



Universidad Central de Venezuela  
Facultad de Ciencias  
Escuela de Biología

Desarrollo y evaluación de un método alternativo para la  
determinación de resistencia genotípica a drogas  
antirretrovirales en pacientes venezolanos VIH-1 positivos

**Trabajo Especial de Grado.**

Presentado ante la Ilustre  
Universidad Central de Venezuela,  
por el Br. Domingo J. Garzaro R.,  
como requisito parcial para optar  
al título de Licenciado en Biología.  
Tutores: Dr. Héctor R. Rangel (IVIC)  
Dra. Vincenza Cervino (UCV)

Caracas – Venezuela  
Enero – 2009

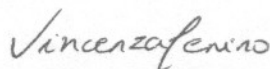
## TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Quienes suscriben, miembros del jurado designado por el consejo de la Escuela de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela para examinar el Trabajo Especial de Grado del **Br. Domingo J. Garzaro R**, titulado: **“Desarrollo y evaluación de un método alternativo para la determinación de resistencia genotípica a drogas antirretrovirales en pacientes venezolanos VIH-1 positivos”**, para optar al título de licenciado en Biología, considerando que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos por los reglamentos, y por lo tanto lo declaramos **APROBADO**.

Para dar fe de ello se levanta la presente acta en Caracas los diez y seis días del mes de enero del año dos mil nueve, dejando constar que la profesora Vincenza Cervino actuó como coordinadora del jurado examinador.



Dr. Héctor Rangel (Tutor)

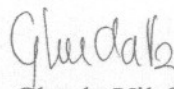


Dra. Vincenza Cervino

(Tutor Académico)



Dra. Palmira Guevara



Dra. Glenda Vilechez

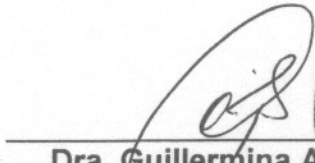


Universidad Central de Venezuela  
Facultad de Ciencias  
Escuela de Biología  
Dirección

### CONSTANCIA

El Consejo de la Escuela de Biología, Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela, certifica que en su sesión del día 21/01/2009, acordó otorgar la **Mención Honorífica** al Trabajo Especial de Grado del bachiller Garzaro R., Domingo J. titular de la cédula de identidad No. 6.365.134; titulado: "Desarrollo y evaluación de un método alternativo para la determinación de resistencia genotípica a drogas antirretrovirales en pacientes venezolanos VIH-1 positivos", considerando la originalidad, independencia y creatividad en la elaboración del mismo, así como la sobresaliente calidad del trabajo escrito y la presentación oral.

Constancia que se expide a petición de la parte interesada a los veintidós días del mes de enero del año dos mil nueve.

  
Dra. Guillermina Alonso  
Directora



GA/br.-

## **RESUMEN**

El VIH-1 es el agente etiológico causante del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA); veinticinco años después de su aislamiento se considera que la infección por este virus ha pasado de una condición fatal a una enfermedad crónica clínicamente manejable. Sin embargo, la aparición y transmisión de cepas resistentes a los diferentes esquemas de tratamientos antirretrovirales (TAR) representa un problema en la consecución de terapias asertivas que mejoren la calidad de vida de los pacientes.

La aplicación de métodos de genotipificación basados en estuches comerciales eleva aún más el costoso tratamiento para VIH-1, por lo que es necesario contar con un método alternativo que sea más asequible al médico tratante y al paciente para detectar mutaciones que confieran resistencia en las etapas iniciales del TAR, e inclusive antes de su aplicación, pudiendo prevenir así las fallas terapéuticas.

El objetivo del presente estudio fue desarrollar, normalizar y evaluar un método para la determinación de resistencia genotípica a drogas antirretrovirales (DARV) en pacientes venezolanos VIH-1+. La técnica PCR MedPol permitió detectar la presencia de mutaciones que causan tanto resistencia primaria, como resistencia secundaria a las principales DARV suministradas en el país, de manera relativamente rápida y sencilla, simplificando el diagnóstico a través de una sola PCR, por lo que representa una alternativa más económica que los métodos comerciales.

La evaluación del método normalizado se llevó a cabo en una población de 171 pacientes venezolanos VIH-1+, principalmente de la región del Distrito Capital. 63 de ellos nunca habían recibido TAR (pacientes no tratados) y 108 habían recibido o estaban bajo algún esquema de TAR al menos una vez desde el diagnóstico inicial de la infección (pacientes tratados). La población fue principalmente de sexo masculino, con una edad promedio de 36 años y el entorno de transmisión predominante fue hombres que tienen sexo con otros hombres (HSH).

El 38 % (24/63) de la población no tratada presentó mutaciones relacionadas a DARV, el 11 % (7/63) mutaciones que confieren resistencia primaria al menos a una DARV y el 16 % (10/63) mutaciones secundarias a Inhibidores de la Proteasa (IP). De los 7 pacientes que exhibieron mutaciones que confieren resistencia primaria, 3 las presentaron a Inhibidores Nucleósidos de la Transcriptasa Reversa (INTR), 3 a Inhibidores No Nucleósidos de la TR (INNTR) y 1 a IP. La prevalencia de mutaciones que confieren resistencia primaria a DARV de los pacientes no tratados sugirió la transmisión de cepas resistentes en la epidemia local. Futuros estudios permitirían establecer el costo-beneficio de implantar un programa de vigilancia y determinación de resistencia genotípica en este tipo de pacientes, para lograr la detección temprana de mutaciones que confieren resistencia primaria y establecer TAR asertivos en las etapas iniciales de la infección.

La distribución de mutaciones relacionadas a DARV en la población de pacientes tratados fue: 76 % (82/108) mutaciones que confieren algún tipo de resistencia, 50 % (54/108) mutaciones primarias que confieren resistencia a IP, 65 % (70/108) a INTR y 39 % (42/108) a INNTR. El 69 % (75/108) presentó mutaciones secundarias a IP. El 33 % (36/108) mostró mutaciones que confieren resistencia a INTR e INNTR y el 18 % (19/108) mutaciones que confieren resistencia a los tres tipos de inhibidores. Estos datos enfatizaron la importancia del uso racional de las DARV y sugirieron la necesidad de una adecuada información e instrucción al paciente para el seguimiento del TAR.

El análisis filogenético confirmó que el subtipo del VIH-1 circulante en aislados de poblaciones venezolanas fue el B (100%, 171/171), indicando la presencia de una epidemia local estable que permitiría realizar estudios más amplios de subtipificación viral y prevalencia de resistencia genotípica a DARV, a fin de obtener un mejor conocimiento de las características específicas de la infección por VIH en nuestro entorno.

*A IRIS...*

*A mis HIJOS...*

*A mis PADRES...*

## **AGRADECIMIENTOS**

\* Al Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas donde me formé como profesional y, en especial, al Dr. Egidio Romano quien con su apoyo dio inicio a la culminación de esta meta.

\* A la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela, por educarme y fijar en mí la pasión por la biología.

\* A la Dra. Flor H. Pujol, mi amiga, profesora y tutora, por su apoyo incondicional, paciencia y consideración en lo relacionado a mis estudios y realización de este trabajo.

\* Al Dr. Héctor R. Rangel y a la Dra. Vincenza Cervino tutores de este trabajo, profesores y amigos, por su confianza en mí, su guía, sus llamados a la calma y por estar allí en cada momento que los necesité.

\* A la Dra. Palmira Guevara y a la Dra. Glenda Vílchez, jurados de este trabajo de grado, quienes con sus acertadas críticas y consejos lograron, sin duda, mejorarlo.

\* A mis profesores de siempre y a mis nuevos profesores, en especial al Dr. Álvaro Ramírez y al Dr. Juan Carlos Navarro, por la presión, la exigencia y sobre todo la amistad, ese valor que solo nos lleva a ser mejores como personas.

\* A mis compañeros de trabajo, mi otra familia, Carmen Luisa, Miguel, Héctor y José, por todo el apoyo, la paciencia, el compartir penas y triunfos, las alegrías y tristezas del día a día, gracias por ser parte de esto y del resto de mi vida.

\*A las estudiantes del Laboratorio de Virología Molecular del IVIC, “mis muchachas”: Maria Zulay, Yoneira, Clarissa, Rona, Diana, Marielys, Claudia, Mariluz, Gabriela, Idamelis, Yessi y Tamara, de quienes todos los días aprendo algo nuevo y solo espero poderles enseñar algo nuevo cada día, gracias a todas.

\* A mis colegas y amigos del Laboratorio de Biología de Virus, Dr. Ferdinando Liprandi, “*caro*” amigo, Dr. José Luis Zambrano (Joseíto), Zoila, Marlene, Ana, Francesca, Víctor, por los momentos compartidos y las alegrías sinceras.

\* A mis colegas y amigos del Centro de Microbiología y Biología Celular del IVIC, Irma, Leonardo, Mary, Jusmary, Juan Carlos, César, Joselo, Daniel, Julián, Carlos, Alfredo, Elías y a todos los otros que aquí se me olvidan pero que, sin excepción, les agradezco el estar pendientes de mis logros y tantos años de amistad.

\* A Alberto Quintero y Gerardo Oropeza, amigos y hermanos a toda prueba, gracias por la confianza y el apoyo en esta etapa de mi vida.

\* A mis compañeros de estudio, quienes me adoptaron como uno más de ellos con toda las consecuencias que eso traía, Gerson, José Miguel, Olga, Denis, Patrizia, Natalibeth, Andrea, Edmundo y tantos otros, gracias por hacer mejor estos momentos.

\* A mis padres por la vida, el amor, la fe y la confianza que me han dado y hacerme lo que soy.

\* A mis hijos, principal razón de que la mayoría de las cosas en mi vida tengan sentido y valgan la pena.

\* A Iris, mi mejor amiga, esposa y compañera de esta hermosa aventura a la que llamamos “nuestra vida”, sin ti junto a mí, todo esto no habría sido posible.

# ÍNDICE GENERAL

|                                           | página |
|-------------------------------------------|--------|
| INTRODUCCIÓN                              | 1      |
| 1.- Generalidades                         | 1      |
| 2.- Características del VIH-1             | 2      |
| 3.- Organización genómica del VIH-1       | 3      |
| 4.- Ciclo de replicación del VIH-1        | 5      |
| 5.- Patogénesis de la infección por VIH-1 | 8      |
| 6.- Tratamiento antirretroviral           | 9      |
| ANTECEDENTES                              | 20     |
| JUSTIFICACIÓN                             | 24     |
| OBJETIVOS                                 | 26     |
| 1.- Objetivo General                      | 26     |
| 2.- Objetivos Específicos                 | 26     |
| MATERIALES Y METODOS                      | 27     |
| 1.-Materiales                             | 27     |
| 1.1) Muestras                             | 27     |
| 1.2) Reactivos                            | 27     |
| 1.3) Enzimas                              | 27     |
| 1.4) Soluciones preparadas                | 27     |
| 1.5) Estuches y reactivos comerciales     | 28     |
| 1.6) Iniciadores o cebadores              | 28     |

|                                                                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.-Métodos                                                                                                                           | 28 |
| 2.1) Separación de plasma y células mononucleares<br>de sangre periférica (PBMC)                                                     | 28 |
| 2.2) Extracción de ADN viral                                                                                                         | 31 |
| 2.3) Extracción de ARN viral                                                                                                         | 32 |
| 2.4) Transcripción Reversa                                                                                                           | 33 |
| 2.5) Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)                                                                                       | 33 |
| 2.6) Electroforesis de ADN y registro de imágenes                                                                                    | 34 |
| 2.7) Purificación de productos de la PCR                                                                                             | 34 |
| 2.8) Estimación cualitativa de la concentración<br>de los productos amplificados por la PCR                                          | 35 |
| 2.9) Secuenciación                                                                                                                   | 35 |
| 2.10) Análisis de secuencias, subtipificación de las<br>secuencias, determinación y prevalencia de<br>mutaciones a los IPR y los ITR | 36 |
| 2.11) Análisis estadísticos                                                                                                          | 38 |
| 2.12) Análisis filogenéticos                                                                                                         | 39 |
| RESULTADOS                                                                                                                           | 41 |
| 1.-Desarrollo del método para la determinación de resistencia<br>genotípica a drogas antirretrovirales                               | 41 |
| 1.1) Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)                                                                                       | 41 |
| 1.2) Normalización de la PCR MedPol                                                                                                  | 42 |
| 1.3) Estimación cualitativa de la concentración de los<br>productos amplificados por la PCR MedPol                                   | 45 |

|                                                                                                                    |        |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 1.4) Selección del compartimiento viral para la deter-<br>minación de resistencia genotípica a DARV                | 47     |
| 1.5) Límite de detección de la PCR MedPol                                                                          | 49     |
| 2.- Comparación de la PCR MedPol con un método comercial                                                           | 51     |
| 3.- Evaluación de la prevalencia de resistencia a drogas en<br>población venezolana a través del método PCR MedPol | 54     |
| 3.1) Población                                                                                                     | 54     |
| 3.2) Secuenciación y prevalencia de mutaciones que<br>confieren resistencia                                        | 55     |
| 3.2.1) Pacientes no tratados                                                                                       | 55     |
| 3.2.2) Pacientes tratados                                                                                          | 58     |
| 4.- Subtipificación por análisis filogenéticos                                                                     | 63     |
| <br>DISCUSIÓN                                                                                                      | <br>65 |
| CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES                                                                                     | 79     |
| BIBLIOGRAFÍA                                                                                                       | 81     |

