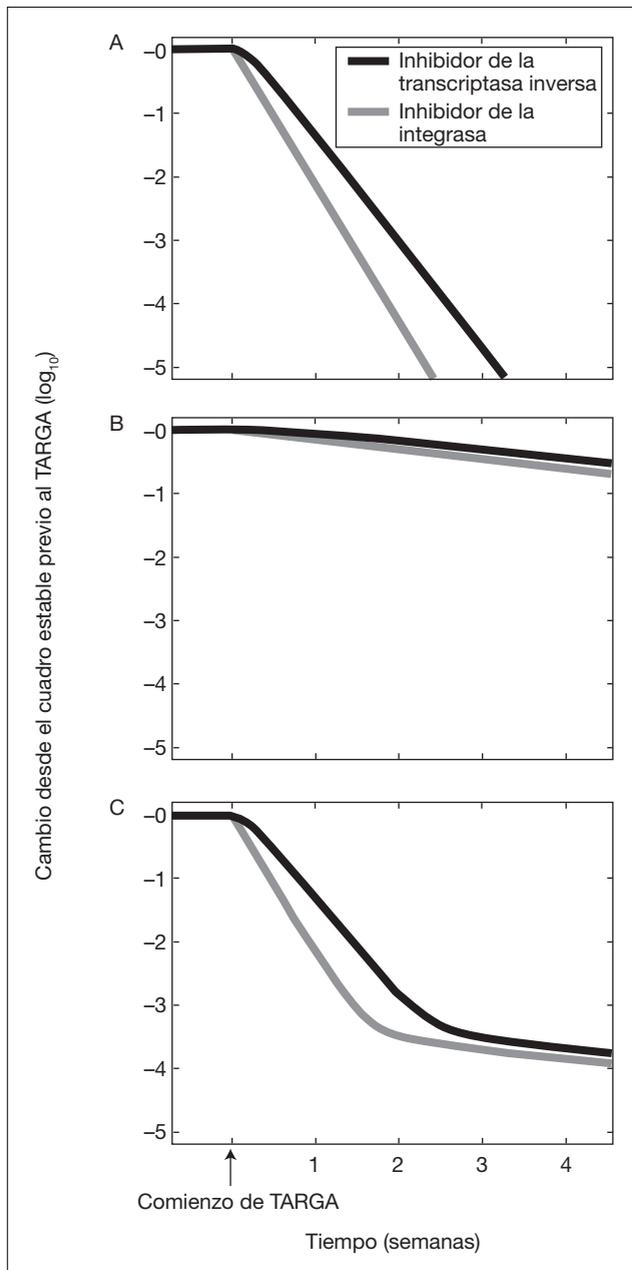
Recientemente ha sido demostrada la persistencia de virus competentes y replicativos en células T CD4+ de una

cohorte de pacientes con carga viral suprimida mantenida durante 9,1 años. Sorprendentemente, incluso en estos pacientes se encontraron concentraciones más elevadas de ADN proviral de VIH-1 en células T CD4+ activadas que en células T CD4+ en reposo. Los análisis filogenéticos revelaron evidencias de infección cruzada entre los compartimientos de células activadas y células en reposo, lo que indica que hay una reactivación persistente de células T CD4+ infectadas en estado latente y su diseminación a células T CD4+ activadas<sup>16</sup>. Estos eventos pueden permi-

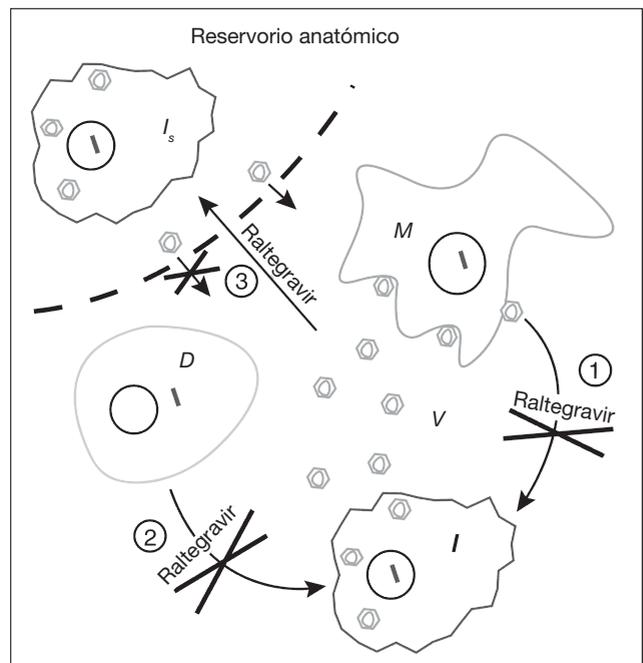
tir el continuo relleno del reservorio de células T CD4+ y la prolongación indefinida de la vida media de eliminación de las células T CD4+ en reposo en el paciente, a pesar de períodos muy prolongados de aviremia<sup>2</sup>.