## ÍNDICE DE TABLAS

| Tabla                                                                                                                                                   | página |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| I    Fármacos aprobados por la FDA para ser aplicados en las diferentes combinaciones terapéuticas disponibles contra la infección por VIH-1            | 13     |
| II    Iniciadores a utilizar para la amplificación y secuenciación del gen <i>pol</i> del VIH-1                                                         | 29     |
| III    Códigos de acceso al GenBank de las secuencias de referencia utilizadas en la reconstrucción del árbol filogenético                              | 40     |
| IV    Evaluación de estrategias de amplificación del gen <i>pol</i> del VIH                                                                             | 41     |
| V    Correlación entre el total de mutaciones que confieren resistencia primaria determinado por cada método según el tipo de inhibidor                 | 52     |
| VI    Prevalencia de mutaciones encontradas en la población total de pacientes no tratados (n=63)                                                       | 56     |
| VII    Mutaciones en las secuencias de los pacientes no tratados que confieren resistencia primaria                                                     | 57     |
| VIII    Mutaciones en las secuencias de los pacientes tratados que confieren resistencia primaria a inhibidores de la Proteasa (IP)                     | 59     |
| IX    Mutaciones en las secuencias de los pacientes tratados asociadas a resistencia secundaria a inhibidores de la Proteasa (IP)                       | 60     |
| X    Mutaciones en las secuencias de los pacientes tratados que confieren resistencia a inhibidores nucleósidos de la Transcriptasa Reversa (INTR)      | 61     |
| XI    Mutaciones en las secuencias de los pacientes tratados que confieren resistencia a inhibidores no nucleósidos de la Transcriptasa Reversa (INNTR) | 62     |

## ÍNDICE DE FIGURAS

| Figura |                                                                                                                                                           | página |
|--------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 1      | Estructura del virión del VIH-1                                                                                                                           | 4      |
| 2      | Representación esquemática del genoma del VIH-1                                                                                                           | 6      |
| 3      | Ciclo de replicación del VIH-1                                                                                                                            | 7      |
| 4      | Representación gráfica del curso típico de la infección por VIH-1                                                                                         | 10     |
| 5      | Representación gráfica de los sitios de hibridización de los iniciadores                                                                                  | 30     |
| 6      | Ejemplo de normalización de la temperatura de hibridización para la segunda ronda de amplificación de la PCR MedPol                                       | 43     |
| 7      | Ejemplo de muestras procesadas con la PCR MedPol normalizada                                                                                              | 44     |
| 8      | Ejemplo de la estimación cualitativa de muestras amplificadas por la PCR MedPol                                                                           | 46     |
| 9      | Diferencias en los patrones de resistencia genotípica y porcentaje de similitud entre las secuencias obtenidas del ADN proviral y el ARN viral del plasma | 48     |
| 10     | Resultado obtenido en la amplificación de los patrones utilizados a fin de estimar el límite de detección de la PCR MedPol                                | 50     |
| 11     | Porcentaje de similitud entre las secuencias obtenidas empleando el método comercial Trugene® (TG) y la PCR MedPol (MP)                                   | 53     |
| 12     | Árbol filogenético de 40 secuencias de la población en estudio                                                                                            | 64     |

# **INTRODUCCIÓN**

## **1.- Generalidades**

El Virus de Inmunodeficiencia Humana tipo 1 (VIH-1) es el agente etiológico causante del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida o SIDA, enfermedad que constituye una de las pandemias más mortales y persistentes en la historia de la humanidad (Barré-Sinoussi y col., 1983; Heeney y col., 2006; McCutchan, 2006). Fue denominado como tal en 1986, por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus, una vez que los datos epidemiológicos y la comparación de las secuencias nucleotídicas de los distintos aislamientos virales de pacientes afectados, demostraron que pertenecían a un único virus (Reeves y Doms, 2002).

El primer caso de SIDA fue descrito en 1981 y el VIH-1 fue aislado y clonado por primera vez en 1983 por el grupo de Luc Montagnier del Instituto Louis Pasteur de Paris (Clavel y col., 1986; Ferguson y col., 2002). Los primeros casos documentados se registraron en las ciudades norteamericanas de San Francisco y Nueva York, en dos grupos distintos de pacientes: Varones homosexuales y jóvenes adictos a drogas por vía endovenosa. Posteriormente se sumaron casos provenientes de pacientes hemofílicos, hemotransfundidos, mujeres que eran parejas de hombres VIH-1 positivos (VIH-1+) y finalmente en niños hijos de madres infectadas (Barré-Sinoussi y col., 1983; Gallo y col., 1984; Levy y col., 1984; Reeves y Doms, 2002).

Esta enfermedad constituye la cuarta causa de muerte a nivel mundial y la primera en África, principalmente en la región sub-sahariana; afecta mayoritariamente a adultos jóvenes especialmente de países en desarrollo (Flint y col., 2004; Gayle y Hill, 2001; Goldsby y col., 2000; Quinn, 1995; Sepkowitz, 2006).

El Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA (ONUSIDA) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) indican que para el año 2007, 33,2 millones de

personas estaban infectadas a nivel global, registrándose 2,5 millones de nuevas infecciones y 2,1 millones de defunciones. Las mayores proporciones se presentaron en el África subsahariana y el Asia meridional y sudoriental (UNAIDS/WHO, 2007).

En nuestro país la prevalencia de la infección por el VIH-1 continúa siendo una de las más bajas de Suramérica: Alrededor de 110.000 casos, de los cuales el 0,7% corresponde a adultos jóvenes, y unos 6.100 decesos (UNAIDS/WHO, 2006). Es probable que estos datos subestimen el número real de casos debido, principalmente, al precario manejo de las estadísticas venezolanas de morbi-mortalidad.

Actualmente se reconocen tres grupos genotípicamente diferentes del VIH-1: El grupo M (“Main”, principal), el grupo O (“Outlier”, externo) y el grupo N (“New”, nuevo). El grupo M es el de mayor distribución a nivel mundial, se le han descrito al menos 10 subtipos (A-K) y 16 subtipos recombinantes (A/B, B/F etc.), llamados Formas Recombinantes Circulantes (CRF por su acrónimo en inglés); mientras que para los grupos O y N se han descrito hasta cinco subtipos (Freed y Martin, 2002; Kanki y col., 1999).

## **2.- Características del VIH-1**

El VIH-1 es un virus perteneciente a la familia *Retroviridae*, caracterizado por presentar un genoma con dos copias de ARN y un único y característico ciclo de replicación. Una vez que el virus entra a la célula blanco, ocurre la transcripción reversa de su ARN genómico para generar una copia de ADN de doble cadena, la cual es posteriormente integrada en el ADN cromosomal de la célula hospedera (Coffin, 1992; Katz y Skalka, 1990).

El VIH-1 se ubicó dentro de la subfamilia *Lentivirinae*, grupo *Lentivirus* de acuerdo a sus características morfológicas, biológicas y genotípicas. A esta subfamilia pertenecen retrovirus complejos asociados al establecimiento de infecciones persistentes o crónicas con una progresión relativamente lenta (Katz y Skalka, 1990). Son virus no oncogénicos y

fundamentalmente presentan tropismo por las células del linaje hematopoyético y tejidos como los del sistema nervioso central. También están asociados a alteraciones autoinmunes, inmunodeficiencias y trastornos a nivel neurológico (Flint y col., 2004; Gao y col., 1996; Goff, 2001; Guatelli, 2002).

La partícula viral del VIH-1 es de forma esférica, con un diámetro aproximado de 100 nm, y posee una envoltura que está compuesta por una bicapa lipídica proveniente de la célula hospedera y que contiene principalmente moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad, actina y ubiquitina, así como las glicoproteínas (gp) virales denominadas gp120 y gp41 que forman las espículas del virus (Figura 1). La gp120 es la proteína más externa y se encuentra unida en forma no covalente a la glicoproteína de transmembrana gp41, tiene cinco regiones constantes (C1-C5) y cinco regiones variables (V1-V5). De estas últimas, la región variable V3 es la reconocida por el receptor primario CD4 en la superficie de la célula T hospedera (Arthur y col., 1992).

La partícula viral también presenta una matriz formada por 2000 copias de la proteína (p) p17 y un “core” o cápside formado por 2000 copias de la proteína p24, en donde se encuentra el genoma formado por dos cadenas de ARN separadas y no empalmadas. La cápside también contiene las enzimas virales esenciales: Proteasa (PR), Transcriptasa Reversa (TR) e Integrasa (IN), proteínas accesorias empaquetadas como Nef, Vif y Vpr y no empaquetadas como Rev, Tat y Vpu (Turner y Summers, 1999).

### **3.- Organización genómica del VIH-1**

Cada hebra del ARN genómico viral tiene una longitud aproximada de 9,2 kilobases (kb), con la capacidad de expresar nueve genes: Tres que codifican para los precursores polipeptídicos de las proteínas virales estructurales y seis que codifican para una serie de proteínas adicionales, no estructurales, también conocidas como proteínas accesorias, que

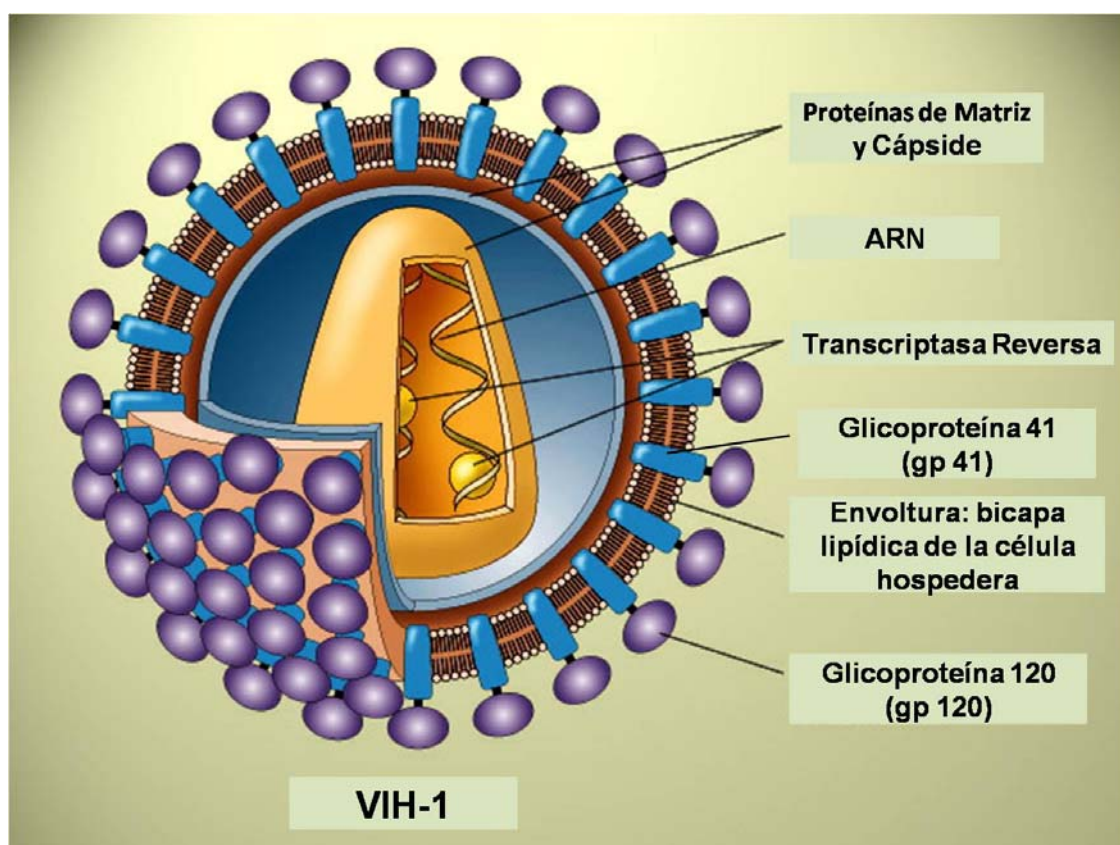


Figura 1. Estructura del virión del VIH-1 (tomado de [www.hivnorfolk.com](http://www.hivnorfolk.com)).

intervienen fundamentalmente en la regulación de la replicación y en la infectividad de la nueva progenie viral (Cullen, 1998; Emerman y Malim, 1998; Wang y col., 2000).

Los genes virales que codifican para las proteínas estructurales son comunes a todos los retrovirus y se les denomina *gag*, *pol* y *env*. El producto de la transcripción del gen *gag* da origen a las proteínas de la matriz, cápside y nucleocápside, el producto del gen *pol* a las enzimas virales proteasa, transcriptasa reversa e integrasa y el correspondiente al gen *env* a las glicoproteínas de la envoltura viral. Las proteínas accesorias son producto de la transcripción de los genes *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpu* y *vpr* (Cullen, 1991; Goff, 2001).

El ARN genómico viral (Figura 2) también está delimitado en ambos extremos por unas secuencias nucleotídicas, no codificantes, que constituyen elementos claves de regulación para algunos eventos del ciclo replicativo y de la expresión genética. Estas secuencias son: La región U5 en su extremo 5', la región R ("Repeated", repetida) que se observa en ambos extremos, y la región U3 en el extremo 3'. Cuando ocurre la retrotranscripción del genoma viral, estas regiones se convierten en los LTR ("Long Terminal Repeats") característicos del ADN proviral. En el extremo 5', el LTR contiene esencialmente las secuencias promotoras y de iniciación para la transcripción del genoma viral. En el caso del LTR del extremo 3' se halla la señal de poliadenilación (Joshi y Joshi, 1996; Starcich y col., 1985).

#### **4.- Ciclo de replicación del VIH-1**

El ciclo de replicación lo conforman una serie de procesos agrupados en dos etapas de la infección que reciben el nombre de fase temprana y fase tardía (Figura 3). En la primera, se incluyen los procesos que tienen lugar a partir del contacto entre la partícula viral y la célula hospedera que conllevan al establecimiento pleno de la infección, con la integración del ADN proviral en el material genético celular. De estos procesos los más relevantes son: La unión o adsorción de la partícula viral a la superficie celular a través de los receptores CD4, la

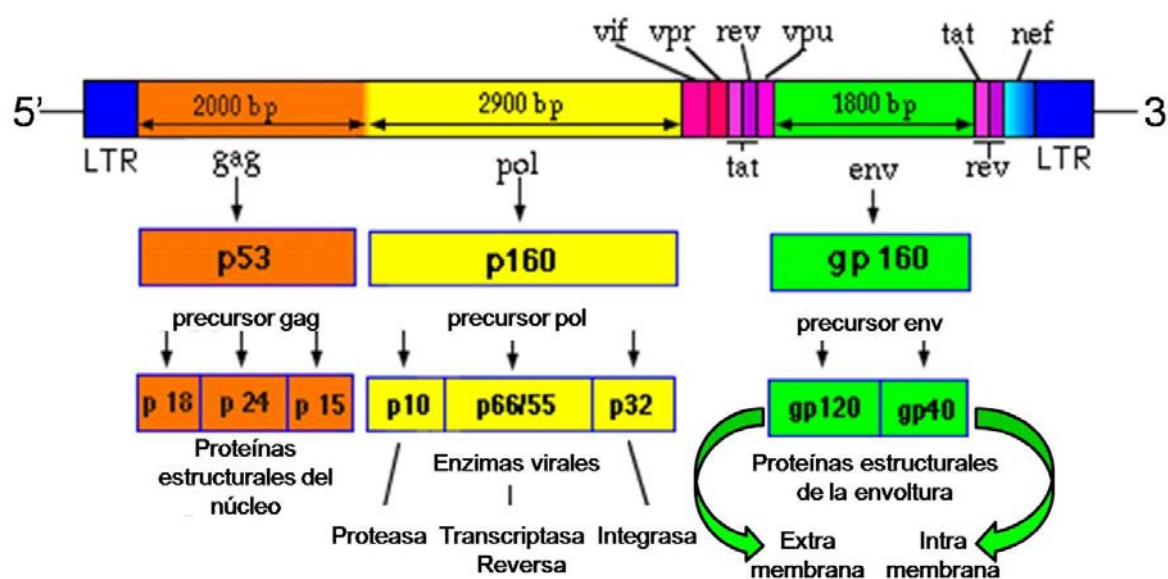


Figura 2. Representación esquemática del genoma del VIH-1 (tomado y modificado de [www.yale.edu/bio243/HIV/genome.html](http://www.yale.edu/bio243/HIV/genome.html)).

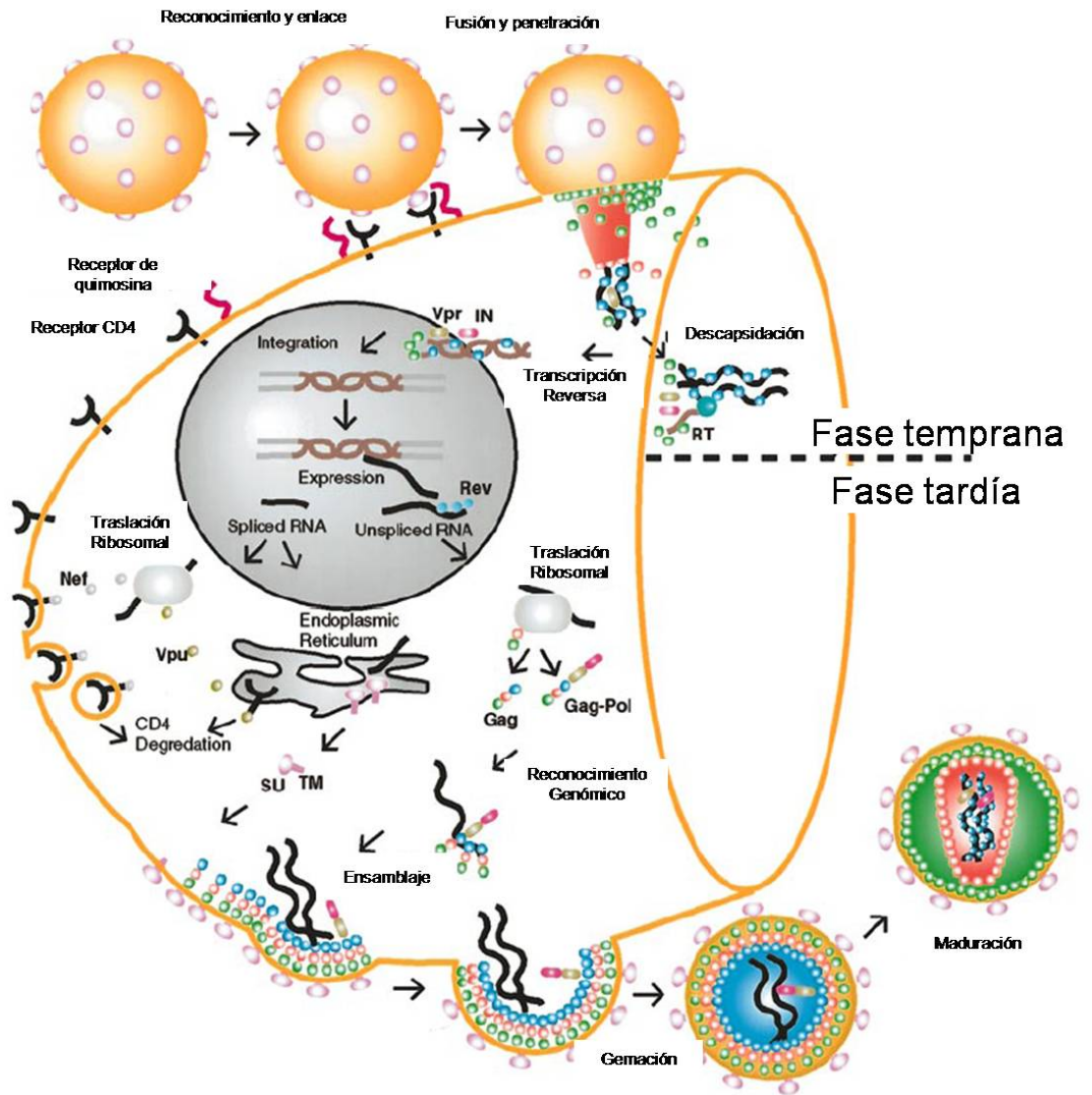


Figura 3. Ciclo de replicación del VIH-1 (tomado de Sierra y col., 2005).

fusión de la envoltura viral con la membrana celular, la internalización y la decapsidación del virión en el citoplasma, la transcripción reversa del ARN genómico viral, el transporte hacia el núcleo y la integración a nivel cromosomal del ADN proviral (Ferguson y col., 2002; Nisole y Saib, 2004; Turner y Summers, 1999).

Posterior a la infección celular ocurren los eventos que constituyen la fase tardía del ciclo de replicación viral. En esta fase se expresan los diferentes genes virales y se madura y libera la nueva progenie viral. Los procesos de esta fase son: La transcripción del ADN proviral para generar los diversos ARN mensajeros virales (ARNmv) y su procesamiento (“splicing”) y posterior exportación al citoplasma, la traducción de los ARNm para formar los precursores polipeptídicos virales, el ensamblaje de los nuevos viriones y la gemación o liberación de la progenie viral hacia el espacio extracelular, donde ocurre el clivaje o el procesamiento proteolítico de los diferentes precursores proteicos para así generar los viriones maduros infecciosos (Ferguson y col., 2002; Nisole y Saib, 2004; Turner y Summers, 1999).

### **5.- Patogénesis de la infección por VIH-1**

La principal característica de la patogénesis de la infección por VIH-1 es la presencia de una inmunodeficiencia asociada al deterioro de la respuesta inmune celular y a una marcada disminución en la cantidad de los linfocitos T CD4+, lo que provoca una degeneración cualitativa de toda respuesta inmunitaria (Fauci y Lane, 1994; Golsby y col., 2000; Guatelli, 2002).

Este virus se transmite principalmente por contacto sexual y por vía sanguínea en transfusiones y/o uso de hemoderivados contaminados con el virus. También puede ocurrir la transmisión vertical al momento del parto y a través de la leche materna (Fauci y Lane, 1994; Guatelli, 2002; Ho y col., 1984).

La patogénesis de esta enfermedad depende de múltiples factores, tanto del virus como

del hospedero, y de la interacción entre ambos (Cohen y Fauci, 2001; Fauci, 2003; Pantaleo y col., 1993). Comprende tres fases o períodos bien definidos:

- La fase aguda de la infección transcurre con una elevada viremia, producto de una replicación viral activa, que genera la disminución de los linfocitos T CD4+ (Figura 4). El individuo suele presentar síntomas poco específicos que semejan a los de un episodio de gripe o una mononucleosis. Esta fase puede durar entre 7 y 10 días.
- La fase de latencia clínica se inicia una vez superado el episodio agudo y está asociada al control de la replicación viral por una fuerte respuesta celular inmunitaria (Figura 4). La viremia se reduce drásticamente y se mantiene a bajos niveles, con episodios esporádicos de reactivación. En esta fase se establece un equilibrio entre los mecanismos de defensa del hospedero y la replicación viral, por lo que la infección permanece estable en el individuo. Dura alrededor de 8 a 10 años; este período puede ser más extenso en algunos individuos conocidos como progresores lentos.
- La fase final de la infección se caracteriza por una nueva activación de la replicación del virus en el organismo y una disminución crítica del nivel de los linfocitos T CD4+ (Figura 4). En esta fase el individuo se encuentra muy vulnerable a enfermedades oportunistas que facilitan el desarrollo de complicaciones clínicas capaces de producir su muerte (Cohen y Fauci, 2001; Fauci, 2003; Flint y col., 2004; Pantaleo y col., 1993; Quinn, 1995; Stevenson, 2003).