Por tanto, debe contemplarse la posibilidad real de que nuevos TAR más efectivos que suprimieran esta viremia residual de bajo grado pudieran acortar significativamente el tiempo necesario hasta la erradicación del reservorio de la infección por el VIH-1.

El inhibidor de la integrasa raltegravir impide la integración del genoma del VIH en el cromosoma del huésped. Actúa en la segunda fase de la integración, la fase final de transferencia de la hebra de ADN del VIH-1 al cromosoma del huésped<sup>17</sup>. Su mecanismo es independiente de los inhibidores de la transcriptasa inversa o de la proteasa y bloquea los virus que hayan conseguido sobrepasar la transcriptasa inversa. A través de este mecanismo podría inducir mayores descensos en el ADN proviral que otros antirretrovirales, incluso después de ajustar según la respuesta viral en plasma. En los estudios de monoterapia redujo aproximadamente 2 log la viremia por VIH-1 en los primeros 10 días de tratamiento en cualquiera de las 4 dosis analizadas (100, 200, 400 y 600 mg BID)<sup>18</sup>. Raltegravir ha demostrado asociarse a caídas de la carga viral significativamente más rápidas que las observadas con inhibidores de la transcriptasa inversa o de la proteasa del VIH-1 (fig. 2)<sup>15,18,19</sup>. Desde los días 15 a 57, los individuos tratados con raltegravir consiguieron una mayor proporción de ARN del VIH-1 < 50 copias/ml ( $p < 0,047$ )<sup>19</sup>. Otro dato de extrema importancia: al iniciar



**Figura 2.** Descenso de la producción de virus desde el inicio del tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA) en presencia de un inhibidor de la integrasa o un inhibidor de la transcriptasa inversa. A: en linfoblastos T CD4+ infectados. B: en células M infectadas (macrófagos y células T CD4+ en estados menores de activación). C: en ambos. Realizado mediante un modelo de cálculo matemático. Reproducido con permiso de los autores<sup>15</sup>.



**Figura 3.** Efectos de raltegravir en 3 modelos de células infectadas por el virus de la inmunodeficiencia humana 1 (VIH-1). Las células infectadas de larga evolución se denominan M, las células infectadas latentes con VIH-1 no integrado se denominan D, las células productivamente infectadas se denominan I y las células productivamente infectadas en un reservorio anatómico se denominan I<sub>s</sub>. V indica los virus. El ADN del VIH-1 se representa como una barra sólida en cada célula. Reproducido con permiso de los autores<sup>19</sup>.

la segunda fase de caída de la carga viral, ésta era un 70% menor en los tratados con raltegravir que en los tratados con efavirenz ( $p < 0,0001$ ). De hecho, este dato desafía enormemente las hipótesis que sostenían que los virus en la segunda fase se originaban en células infectadas de larga evolución, ya que un inhibidor de la integrasa del VIH-1 no debería impactar en la producción viral de esta población celular. Tal como se cree actualmente, los virus en esta segunda fase probablemente provienen de células activas (linfoblastos) recientemente infectadas por otras células infectadas de larga evolución<sup>1</sup>.

En la figura 3 se representan los efectos de raltegravir en 3 modelos de células infectadas.

Mediante modelos matemáticos complejos, se ha podido calcular cómo el estadio del ciclo vital del VIH-1 en el que actúa el fármaco afecta a la dinámica de la caída viral (fig. 2). En general, cuanto más tarde actúa un antirretroviral en el ciclo vital intracelular del VIH-1, más rápida es la caída de la viremia<sup>15</sup>. En este sentido, los nuevos inhibidores del ensamblaje o de la maduración del VIH-1 podrían producir caídas aún más rápidas de la carga viral.

Esta característica podría llegar a tener influencia en la tasa de reducción o eliminación del ADN proviral integrado en el reservorio latente.