## **6.- Tratamiento antirretroviral**

Por no disponer de una vacuna, la búsqueda de alternativas terapéuticas y el desarrollo de drogas antivirales para el combate y manejo de la infección por el VIH-1 ha sido una labor constante con un rápido progreso desde los inicios de la epidemia. Esto ha permitido generar avances significativos en el conocimiento de los aspectos biológicos y moleculares de la

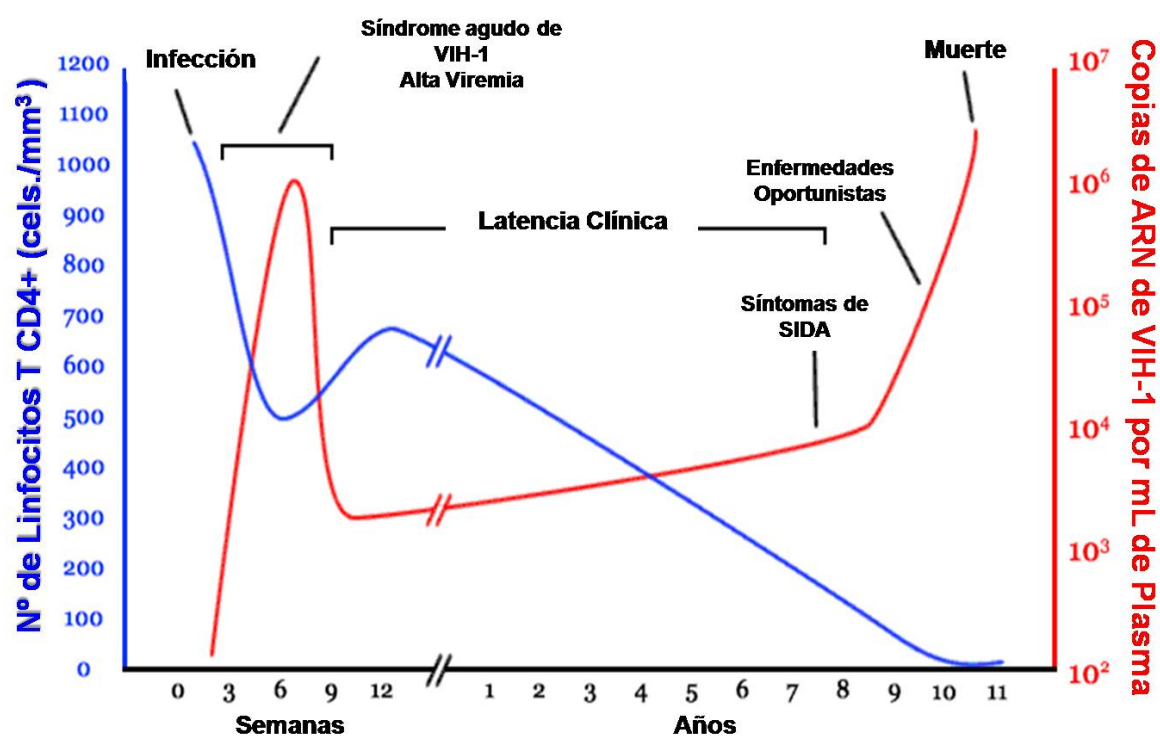


Figura 4. Representación gráfica del curso típico de la infección por VIH-1 (tomado de Pantaleo y col., 1993).

replicación viral, así como en aspectos críticos de la patogénesis de la infección por VIH-1 (Barbaro y col., 2005; Dybul y col., 2002; Hoffmann y Mulcahy, 2006; Katzenstein, 2003; Letvin y Walker, 2003; Pereira y Paridaen, 2004; Pérez, 2000; Pomerantz y Hom, 2003; Quan-en, 2004).

El desarrollo de diferentes fármacos ha permitido su uso, individual o combinado, para establecer un conjunto de protocolos terapéuticos dirigido al tratamiento de pacientes VIH-1+. La terapia antirretroviral (TAR) se basa en lograr la máxima supresión de la replicación viral durante el mayor tiempo posible, procurando el menor grado de toxicidad para el paciente. Su objetivo es restaurar y preservar la función inmunitaria en el individuo y así reducir la morbi-mortalidad asociada al VIH-1, para garantizar una mejor calidad de vida. Los resultados de la terapia son evaluados a través de dos parámetros fundamentalmente: Los niveles plasmáticos de ARN genómico viral circulante (carga viral) y el conteo de los linfocitos T CD4+ (Dybul y col., 2002; Kak y col., 2000; Piacenti, 2006; Raffanti y Haas, 2001; Richman, 2001; Zdanowicz, 2006).

La mayoría de los eventos del ciclo replicativo viral, así como buena parte de los productos de los genes virales, son blancos potenciales para la acción de sustancias interferentes o inhibitorias de la replicación (Agrawal y col., 2006; De Clercq, 2004a; Gulick, 2003; Nielsen, 2005; Pereira y Paridaen, 2004).

Hasta enero de 2008, seis clases de compuestos tenían la aprobación de la FDA, Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos, para su uso combinado en los diferentes esquemas de tratamiento que se conocen a nivel mundial con el nombre de HAART (“Highly Active Antiretroviral Therapy”) ([www.fda.gov/oashi/aids/virals.html](http://www.fda.gov/oashi/aids/virals.html)). Tres de estas clases de drogas corresponden a compuestos dirigidos a actuar sobre las enzimas virales Proteasa (PR) y Transcriptasa Reversa (TR) codificadas por el gen *pol*, de vital importancia

en el ciclo replicativo viral. La cuarta clase está conformada por un péptido cuya acción va dirigida a los mecanismos de fusión del virus a la célula blanco, interactuando con las glicoproteínas gp41 y gp120 codificadas por el gen *env* (Crumpacker, 2001; De Clercq, 2004a; FDA, 2006; Hoffmann y Mulcahy, 2006).

La quinta clase, llamada inhibidores de entrada, está representada por un compuesto que tiene como principal característica ser un antagonista de los receptores de quimiocinas, en particular el correceptor CCR5 de las células TCD4+. Mientras que la sexta clase, conocida como inhibidores de integrasa, corresponde a un fármaco desarrollado por Merck & Co. aprobado por la FDA en octubre de 2007, cuya función terapéutica es impedir la integración del material genómico viral al genoma de la célula hospedera. La Tabla I resume las drogas aprobadas por la FDA, en ella no están incluidos los inhibidores de integrasa.

Las seis clases de compuestos antirretrovirales son:

- Nucleósidos y Nucleótidos Inhibidores de la TR (INTR):

También denominados análogos de nucleósidos, fueron las primeras drogas en aprobarse para el tratamiento de la infección por VIH-1 y aún hoy en día representan un componente esencial en la terapia antirretroviral. Su blanco de acción es la enzima TR, actuando como sustrato alternativo durante su actividad en la fase temprana del ciclo replicativo. Desde el punto de vista estructural son versiones químicamente modificadas de los nucleósidos endógenos, naturalmente presentes en la célula para la síntesis de ácidos nucleicos (Crumpacker, 2001; Hoffmann y Mulcahy, 2006; Richman, 2001).

Administrados como pro-drogas pueden competir con los nucleótidos endógenos por la incorporación en la cadena nascente de ADN. Al tener mayor afinidad por la TR que estos últimos, son incluidos preferentemente en la incipiente hebra de ADN y, dado que carecen del grupo hidroxilo en la posición 3' de la ribosa, se hace imposible que la enzima forme un

Tabla I. Fármacos aprobados por la FDA para ser aplicados en las diferentes combinaciones terapéuticas disponibles contra la infección por VIH-1 (tomado de [www.hiv-medicine.com](http://www.hiv-medicine.com)).

| Nombre Comercial                                           | Abrev. | Droga               | Casa Comercial       |
|------------------------------------------------------------|--------|---------------------|----------------------|
| <b>Nucleosidos y Nucleótidos Inhibidores de TR (NNITR)</b> |        |                     |                      |
| Combivir™                                                  | CBV    | AZT+3TC             | GSK                  |
| Emtriva™                                                   | FTC    | Emtricitabine       | Gilead               |
| Epivir™                                                    | 3TC    | Lamivudine          | GSK                  |
| HIVID™*                                                    | ddC    | Zalcitabine         | Roche                |
| Kivexa/Epzicom™                                            | KVX    | 3TC+ABC             | GSK                  |
| Retrovir™                                                  | AZT    | Zidovudine          | GSK                  |
| Trizivir™                                                  | TZV    | AZT+3TC+ABC         | GSK                  |
| Truvada™                                                   | TVD    | FTC+TDF             | Gilead               |
| Videx™                                                     | ddl    | Didanosine          | BMS                  |
| Viread™                                                    | TDF    | Tenofovir           | Gilead               |
| Zerit™                                                     | d4T    | Stavudine           | BMS                  |
| Ziagen™                                                    | ABC    | Abacavir            | GSK                  |
| <b>Inhibidores NoNucleosidos de TR (INNTR)</b>             |        |                     |                      |
| Rescriptor™                                                | DLV    | Delavirdine         | Pfizer               |
| Sustiva/Stocrin™                                           | EFV    | Efavirenz           | BMS/MSD              |
| Viramune™                                                  | NVP    | Nevirapine          | Boehringer Ingelheim |
| <b>Inhibidores de Proteasa (IP)</b>                        |        |                     |                      |
| Aptivus™                                                   | TPV    | Tipranavir          | Boehringer-Ingelheim |
| Agenerase™                                                 | APV    | Amprenavir          | GSK                  |
| Crixivan™                                                  | IDV    | Indinavir           | MSD                  |
| Invirase 500™                                              | SQV    | Saquinavir          | Roche                |
| Kaletra™                                                   | LPV    | Lopinavir/ritonavir | Abbott               |
| Norvir™                                                    | RTV    | Ritonavir           | Abbott               |
| Reyataz™                                                   | ATV    | Atazanavir          | BMS                  |
| Telzir/Lexiva™                                             | FPV    | Fosamprenavir       | GSK                  |
| Viracept™                                                  | NFV    | Nelfinavir          | Roche/Pfizer         |
| <b>Inhibidores de Fusión</b>                               |        |                     |                      |
| Fuzeon                                                     | T-20   | Enfuvirtide         | Roche                |
| <b>Inhibidores de Entrada</b>                              |        |                     |                      |
| Celsentri/Selzentry™                                       | MVC    | Maraviroc           | Pfizer               |

\*Distribución Suspendida

nuevo enlace fosfodiéster 3'-5' entre el análogo nucleósido recién incorporado y una nueva base nucleotídica a ser añadida. Se interrumpe así la elongación de la cadena de ADN y se detiene la retrotranscripción (Crumpacker, 2001; Furman y col., 1986; Imamichi, 2004; Richman, 2001).

Los inhibidores de TR de tipo nucleótidos tienen un mecanismo de acción similar al de los análogos nucleósidos, la diferencia radica en que estructuralmente éstos son compuestos monofosfatados y sólo requieren de dos pasos de fosforilación para ser convertidos en sus metabolitos activos dentro de la célula. El único nucleótido inhibidor cuyo uso terapéutico está aprobado es el Tenofovir Disoproxil Fumarato (TDF) (De Clercq, 2004b; Hoffmann y Mulcahy, 2006; Robbins y col., 1998). Posee la ventaja de una aparición relativamente muy baja de mutaciones asociadas a una susceptibilidad disminuida al mismo, en conjunto con una buena y sostenida capacidad de reducción de la carga viral (Margot y col., 2002; Mc Coll y col., 2004), aunque también se han encontrado cepas con perfiles importantes de mutaciones de resistencia asociadas al empleo de TDF en los esquemas terapéuticos (Wirden y col., 2005).

En general los INTR son medicamentos que poseen un buen grado de tolerabilidad. Sin embargo, a largo plazo estas sustancias producen numerosos efectos secundarios debido a la toxicidad mitocondrial ocasionada por su activación y metabolismo (Brinkman y col., 1999; Cohen y Fauci, 2001; Falco y col., 2002; Henry y col., 2004; Hoffmann y Mulcahy, 2006; Richman, 2001).

El empleo prolongado de esta clase de compuestos suele generar la selección de cepas virales con diversos patrones de resistencia, asociados a sustituciones de aminoácidos específicos en varios residuos de la enzima. En ciertas ocasiones obedece a la acumulación de manera secuencial de varias mutaciones y se ha descrito con suma frecuencia la resistencia cruzada entre varios de estos compuestos (Clavel y Hance, 2004; De Clercq, 1994; Johnson y

col., 2006; Jonckheere y col., 2000).

- Inhibidores No-Nucleósidos de la Transcriptasa Reversa (INNTR):

Esta clase comprende una serie de compuestos sintéticos químicamente diversos capaces de bloquear la actividad de la TR de manera directa y no competitiva, a través de su interacción con un sitio alostérico de la enzima definido como un bolsillo hidrofóbico. Este sitio se encuentra muy cercano a los residuos catalíticos que constituyen el núcleo activo de la enzima, en el cual ocurre la interacción con sus sustratos, es decir, el complejo ADN-cebador y los nucleótidos (De Clercq, 1994; De Clercq, 1996; Gu y col., 1995; Merluzzi y col., 1990; Zhou y col., 2005).

Se ha determinado que aún cuando el sitio de interacción de los INNTR está muy cerca del sitio de unión para el sustrato, estos agentes no interfieren directamente con la unión de los nucleótidos al sitio catalítico de la enzima, ni con los cambios conformacionales más importantes generados por la interacción enzima-sustrato (Spence y col., 1995). La hipótesis planteada con mayor frecuencia para explicar el mecanismo de acción de esta clase de compuestos, es que se comportan como un modulador alostérico, es decir, que la unión de éstos a la enzima provoca una considerable disminución de la tasa de reacción química o catálisis enzimática, afectando la procesividad de la polimerasa y mermando finalmente la síntesis de la cadena naciente de ADN (Esnouf y col., 1995; Hoffmann y Mulcahy, 2006; Jonckheere y col., 2000; Smerdon y col., 1994; Spence y col., 1995).

En general todos los INNTR tienden rápidamente a favorecer la selección natural de variantes virales con mutaciones asociadas a resistencia, algunas de éstas son suficientes para que la resistencia sea cruzada con todos los demás compuestos del grupo, por lo que existe un alto riesgo de que con una sola mutación puntual (por ejemplo K103N) desaparezca la posibilidad del empleo de los INNTR dentro de los esquemas de la HAART (Coffin y col.,

1997; De Clercq, 1994; Domaoal y Remeter, 2004; Hoffmann y Mulcahy, 2006).

- Inhibidores de Proteasa (IP):

En su gran mayoría los inhibidores de proteasa son péptidos pequeños, análogos del sustrato enzimático, que pueden ajustarse con extrema precisión al sitio de unión con la enzima, bloqueando de manera reversible y competitiva la interacción de la enzima con los precursores polipeptídicos virales, lo cual impide la maduración de la partícula viral. La afinidad de estos compuestos hacia la PR con respecto a las aspartato-proteasas celulares es bastante alta, por lo que tienen un buen nivel de selectividad o especificidad por el blanco de acción. Sin embargo, estas drogas están asociadas a importantes efectos secundarios, pueden causar interacciones con otras drogas y, muchas de ellas, exhiben una afinidad de 1 a 2 órdenes de magnitud menor para la PR del VIH-2 que para la PR del VIH-1 (Crumpacker, 2001; Flexner, 1998; Hoffmann y Mulcahy, 2006; Nadler, 2003; Pichova y col., 1997).

A pesar de ser agentes con una potente actividad antiviral y un comprobado beneficio clínico, existen numerosas mutaciones virales asociadas a resistencias contra este tipo de fármacos. Es frecuente la aparición de resistencia cruzada y generalmente se desarrolla con la acumulación secuencial de mutaciones en el gen de la PR (Barbaro y col., 2005; De Clercq, 2004a; Flexner, 1998; Imamichi, 2004). Actualmente el diseño de esta clase de compuestos se inclina a la síntesis y caracterización de inhibidores no peptídicos de la enzima (De Clercq, 2002; Flexner, 1998; Hong, 2000; Pichova y col., 1997).

- Inhibidores de Fusión:

Hasta el momento sólo un compuesto dentro de esta clase de fármacos cuenta con la aprobación de la FDA para su aplicación en la terapia antirretroviral: El Enfuvritide o T-20, conocido comercialmente como Fuzeon®. Es un péptido sintético relativamente largo (36 aminoácidos), capaz de generar un impedimento estérico que evita la formación del complejo

proteico que conduce a la formación del poro de fusión, impidiendo la penetración del virus a la célula (Briz y col., 2006; Espona y col., 2005).

Por sus características bioquímicas, su novedoso mecanismo de acción y su vía de administración parenteral, el T20 presenta un perfil único en cuanto a farmacología, eficacia terapéutica, resistencias y tolerancia que aún, hoy en día, se encuentra en evaluación (Ribera y col., 2007). Estudios piloto lograron establecer que el T20 posee una potente actividad antirretroviral y que, suministrado con otras clases de fármacos dentro de los esquemas de HAART, mostraba un beneficio clínico comprobado y sostenible, presentándose como una opción para el tratamiento efectivo de aquellos pacientes que en tratamientos previos experimentaron múltiples fallas terapéuticas (Barbaro y col., 2005; Espona y col., 2005; Sabbatini y Manfredi, 2006).

Por otra parte, se ha reportado una buena tolerancia con efectos secundarios menores y, en cuanto al perfil de resistencia asociado a este compuesto, aún cuando en ensayos *in vitro* se han obtenido numerosas cepas con diversas mutaciones que les confieren resistencia al mismo, *in vivo* se ha observado un escaso desarrollo de mutantes resistentes y se ha demostrado que estas cepas mutantes podrían revertir a su fenotipo susceptible con el cese de la aplicación del medicamento (Briz y col., 2006; Espona y col., 2005; Greenberg y Cammack, 2004; Lazzarin, 2005; Morozov y col., 2007).

#### -Inhibidores de Entrada:

El fármaco que conforma este tipo de inhibidores es el Celsentri/Selzentry conocido comercialmente como Maraviroc® (Pfizer, Alemania). Fue aprobado por la FDA en agosto de 2007 y es una pequeña molécula antagonista, selectiva y lentamente reversible en su interacción con el correceptor CCR5 humano y la proteína GP 120 del VIH-1, bloqueando el reconocimiento entre estos y evitando así que virus VIH con tropismos dirigidos al correceptor

antes mencionado ingresen (infecten) a la célula hospedera ([www.pfizer.com](http://www.pfizer.com)). La utilización del fármaco está limitada únicamente a pacientes que presentan infecciones con virus de tropismo “R5” (por el correceptor CCR5), debido a que aún se desconoce si puede ejercer presión selectiva sobre la población viral, induciendo el cambio del tropismo viral hacia el otro correceptor de entrada CXCR4 (Brumme y col., 2005; Moyle y col., 2005).

En estudios *in vitro* se ha determinado que Maraviroc® no posee actividad antiviral frente a virus con tropismos hacia el correceptor CXCR4 o con tropismos mixtos, es decir, virus que usan ambos correceptores para la infección (Briz y col., 2006; Jensen y Van’t Wout, 2003).

#### -Inhibidores de Integrasa:

El desarrollo de este tipo de inhibidores ha sido relativamente lento. Su actual representante es el Raltegravir (MK-0518) o Isentress® y es hoy en día la droga más novedosa de todas las empleadas en tratamientos antirretrovirales. Tiene una alta eficiencia contra virus de tropismos “R5” y “X4” (por el correceptor CXCR4), aún en el caso de VIH-2, y es capaz de disminuir considerablemente la carga viral del paciente en apenas 10 días de tratamiento (Grinzstejn y col., 2006). Su tolerabilidad se considera muy buena, con bajos efectos secundarios (Teppler y col., 2006).

Raltegravir actúa específicamente durante el proceso de “transferencia de cadena”: Una vez que el complejo de preintegración ha sido transferido al núcleo de la célula a través de los poros nucleares, la integrasa viral enlaza el ADN de la célula hospedera; este proceso es mediado por el anclaje y enlace irreversible de los terminales hidroxilo del ADN viral a los puentes fosfodiéster del ADN celular, paso que es inhibido por el fármaco al actuar sobre el sitio catalítico de la enzima (Hoffmann y Mulcahy, 2007).

La introducción de la HAART en 1996 ha traído un considerable beneficio a los

pacientes que son VIH-1+ a nivel mundial, pero aún en condiciones óptimas de aplicabilidad, la generación de resistencia genotípica contra determinados fármacos sigue siendo un problema relevante en la aplicación de los esquemas de tratamiento antirretrovirales (Bangsberg y col., 2007; Rangel y col., 2008a; Soares y col., 2004).

Cuando los niveles farmacológicos no son suficientes para controlar la carga viral y suprimir lo máximo posible la replicación, se presentará una selección positiva de cepas resistentes que con el tiempo se convertirán en las poblaciones predominantes (Soriano y col., 2001), también es posible que existan subpoblaciones (quasiespecies) de VIH-1 resistentes a cualquier antirretroviral antes que se instituya una terapia (mutaciones preexistentes).

Al someter al paciente a un tratamiento, las drogas seleccionan las cepas virales con las mutaciones preexistentes creando así lo que se conoce como falla terapéutica (Hanna y Caliendo, 2001).

## **ANTECEDENTES**

En los virus cuyo material genético está constituido por ARN, como en el caso del VIH-1, las tasas mutacionales son verdaderamente altas, hasta  $10^6$  veces mayores que las de los organismos cuyo material genético es ADN. Entre las causas de la alta variabilidad genética en este tipo de virus están las propiedades intrínsecas de su ciclo de replicación así como factores, tanto del hospedador como del ambiente en general, que ejercen presión selectiva en la preservación (o fijación) de las variaciones nucleotídicas que aparecen en un genotipo viral en particular (Gojobori y col., 1990). Las altas tasas de replicación del VIH-1, cercanas a los  $10^{10}$  viriones por día, indican un potencial enorme de variación genética. La enzima TR del VIH-1 carece de actividad de 3'-5' exonucleasa (no puede corregir los errores en la incorporación de nucleótidos), de ahí que exhiba una tasa de mutación de  $3,2 \times 10^{-3}$  -  $1,6 \times 10^{-2}$  pares de bases por ciclo de replicación. En otras palabras, es posible que aparezca, dado el tamaño del genoma del virus (aproximadamente  $10^4$  pares de bases), una mutación en cada posición de los nucleótidos del VIH-1 con una frecuencia de  $10^4$  veces por día en una persona no tratada (Alcorn y Faruki, 2000; Hanna y Caliendo, 2001).

En lo concerniente al tratamiento antirretroviral y a la determinación genotípica de las mutaciones que confieren resistencia al mismo, cabe destacar la importancia de dos tipos de mutaciones. El primer tipo corresponde a aquellas mutaciones cuya presencia, por sí sola, confiere resistencia directa a la droga empleada en el tratamiento y que son conocidas como mutaciones primarias. El segundo tipo son las mutaciones asociadas a resistencia secundaria que por sí mismas no causan resistencia a la droga, pero pueden compensar los efectos negativos sobre la replicación viral producidos por las mutaciones primarias (Parkin y col., 2003; Zolopa, 2003). Las mutaciones asociadas a resistencia secundaria más que mutaciones debidas a la presencia de una presión selectiva producto de la TAR, son polimorfismos que

parecen generarse como parte de una estrategia evolutiva del virus frente a dicha presión, para así aumentar su capacidad replicativa (Shafer, 2002).

La aparición de cepas resistentes del VIH-1, la falta del cumplimiento estricto del tratamiento por parte del paciente, la intolerancia a corto plazo, la toxicidad de las drogas y los niveles insuficientes de las mismas son las principales razones para el fracaso de la terapia antirretroviral (Saag, 2001). No obstante, la susceptibilidad de un aislamiento viral específico a las drogas antirretrovirales puede ser probada genotípicamente por la secuencia de sus bases nucleotídicas y su evaluación a través de algoritmos (Shafer, 2002).

El desarrollo de resistencia a la Terapia Antirretroviral (TAR) ha sido ampliamente estudiado y, con la introducción de la HAART como alternativa eficaz para mejorar la supervivencia de los pacientes infectados con VIH-1, estos estudios se han profundizado.

En 1997, Hammond y col. presentaron una lista de 143 mutaciones que conferían resistencia a la HAART en cepas pertenecientes al subtipo B (44 en PR y 69 en TR, 113/143, 79%). En 1999 Yahi y col., en un estudio con 302 pacientes que recibían la HAART, reportaron que más del 50% de ellos presentaron 3 o más mutaciones en los genes de PR y TR que les creaban resistencia al tratamiento y señalaron la importancia de definir el genotipo del VIH-1 infectante antes de iniciarlo. En el año 2000 se desarrolló una base de datos de secuencias (HIV sq) para tener disponible la frecuencia de aparición de mutaciones en PR y TR del grupo M del VIH-1 (Rhee y col., 2006).

Paolucci y col. en 2001 hicieron una comparación entre pacientes tratados y no tratados con HAART y detectaron, a través de técnicas de clonamiento, variantes con resistencia a drogas no observadas en la secuenciación directa de las muestras. Shafer en 2002 realizó una revisión sobre la resistencia a drogas antirretrovirales en la que concluyó con la importancia de realizar pruebas de resistencia genotípica en pacientes infectados con VIH-1, estuviesen o no

en tratamiento. En 2004, Moatti y col. advirtieron sobre la necesidad de hacer extensivo el uso de la HAART a los países en desarrollo y el estricto seguimiento de la terapia para minimizar las posibilidades de aparición de cepas resistentes a las drogas. Ese mismo año Soares y col., y Bahia y col. publicaron sendos estudios en pacientes brasileiros donde dieron soporte a los planteamientos hechos por el grupo de Moatti y recomendaron la utilización de pruebas de genotipificación viral. Por su parte, Richman y col. (2004) estimaron que en EE.UU un 76% de los pacientes virémicos ( $> 500$  copias de ARN/ ml,  $n = 135.500$  pacientes) presentaron resistencia a una o más drogas antirretrovirales.