Un estudio piloto ha analizado esta teoría en 18 pacientes que iniciaron un tratamiento de rescate, que incluía raltegravir en 10 de ellos. Todos los pacientes incluidos consiguieron una carga viral plasmática indetectable durante las primeras 12 semanas de tratamiento. Sin embargo, efectivamente el ADN proviral en PBMC se redujo en 8/10 pacientes tratados con raltegravir frente a 3/8 controles. Los cambios medios en el ADN proviral fueron de  $-41$  frente a  $+51$  copias/ $\mu\text{g}$  de ADN ( $p = 0,03$ ), respectivamente<sup>20</sup>.

La intensificación del TAR con raltegravir es una táctica basada en el conocimiento de que hay una replicación viral continua de bajo grado durante la supresión por debajo de 50 copias/ml, y que esta replicación puede rellenar continuamente los reservorios de VIH-1 en células en estado latente. Dos hechos demostrados refuerzan el interés en explorar esta posibilidad. En primer lugar, en pacientes con viremia indetectable mediante técnicas convencionales se puede detectar valores muy bajos de virus libres. En segundo lugar, estos pacientes frecuentemente presentan *blips* (episodios de viremia transitoria habitualmente indetectables, seguidos de viremias inferiores a 50 copias/ml sin ningún cambio terapéutico). Se ha apuntado a que el reservorio del VIH-1 se reduciría más rápidamente en pacientes que no experimentan *blips*.

Esta viremia de bajo grado probablemente proviene tanto de la liberación de virus archivados en células latentes que se han activado como de replicación residual de algunas células aún activadas. No obstante, sea cual sea la fuente desde donde puedan liberarse estas partículas virales, si el paciente recibe un TAR completamente supresivo, éste no permitiría que estos VIH-1 liberados iniciaran nuevos ciclos replicativos<sup>1</sup>. Estos tratamientos podrían asociarse a un incremento en el aborto de la integración del ADN del VIH-1, con un incremento resultante del ADN viral extracromosómico en formas circulares que contienen uno o dos LTR (*long terminal repeats*), tal como se observa in vitro. Esto no afecta a la viabilidad celular y no comporta, pues, ninguna toxicidad celular adicional<sup>19</sup>. Fármacos como raltegravir podrían incrementar la efecti-

vidad de los actuales TAR en reducir progresivamente el reservorio de VIH-1 en individuos infectados, especialmente para componentes virales como el ADN no integrado de VIH-1, que es inmune a los fármacos anteriormente disponibles. La presencia de este ADN no integrado bajo tratamiento prolongado con TAR efectivo indica que existe replicación viral continua de bajo grado o que este ADN no integrado puede persistir por períodos prolongados. En cualquiera de los 2 casos, la intensificación del TAR con raltegravir podría reportar efectos beneficiosos en la tasa de eliminación del reservorio de VIH-1.

Ésta es la situación óptima que persiguen los actuales estudios de intensificación en marcha, que pretenden incidir positivamente en la tasa de descenso del reservorio de VIH-1 en pacientes infectados. Estas estrategias solo deben llevarse a cabo en estudios controlados de investigación y no están recomendadas como tratamiento sistemático ni en pacientes con frecuentes *blips*.

### Declaración de conflicto de intereses

Los autores han declarado tener los siguientes conflictos de intereses:

Josep M<sup>a</sup> Llibre ha recibido financiaciones para la investigación, la organización de actividades formativas, asistencias a congresos, o consultorías y seminarios, de Abbot, Boehringer Ingelheim, Gilead Sciences, GlaxoSmithKline, Merck, Pfizer y Roche.

Javier Martínez-Picado ha recibido financiaciones para la investigación, la organización de actividades formativas, asistencias a congresos, o consultorías y seminarios, de Boehringer Ingelheim, Bristol-Myers-Squibb, GlaxoSmithKline, Merck y Roche.