En 2005, el “UK Collaborative Group on HIV Drug Resistance” y el “UK CHIC Study Group” alertaron sobre el riesgo de que los pacientes VIH-1 positivos comenzaran la HAART con tres o cuatro drogas debido a la alta probabilidad de desarrollar resistencia en el corto plazo. Hacia el año 2006 los trabajos científicos sobre resistencia a drogas antirretrovirales basados en análisis de secuencias virales, se hicieron piezas indispensables en el estudio de la infección por VIH-1 y su terapia clínica a nivel mundial. Rhee y col. (2006) propusieron ampliar la base de datos de secuencias de VIH-1 basadas en el subtipo B a, por lo menos, siete subtipos más (A, C, D, F, G, CRF01 y CRF02). Kagan y col. (2006) relacionaron la aparición de mutaciones de resistencia a los IP con tratamientos prolongados. Tee y col. (2006), en su estudio basado en una muestra de pacientes VIH-1+ de Malasia, publicaron una prevalencia de resistencia a la HAART del 77,8% con el siguiente patrón: Resistencia a INNTR  $>$  resistencia a INTR  $>$  resistencia a IP.

Shafer y col. (2007) propusieron una nueva lista de mutaciones aplicable a todo el grupo M de VIH-1, donde se distinguía entre cepas transmitidas que ocasionan resistencia y cepas que se han hecho resistentes bajo tratamiento antirretroviral. Por su parte, Cane y col. (2007) publicaron la identificación de mutaciones accesorias asociadas con altos niveles de

resistencia en el gen de la TR.

En Venezuela se han realizado varios estudios sobre aspectos clínicos y virológicos del VIH-1, algunos de ellos con la finalidad de conocer los subtipos circulantes. Quiñones-Mateu y col. (1995) y Quiñones-Mateu y Domingo (1999) establecieron que el subtipo circulante predominante en el país es el B del grupo M; Delgado y col. (2001) y Castro y col. (2003) publicaron las primeras evidencias de circulación del subtipo recombinante B/F; Castro y col. (2005) indicaron la introducción del subtipo C y dieron evidencias de circulación de otro subtipo recombinante el B/C. Por otro lado, Torres y col. (2007) publicaron la presencia de VIH-2 subtipo A, lo que señala un aumento en los tipos y subtipos virales que están circulando en el país.

En lo referente a la prevalencia de mutaciones asociadas a resistencia a drogas antirretrovirales, el trabajo de Delgado y col. (2001), enmarcado en una investigación de la ONU/SIDA para Latinoamérica, fue el primero en basarse en un número importante de muestras (n=100), analizadas a través del ADN proviral, para determinar patrones de resistencia. Los resultados obtenidos fueron del 26% de resistencia a los inhibidores de TR (ITR), del 9% a los inhibidores de PR (IP) y la transmisión de cepas resistentes en un paciente no tratado (naïve).

Dieudonne y col. (2006) detectaron una alta prevalencia (86%) de mutaciones secundarias a IP, las cuales están asociadas a mejorar la capacidad replicativa de cepas mutantes resistentes a la terapia antirretroviral. Bouchard y col. (2007) realizaron un trabajo, basándose en pacientes no sometidos a tratamientos antirretrovirales (pacientes naïve), donde detectaron un 10% de mutaciones de resistencia a los ITR y propusieron dos marcadores moleculares constituidos por polimorfismos en la región de la PR (I62T y V77T) para la epidemia local subtipo B.

## **JUSTIFICACIÓN**

Veinticinco años después del aislamiento del VIH-1, se considera que la infección por este virus ha pasado de una condición fatal a una enfermedad crónica clínicamente manejable. No obstante, para la inmensa mayoría de las personas viviendo con VIH/SIDA a nivel mundial los tratamientos antirretrovirales son inaccesibles debido a sus altos costos, sobre todo en los países pobres y/o en vías de desarrollo (Kamps y Hoffmann, 2007).

La HAART ha sido adoptada en Venezuela por el Programa Nacional de SIDA desde 1999 (Bouchard y col., 2007). De las 23 drogas antirretrovirales disponibles en el mundo, 19 (incluida la T-20, Fuzeon<sup>®</sup>) fueron usadas en Venezuela en 2007 y la HAART le fue suministrada a más de 21.000 personas infectadas. Sin embargo, la aparición y transmisión de cepas resistentes a los diferentes esquemas de TAR es uno de los principales problemas en la consecución de terapias asertivas que mejoren, a largo plazo, la calidad de vida de los pacientes (Rangel y col., 2008a).

La información disponible a este respecto es muy limitada a nivel nacional y, por otra parte, la aplicación de métodos de genotipificación basados en estuches comerciales (como por ejemplo Trugene<sup>™</sup> y ViroSeq<sup>™</sup>) eleva aún más el costoso tratamiento para VIH-1 y, dado que permiten analizar un número específico de muestras, sólo son utilizados bajo estrictas normas de prioridad (Rangel y col., 2008a).

La posibilidad de contar con un método alternativo de genotipificación que, por un lado, sea más asequible al médico tratante y al paciente y, por otro lado, ofrezca mayor amplitud en el análisis del gen de la TR, permitiría analizar más codones del gen y extendería la probabilidad de detectar mutaciones que confieran resistencia en las etapas iniciales del tratamiento, e inclusive antes de su aplicación, pudiendo prevenir así las fallas terapéuticas.

Lo anteriormente expuesto se traduce en la necesidad de ahondar en los estudios de

genotipificación, no sólo porque es de interés clínico y epidemiológico, sino también porque permitiría incrementar el número de muestras analizadas y establecer tecnologías dirigidas a conocer características específicas de la infección por VIH-1 en nuestro entorno y los patrones de resistencia genotípica al TAR.

## **OBJETIVOS**

### **1.- Objetivo General**

Desarrollo y evaluación de un método alternativo para la determinación de resistencia genotípica a drogas antirretrovirales en pacientes venezolanos VIH-1+.

### **2.- Objetivos Específicos**

- 2.1) Estandarización de una técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR o RT-PCR) que permita la amplificación de las regiones que codifican para las enzimas virales PR y TR ubicadas en el gen *pol* del VIH-1.
- 2.2) Determinar la sensibilidad y especificidad de la PCR estandarizada.
- 2.3) Secuenciación de los productos amplificados por la PCR y evaluación de la prevalencia de mutaciones que confieren resistencia a IP, INTR e INNTR.
- 2.4) Comparación y evaluación del método normalizado con un método comercial.
- 2.5) Establecimiento de patrones de subtipificación viral utilizando métodos filogenéticos.

## **MATERIALES Y METODOS**

### **1.- Materiales**

#### **1.1) Muestras:**

Se obtuvieron 171 muestras sanguíneas por venopunción en presencia de EDTA (anticoagulante) de pacientes venezolanos VIH-1 positivos, previa información al paciente y su autorización, además de la aprobación de la Comisión de Bioética del IVIC. Los pacientes provenían principalmente de la región del Distrito Capital, Caracas, Venezuela.

Además, se contó con 28 muestras de plasma cedidas por el Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel” (Ministerio del Poder Popular para la Salud, Caracas) que fueron utilizadas para comparar los resultados de amplificación y secuenciación obtenidos con el método desarrollado y el método comercial que utilizan en dicho Instituto (Trugene HIV-1/Opengene, Bayer Health Care Laboratories).

#### **1.2) Reactivos:**

Las soluciones se prepararon con reactivos grado analítico o grado “Biología Molecular”, distribuidos comercialmente por las casas Sigma Chemical Co. (USA), Riedel-de-Haën (Alemania), Merck (Alemania), Promega (USA) o Invitrogen (USA). En aquellas en que se requirió, dichas soluciones fueron esterilizadas en autoclave a 121°C con una presión de 15 lbs/in<sup>2</sup> durante 15 minutos o, por filtración, utilizando filtros Millipore™ de 0,45 micras.

#### **1.3) Enzimas:**

Se utilizaron las enzimas comerciales, DNA Polimerasa (Platinum Taq DNA Polimerase™) y una Transcriptasa Reversa (Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV™), distribuidas por Invitrogen Life Technologies, según las especificaciones de la casa comercial.

#### **1.4) Soluciones preparadas:**

Buffer Fosfato Salino (PBS) 1X, libre de Ca<sup>+2</sup> y Mg<sup>+2</sup>: La solución contiene NaCl

137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM disueltos en agua bidestilada hasta el volumen deseado.

Solución de Ficoll-Paque™ PLUS lista para usar, distribuida por Amersham Biosciences.

### **1.5) Estuches y reactivos comerciales:**

QIAmp viral RNA mini kit (QIAGEN, Alemania).

QIAmp DNA Blood mini kit (QIAGEN, Alemania).

QIAquick PCR Purification Kit. (QIAGEN, Alemania).

Marcador de peso Molecular 1 Kpb Plus Leader de 12 fragmentos: 0,1 – 12 Kpb (Gibco-BRL, Invitrogen).

ADN patrón para cuantificación: Vector de *E. coli* W3350, Lambda DNA, 48,5 Kpb, 441 µg/µL (Promega, EUA).

### **1.6) Iniciadores o cebadores:**

La Tabla II describe los iniciadores (“primers”) utilizados, su secuencia, orientación de hibridación durante la amplificación y la ronda donde se usaron en las PCR anidadas (“nested” PCR). La Figura 5 muestra los sitios aproximados de hibridación de los diferentes iniciadores sobre el genoma del VIH.

## **2.- Métodos**

### **2.1) Separación de plasma y células mononucleares de sangre periférica (PBMC):**

Se colectó de 10 a 15 mL de sangre periférica por punción intravenosa en cada paciente VIH+ utilizando tubos sellados al vacío con EDTA (Vacutainers®-EDTA). Las muestras de sangre se centrifugaron en una centrifuga marca Sorvall® modelo RC-2 durante cinco minutos a 433 x g, utilizando un rotor Sorvall® HS-4 (camisa basculante o “swinging

Tabla II. Iniciadores a utilizar para la amplificación y secuenciación del gen *pol* del VIH-1.

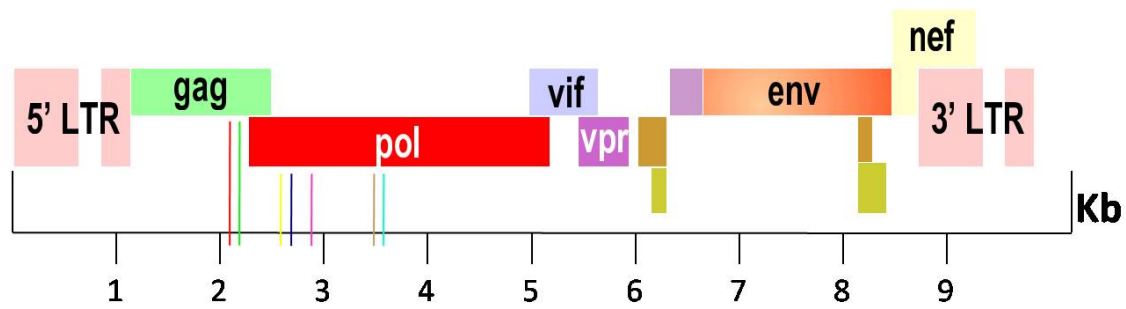
| <i>Primers</i>  | Secuencia                                 | Sentido | Ronda de amplificación                   |
|-----------------|-------------------------------------------|---------|------------------------------------------|
| PRT05<br>(*)    | 5' - GCCCCTAGGAAAAAGGGCTGTTGG-3'          | 5' – 3' | 1 <sup>era</sup> ronda                   |
| POL1<br>(**)    | 5'-GTTTTTCAGATTTTAAATGGCTCTTGA-3'         | 3' – 5' | 1 <sup>era</sup> ronda                   |
| PRT15<br>(*)    | 5' - TGAAAGATTGTACTGAGAGACAGG-3'          | 5' – 3' | 2 <sup>da</sup> ronda y<br>secuenciación |
| POL2<br>(**)    | 5' - AAATGGCTCTTGATAAATTTGATATG -3'       | 3' – 5' | 2 <sup>da</sup> ronda y<br>secuenciación |
| A35<br>(***)    | 5'-TTGGTTGCACTTTAAATTTTCCCATTAGTCCTATT-3' | 5' – 3' | Solo<br>secuenciación                    |
| Sp6 (**)        | 5'-AGATATCAGTACAATGTGCT-3'                | 5' – 3' | Solo<br>secuenciación                    |
| 3PRT2<br>(****) | 5'-AATGCTTTTATTTTTTCTTCTGTCAATGGC-3'      | 3' – 5' | Solo<br>secuenciación                    |