### Bibliografía

- Siliciano JD, Siliciano RF. The latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells: a barrier to cure. *Current Opinion in HIV & AIDS*. 2006;1:121-8.
- Chun TW, Justement JS, Moir S, Hallahan CW, Maenza J, Mullins JI, et al. Decay of the HIV reservoir in patients receiving antiretroviral therapy for extended periods: implications for eradication of virus. *J Infect Dis*. 2007;195:1762-4.
- Finzi D, Hermankova M, Pierson T, Carruth LM, Buck C, Chaisson RE, et al. Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science*. 1997;278:1295-300.
- Chun TW, Carruth L, Finzi D, Shen X, DiGiuseppe JA, Taylor H, et al. Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature*. 1997;387:183-8.
- Siliciano JD, Kajdas J, Finzi D, Quinn TC, Chadwick K, Margolick JB, et al. Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells. *Nat Med*. 2003;9:727-8.
- Chiu YL, Soros VB, Kreisberg JF, Stopak K, Yonemoto W, Greene WC. Cellular APOBEC3G restricts HIV-1 infection in resting CD4+ T cells. *Nature*. 2005;435:108-14.
- Han Y, Wind-Rotolo M, Yang HC, Siliciano JD, Siliciano RF. Experimental approaches to the study of HIV-1 latency. *Nat Rev Microbiol*. 2007;5:95-106.
- Chun TW, Nickle DC, Justement JS, Meyers JH, Roby G, Hallahan CW, et al. Persistence of HIV in Gut-Associated Lymphoid Tissue despite Long-Term Antiretroviral Therapy. *J Infect Dis*. 2008;197:714-20.
- Lassen KG, Bailey JR, Siliciano RF. Analysis of human immunodeficiency virus type 1 transcriptional elongation in resting CD4+ T cells in vivo. *J Virol*. 2004;78:9105-14.
- Silvestri G, Fedanov A, Germon S, Kozyr N, Kaiser WJ, Garber DA, et al. Divergent host responses during primary simian immunodeficiency virus SIVsm infection of natural sooty mangabey and nonnatural rhesus macaque hosts. *J Virol*. 2005;79:4043-54.
- Verhofstede C, Noe A, Demecheleer E, De CN, Van WF, Van Der GB, et al. Drug-resistant variants that evolve during non-suppressive therapy persist in HIV-1-infected peripheral blood mononuclear cells after long-term highly active antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2004;35:473-83.

12. Palmisano L, Giuliano M, Nicastrì E, Pirillo MF, Andreotti M, Galluzzo CM, et al. Residual viraemia in subjects with chronic HIV infection and viral load < 50 copies/ml: the impact of highly active antiretroviral therapy. *AIDS*. 2005;19:1843-7.
13. Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature*. 1995;373:123-6.
14. Perelson AS, Essunger P, Cao Y, Vesanan M, Hurley A, Saksela K, et al. Decay characteristics of HIV-1-infected compartments during combination therapy. *Nature*. 1997;387:188-91.
15. Sedaghat AR, Dinoso JB, Shen L, Wilke CO, Siliciano RF. Decay dynamics of HIV-1 depend on the inhibited stages of the viral life cycle. *PNAS*. 2008;105:4832-7.
16. Chun TW, Justement JS, Pandya P, Hallahan CW, McLaughlin M, Liu S, et al. Relationship between the size of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reservoir in peripheral blood CD4+ T cells and CD4+:CD8+ T cell ratios in aviremic HIV-1-infected individuals receiving long-term highly active antiretroviral therapy. *J Infect Dis*. 2002;185:1672-6.
17. Hazuda DJ, Young SD, Guare JP, Anthony NJ, Gomez RP, Wai JS, et al. Integrase inhibitors and cellular immunity suppress retroviral replication in rhesus macaques. *Science*. 2004;305:528-32.
18. Markowitz MM, Nguyen BYM, Gotuzzo EM, Mendo FM, Ratanasuwan WM, Kovacs CM, et al. Rapid and durable antiretroviral effect of the HIV-1 integrase inhibitor raltegravir as part of combination therapy in treatment-naive patients with HIV-1 infection: results of a 48-week controlled study. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 2007;46:125-33.
19. Murray JM, Emery S, Kelleher AD, Law M, Chen J, Hazuda DJ, et al. Antiretroviral therapy with the integrase inhibitor raltegravir alters decay kinetics of HIV, significantly reducing the second phase. *AIDS*. 2007; 21:2315-21.
20. Arponen S, Benito JM, Lozano S, Blanco F, Garrido C, De Mendoza C, et al. More pronounced effect of integrase inhibitor Raltegravir on proviral DNA reduction than other antiretroviral drugs in patients achieving undetectable viremia. 15TH Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections # 796 Boston, Ma 3-6 February, 2008.