(\*) Persaud y col., 2000

(\*\*) Laboratorio de Virología Molecular, IVIC

(\*\*\*) Devereux y col., 2000

(\*\*\*\*) Fleury y col., 2003



|               |             |                                   |           |             |
|---------------|-------------|-----------------------------------|-----------|-------------|
| Pol 2085-5096 | HIV PRT O5  | GCCCCTAGGAAAAAGGGCTGTTGG          | 2008-2031 | sentido     |
| Pol           | HIV Pol 1   | GTTTTCAGATTTTTAAATGGCTCTTGA       | 3601-3575 | antisentido |
| Pol           | HIV PRT 15  | TGAAAGATTGTACTGAGAGACAGG          | 2057-2080 | sentido     |
| Pol           | HIV Pol 2   | AAATGGCTCTTGATAAATTTGATATG        | 3587-3562 | antisentido |
| Pol           | HIV A(35)   | TTGGTTGCACTTTAAATTTCCCATAGTCCTATT | 2530-2564 | sentido     |
| Pol           | HIV Sp6     | AGATATCAGTACAATGTGCT              | 2976-2995 | sentido     |
| Pol           | HIV 3'PRT 2 | AATGCTTTTATTTTTCTTCTGTCAATGGC     | 2650-2621 | antisentido |

Figura 5. Representación gráfica de los sitios de hibridización de los iniciadores.

bucket”), a temperatura ambiente (TA) para separar el plasma sanguíneo. Con micropipetas de 1 mL de capacidad y con protección aerosol se repartió el plasma obtenido en tubos de microcentrifuga de 1,5 mL y se congeló a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

El sedimento celular (unos 6 mL) se tomó con pipetas serológicas de 10 mL y se diluyó en una proporción 1:1 con buffer fosfato salino (PBS) pH: 7,2, hasta un volumen de 12 mL aproximadamente, el cual se transfirió cuidadosamente a tubos de 15 mL (Falcon, Nalgene®) preservados con un “colchón” de 3 mL Ficoll-paque™ (Amershan Biosciences®, Suecia) de densidad 1,078 g/mL y se centrifugó por 20 min, a 433 x g en rotor Sorvall® HS-4 a TA.

Una vez centrifugadas las muestras y establecidos los gradientes de densidad, se procedió a recolectar con micropipetas de 1 mL y protección aerosol la banda de células mononucleares (linfocitos y monocitos) para transferirlas a otro tubo de 15 mL limpio y realizar tres lavados por centrifugación, con PBS a máximo volumen (15 mL) por 5 min a 433 x g a TA. Al finalizar el tercer lavado, las células (PBMC) se encontraron listas para ser criopreservadas en una solución de 90% de suero fetal bovino (SFB) y 10% de Dimetil Sulfoxido (DMSO) hasta su uso.

## **2.2) Extracción de ADN viral:**

El ADN viral se extrajo utilizando el estuche comercial QIAmp DNA Blood mini kit (QIAGEN) siguiendo el protocolo recomendado por el manual instructivo.

Se colocaron 20  $\mu\text{L}$  de Proteasa QIAGEN (o Proteínasa K 10 mgr/mL) en un microtubo de centrifuga de 1,5 mL, seguidamente se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de la suspensión de PBMC descongelada y se mezcló con pipeta. A esta mezcla se le adicionaron 200  $\mu\text{L}$  de la solución de lisis (Buffer AL) para romper la membrana celular. Este tratamiento permite la liberación del ADN cromosomal. Toda la mezcla se incubó por 10 min a  $56^{\circ}\text{C}$ , luego se agregó un volumen de 200  $\mu\text{L}$  de etanol 95-100% y se agitó por vortex para posteriormente

pasar la muestra por una columna de afinidad (QIAamp Spin Column). La muestra en la columna se centrifugó a 6.000 x g por 1 min, descartando el líquido y conservando la columna con el ADN adherido a la membrana de sílica gel para los siguientes pasos.

Se realizaron lavados sucesivos a la columna con 500 µL de las soluciones AW1 y AW2, se descartó el líquido y se conservó la columna para la elución del ADN. Se agregó a la columna 50 µL de solución de elución (Buffer AE) y se incubó a TA por un min. Se centrifugó a 6.000 x g durante 1 min. El ADN así extraído fue congelado a -70°C hasta su uso.

### **2.3) Extracción de ARN viral:**

La extracción del ARN viral se realizó utilizando el estuche comercial QIAamp viral RNA mini kit (QIAGEN) siguiendo el protocolo recomendado por el manual instructivo.

El principio del estuche está asociado al tratamiento de la muestra (140 µL de plasma sanguíneo) con una solución de lisis por 15 min (560 µL de Buffer AVL+ Carrier RNA) para romper la envoltura y la cápside viral, permitiendo la liberación del ARN del virión. Luego se agregó un volumen de etanol 95-100% dependiente del volumen de muestra y se hizo pasar la mezcla por una columna de afinidad (QIAamp Spin Column). Se centrifugó a 6.000 x g por 1 min, se descartó el líquido y se conservó la columna con el ARN adherido para los siguientes pasos. Se realizaron lavados sucesivos a la columna con 500 µL de las soluciones Buffer AW1 (centrifugando a 6.000 x g por 1 min) y Buffer AW2 (13.000 x g por 3 min), se descartó el líquido y se conservó la columna con el ARN adherido para la posterior elución. Se agregó a la columna 60 µL de solución de elución (Buffer AVE) se incubó a TA por 1 min y se centrifugó a 6.000 x g durante 1 min. Este último paso permite una buena conservación del ARN y en él se obtiene un rendimiento de 90 - 100 % en la extracción (según protocolo recomendado por el fabricante).

#### 2.4) Transcripción Reversa:

Con el ARN viral extraído se preparó una solución de reacción con la enzima Transcriptasa Reversa M-MLV™ para la generación de la primera hebra de ADN complementario (un híbrido ARN- ADN). La mezcla final de reacción incluyó: 0,4 mM de cada uno de los deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs); 0,4 mM de DTT (Ditiotreitol); 0,8 U de RNase OUT™ (inhibidor recombinante de ribonucleasas); solución tampón Tris-HCl 7 mM, KCl 10,5 mM, MgCl 0,42 mM; 10 µL del ARN extraído y 0,2 pM del iniciador antisentido para la primera ronda de amplificación (POL 1). La mezcla de reacción se incubó a 37 °C durante 3 h y luego se inactivó por congelación a -70°C por 15 min.

#### 2.5) Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR):

Una vez generado el híbrido ARN-ADN y extraído el ADN pro-viral, se realizaron sus respectivas amplificaciones por la técnica de PCR en dos rondas o PCR anidada (“nested PCR”) con la enzima polimerasa Platinum Taq DNA Polimerase™, esta enzima es una ADN polimerasa recombinante de *Thermophilus aquaticus* con propiedad “hot start” que le permite incrementar su especificidad, sensibilidad y rendimiento durante la reacción.

Se preparó una mezcla final de reacción que contenía: 0,2 mM de cada uno de los deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs); 2,5 mM de MgSO<sub>4</sub>; 0,2 pM de los iniciadores sentido y antisentido para la primera ronda de amplificación; solución tampón 20 mM Tris-HCL, 50 mM KCl; 10 µL de ADNc o ADN y 2,5 U de Platinum Taq DNA Polimerase™. Esta mezcla se colocó en tubos de 0,5 mL y se llevó a un termociclador donde se desnaturalizó por 5 min a 95°C y luego se sometió a 30 ciclos que incluyeron tres pasos: desnaturalización (90°C x 60 s), hibridización o anillamiento (55°C x 30 s) y extensión (72°C x 2 min) para la primera ronda de amplificación.

En la segunda ronda de amplificación, 5 µL del producto amplificado en la primera

fue agregado a una mezcla similar a la antes descrita pero que contenía los iniciadores específicos internos o de la segunda ronda, y de la misma forma fue sometida a una desnaturalización de 5 min a 95°C para pasar a 30 ciclos que incluyeron tres pasos: desnaturalización (90°C x 60 s), hibridización o anillamiento (50°C x 30 s) y extensión (72°C x 2 min).

## **2.6) Electroforesis de ADN y registro de imágenes:**

La separación, resolución e identificación de los fragmentos de ADN amplificados de 1.500 pb, aproximadamente, se realizó por medio de una electroforesis submarina en gel de agarosa al 1 % p/V en buffer TBE 1X (Tris.HCl 89 mM; Ácido Bórico 89 mM; EDTA 2 mM (pH 8,0) teñido con bromuro de etidio (10 mg/mL). Un volumen de 5 µL del ADN amplificado en la segunda ronda se mezcló con 0,5 volúmenes de un buffer de carga 5X (azul de bromofenol 0,25 % (p/v); xilencianol 0,25 % (p/v); glicerol 50 % (v/v) y se colocó en los “bolsillos” del gel. La corrida se llevó a cabo con un voltaje de 120V a corriente constante durante 40 min.

A fin de verificar el tamaño del producto amplificado obtenido se utilizó un marcador de peso molecular 1Kpb Plus Leader (Gibco). Para la visualización del ADN los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (10 mg/mL), el cual se intercala en la doble cadena de ADN y fluoresce bajo luz ultravioleta, se observaron por fluorescencia indirecta a 320 nm en un transiluminador UV y fueron fotografiados con una cámara digital C-3020 OLYMPUS™ utilizando el software UVP™ asociado a un computador personal (PC).

## **2.7) Purificación de productos de la PCR:**

Las muestras positivas por PCR de la región en estudio se purificaron utilizando el estuche comercial QIAquick® PCR Purification (Qiagen®, Alemania), según el protocolo de la casa comercial: Se añadieron 5 volúmenes del buffer PBI a un volumen de producto de PCR.

Se mezcló y colocó la muestra en una columna de centrifugar QIAquick para permitir la unión del ácido nucleico a la base de sílice y se centrifugó por 30-60 s. Se descartó el filtrado y se colocó la columna en un tubo colector, se hizo un lavado con 0,75 mL del buffer PE, centrifugando por 30-60 s, se descartó el filtrado y se volvió a centrifugar en el mismo tubo por 30-60 s para secar bien la columna. La columna QIAquick se colocó en un tubo de 1,5 mL nuevo. Se añadieron 50 µL de buffer EB (10mM Tris-HCl, pH 8,5) o H<sub>2</sub>O desionizada al centro de la membrana QIAquick y se centrifugó la columna por 1 min para así eluir el ADN. La muestra purificada se congeló a -70°C hasta su uso.

## **2.8) Estimación cualitativa de la concentración de los productos amplificados por la PCR:**

La estimación de la cantidad de ADN obtenido en la PCR y purificado se realizó en geles submarinos de agarosa al 1% (p/v), como se describió previamente, y se llevó a cabo mediante la comparación con un ADN patrón (Lambda DNA, 48,5 Kpb, Promega<sup>®</sup>), vector de *Escherichia coli* cepa W3350, con una concentración de 441 µg/µL y una dilución de trabajo de 30 ngr/µL.

Se colocaron 30, 60 y 120 ng del patrón en el gel. La cuantificación se realizó comparando la intensidad de las bandas de las muestras positivas con la intensidad del marcador en concentraciones conocidas.

## **2.9) Secuenciación:**

El laboratorio de Virología Molecular del IVIC no posee la capacidad de secuenciación de las muestras por lo que se utilizó el servicio de la casa comercial MacroGen Inc. con sede en Seúl, Corea del Sur, ([www.macrogen.com](http://www.macrogen.com)).

El proceso de secuenciación realizado por dicha casa se basa en el método desarrollado por Sanger y Coulson (1975):

Se emplean nucleótidos trifosfatos carentes del grupo hidroxilo en el carbono número 3 del anillo de ribosa, de manera que cuando éste es incorporado en la cadena por la región 3' de la hebra en crecimiento la elongación es terminada selectivamente en A, C, G o T, dependiendo del nucleótido que se una en ese momento, obteniéndose así una población de moléculas de ADN de diferentes tamaños.

La manera de visualizar la secuencia es por medio del marcaje con moléculas fluorescentes (4 tipos diferentes, una para cada nucleótido), éstas al ser excitadas por un rayo láser emiten radiación a una determinada longitud de onda (correspondiente a cada fluoróforo), la radiación emitida es captada por un espectrofotómetro y, por medio de un programa, traducida a la secuencia (con los símbolos A, T, C y G).

Todo el proceso se lleva a cabo a través de una PCR partiendo del templado original (producto de la PCR amplificado en la segunda ronda), los pasos son desnaturalización, hibridización y extensión para volver a utilizar el templado una y otra vez.

La mezcla con las distintas moléculas es corrida electroforéticamente en un gel, donde las más pequeñas pasarán primero por el láser, seguidas de las de mayor tamaño, resultando en la secuencia correspondiente al templado original.

En este estudio se procedió a secuenciar aquellas muestras purificadas con concentraciones cualitativamente superiores a los 10 ng/μL en presencia de los iniciadores utilizados en la segunda ronda de amplificación (PRT15 y POL2), además de otros tres iniciadores (A35, Sp6 y 3PRT2) que hibridizan internamente en el fragmento de 1.500 pb. amplificado y tienen como función facilitar el posterior análisis de la secuencia obtenida.

## **2.10) Análisis de secuencias, subtipificación de las secuencias, determinación y prevalencia de mutaciones a los IPR y los ITR:**

La alineación, identificación y edición de las secuencias se realizó analizando los

electroferotipos de las muestras secuenciadas con el programa comercial DNAMAN<sup>®</sup> versión 5.2.2. (Lynnon Bio Soft, Canadá) y la base de datos del GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank)). El programa utilizado contiene un paquete “todo en uno” para aplicaciones de biología molecular que permite, a través de un sistema integrado, el análisis de secuencias con una alta eficiencia. Al mismo tiempo, se pueden realizar múltiples alineamientos de secuencias, diseñar iniciadores para PCR y análisis de secuencias para proteínas, entre otras aplicaciones.

En la posterior evaluación de la presencia de mutaciones y asignación de subtipos, se utilizó la base de datos de la Universidad de Stanford, EUA ( Stanford University HIV Drug Resistente Database, <http://hivdb.stanford.edu>) y se accedió a los algoritmos que permiten evaluar la presencia de mutaciones, la resistencia a drogas antirretrovirales que esas mutaciones confieren, el lugar del genoma viral en el que están ubicadas y el nivel de intensidad de esa resistencia a drogas.

La base de datos de la Universidad de Stanford incluye los programas HIVseq, HIVdb y CPR. El primero acepta secuencias, enviadas por el usuario, de las regiones de la Proteasa, Transcriptasa Reversa e Integrasa del VIH, las compara con las secuencias consenso de referencia del subtipo B y usa las diferencias encontradas como parámetros de consulta para interrogar a la base de datos y así proveer al usuario de información sobre la prevalencia de mutaciones presentes en su secuencia, en todas las regiones analizadas según el subtipo, y que confieren resistencia a los inhibidores de PR, TR e IN.

El HIVdb es un programa que acepta secuencias del gen pol del VIH-1 enviadas por el usuario y suministra niveles inferidos de resistencia a 20 drogas antirretrovirales aprobadas por la FDA (incluyendo a Raltegravir, inhibidor de IN). En este programa a cada mutación de resistencia a drogas contra el VIH-1 se le asigna un puntaje y un comentario, el puntaje total

para cada droga en específico proviene de la sumatoria de puntajes de las mutaciones que ofrecen resistencia a ella. A través de los puntajes totales para las drogas, el programa señala un nivel de resistencia: Susceptible, posible bajo nivel de resistencia, bajo nivel de resistencia, resistencia intermedia o alto nivel de resistencia. Esta información es indispensable para el diseño del tratamiento antirretroviral y su prescripción al paciente.

La CPR (“Calibrated Population Resistance”) versión 4.1 beta, es una herramienta que permite el análisis rutinario de secuencias de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1). Puede estimar la prevalencia de resistencia a drogas anti VIH usando datos de secuencias poblacionales; también puede utilizarse para el análisis general de secuencias del gen *pol* del VIH-1. Tiene como ventaja que realiza el estudio de hasta mil secuencias simultáneamente, empleando otros programas de la base de datos, lo que facilita la obtención de resultados de prevalencia de mutaciones y resistencia a drogas para una población en particular.

La base de datos de la Universidad de Stanford contiene, para la región de la PR del subtipo B del VIH-1, 7.407 secuencias de pacientes que nunca han recibido tratamientos antirretrovirales (“naive”) y 6.651 secuencias de pacientes que si han recibido IP. Para la región de la TR, 5.539 secuencias de pacientes “naive” y 10.942 secuencias de pacientes bajo ITR. Con respecto a esas poblaciones es que se compararon las secuencias obtenidas en el presente trabajo para determinar la prevalencia de mutaciones en los pacientes venezolanos VIH-1+.

### **2.11) Análisis estadísticos:**

La prevalencia de mutaciones que confieren resistencia a drogas antirretrovirales obtenida en este trabajo, se comparó con la prevalencia de mutaciones indicada en la base de datos de la Universidad de Stanford. Las diferencias estadísticas se evaluaron por medio del programa Epi Info™ versión 3.5.1, diseñado por el Centro para el Control de Enfermedades de

Atlanta, EUA (CDC: “Control Disease Center”), el cual emplea la prueba de  $\chi^2$  (chi o ji cuadrado) con un límite de confianza del 95 % ( $p < 0,05$ ), aplicando la corrección por continuidad o corrección de Yates y la prueba exacta de Fisher, cuando el valor de frecuencia esperado resulta menor de 5 ([www.cdc.gov/EpiInfo/](http://www.cdc.gov/EpiInfo/)).

## **2.12) Análisis filogenéticos:**

Empleando el programa comercial DNAMAN<sup>®</sup> 5.2.2., se utilizó el modelo de sustitución de nucleótidos de Kimura dos parámetros (K2P) para el cálculo de las distancias genéticas entre las secuencias y, posteriormente, se llevó a cabo la reconstrucción filogenética mediante la técnica del vecino más cercano (“neighbour joining”) con 1.000 réplicas de secuencia de arranque (“bootstrap”).

El modelo de sustitución de nucleótidos de Kimura dos parámetros (K2P) supone que las mutaciones (sustitución de nucleótidos) aparecen en forma aleatoria; sin embargo, la tasa de transiciones es generalmente mayor que la tasa de transversiones, por esto el modelo propone la inclusión de dos parámetros, uno para las transiciones ( $\alpha$ ) y otro para las transversiones ( $\beta$ ), quedando la siguiente fórmula para las sustituciones:  $S = (1 - \alpha - 2\beta)$ , lo que significa que cada nucleótido tiene una tasa de sustitución transicional ( $\alpha$ ) por unidad de tiempo y dos tasas de sustitución transversional ( $\beta$ ) por unidad de tiempo (Kimura, 1980).

El principio del método del vecino más cercano es encontrar pares de unidades taxonómicas operacionales, en este caso secuencias nucleotídicas, que minimicen la longitud total de las ramas en cada etapa de agrupamiento de esas unidades, comenzando con un árbol filogenético en forma de estrella (Saitou y Nei, 1987). Las réplicas de secuencia de arranque (“bootstrap”) conforman un método de remuestreo que se utiliza para aproximar la distribución en el análisis de un estadístico, permitiendo construir intervalos de confianza sobre parámetros de interés ([www-stat.stanford.edu](http://www-stat.stanford.edu)).

Para la reconstrucción del árbol filogenético se utilizaron las secuencias de referencia del GenBank correspondientes a los códigos de acceso que se presentan en la Tabla III.

Tabla III. Códigos de acceso al GenBank de las secuencias de referencia utilizadas en la reconstrucción del árbol filogenético.

| Secuencia de referencia | Código      |
|-------------------------|-------------|
| O_SENEGAL               | AJ302646    |
| N_CAMERÚN               | DQ017382    |
| J_SENEGAL               | AF082394    |
| A1_Ucrania              | AF413987    |
| A2_CHIPRE               | AF286237    |
| AG_FRANCIA              | AF063223    |
| AG_NIGERIA              | AB049811    |
| G_CAMERÚN               | AY371121    |
| G_CUBA                  | AY586549    |
| H_África Central        | AF005496    |
| K_CONGO                 | AJ249235    |
| C_BRASIL                | AF286228    |
| C_INDIA                 | AB023804    |
| C_VENEZUELA             | Por someter |
| D_KENYA                 | AF457090    |
| D_UGANDA                | AF484477    |
| F1_BRASIL               | DQ358801    |
| F2_CAMERÚN              | AY371158    |
| B_BRASIL                | EF637046    |
| B_BOLIVIA               | AY037270    |
| B_CUBA                  | AY586542    |
| B_CANADÁ                | AY779552    |
| B_COLOMBIA              | AY561240    |
| B_EUA                   | AY173952    |
| B_MÉXICO                | AY812748    |
| B_URUGUAY               | AY781126    |
| B_ARGENTINA             | AY037269    |

## **RESULTADOS**

### **1.-Desarrollo del método para la determinación de resistencia genotípica a drogas antirretrovirales**

#### **1.1) Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR):**

Se evaluaron distintas estrategias para la amplificación del gen *pol* del VIH (tamaño aproximado: 2.900 pb) mediante la PCR en dos rondas: a) La amplificación tradicional por separado de las regiones de la PR (PCR PR) y la TR (PCR TR), b) una amplificación única de la mayor parte del gen (PCR MacroPol) y c) una amplificación parcial del gen que contuviera las regiones de PR y TR (PCR MedPol).

Los diferentes métodos se probaron con muestras de pacientes infectados a fin de establecer su eficiencia. La Tabla IV resume los resultados obtenidos, en base a los cuales se seleccionó la PCR MedPol como el método a desarrollar y evaluar para la determinación de resistencia genotípica a Drogas Antirretrovirales (DARV).

Tabla IV. Evaluación de estrategias de amplificación del gen *pol* del VIH.

| Estrategia de amplificación | Región del gen amplificada (aproximada) (pb) | Eficiencia de amplificación (%) | Eficiencia de amplificación en plasma (%) |
|-----------------------------|----------------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------------|
| PCR PR                      | 514                                          | 41/49 (84)                      | 22/41 (54)                                |
| PCR TR                      | 804                                          | 49/49 (100)                     | 25/49 (51)                                |
| PCR MacroPol                | 2.189                                        | 5/18 (28)                       | 2/5 (40)                                  |
| PCR MedPol                  | 1.530                                        | 24/24 (100)                     | 21/24 (88)                                |

### 1.2) Normalización de la PCR MedPol:

Se seleccionaron cuatro iniciadores a usar en la PCR anidada. El primer par, correspondiente a la primera ronda de amplificación, está conformado por los iniciadores designados como PRT05 (Persaud y col., 2000) y POL1. El primero hibridiza en el sentido positivo del templado (5'-3'), entre las posiciones 2.008 y 2.031 del gen *pol* del VIH. El segundo hibridiza en el sentido negativo del templado (3'-5'), entre las posiciones 3.601 y 3.575 del gen.

El ciclo de amplificación de la primera ronda se estableció de la siguiente manera: Un paso de desnaturalización a 95 °C por 5 min, para garantizar la completa separación de las hebras del material genético extraído de los compartimientos celular y plasmático de cada muestra, seguido de 30 ciclos de tres etapas cada uno (desnaturalización a 90 °C por 1 min, hibridización de iniciadores a 55 °C por 30 s y extensión de material amplificado a 72 °C por 2 min) a fin de amplificar en forma exponencial el templado original. Al finalizar este paso se aplicó una nueva etapa a 72 °C por 10 min que garantizara la total extensión de todo el material amplificado. Por último, se estableció la temperatura a 10 °C para detener la reacción y conservar la muestra para la segunda ronda, o para su almacenamiento a -70 °C hasta su uso.

En la segunda ronda de amplificación se utilizó el par de iniciadores PRT15 (Persaud y col., 2000) y POL2, los cuales reciben el nombre de cebadores internos de la PCR anidada. El primero hibridiza en el sentido 5'-3' del templado, entre las posiciones 2.057 y 2.080 del gen. El segundo hibridiza en el sentido 3'-5' del templado, entre las posiciones 3.587 y 3.562.

Todos los iniciadores utilizados en la PCR MedPol fueron sometidos a un estudio de barrido en la “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST) del “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) de la biblioteca nacional de medicina de Estados Unidos ([www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/)), sin que mostraran coincidencias apreciables o

significativas con otros organismos y/o patógenos.

El ciclo de amplificación de la segunda ronda se estableció de la misma forma que el correspondiente a la primera ronda. La temperatura de hibridización de los iniciadores internos, la cual fue de 50 °C, se determinó experimentalmente en base a una mejor definición y mayor intensidad de las bandas de amplificación, tal como se observa en la Figura 6.

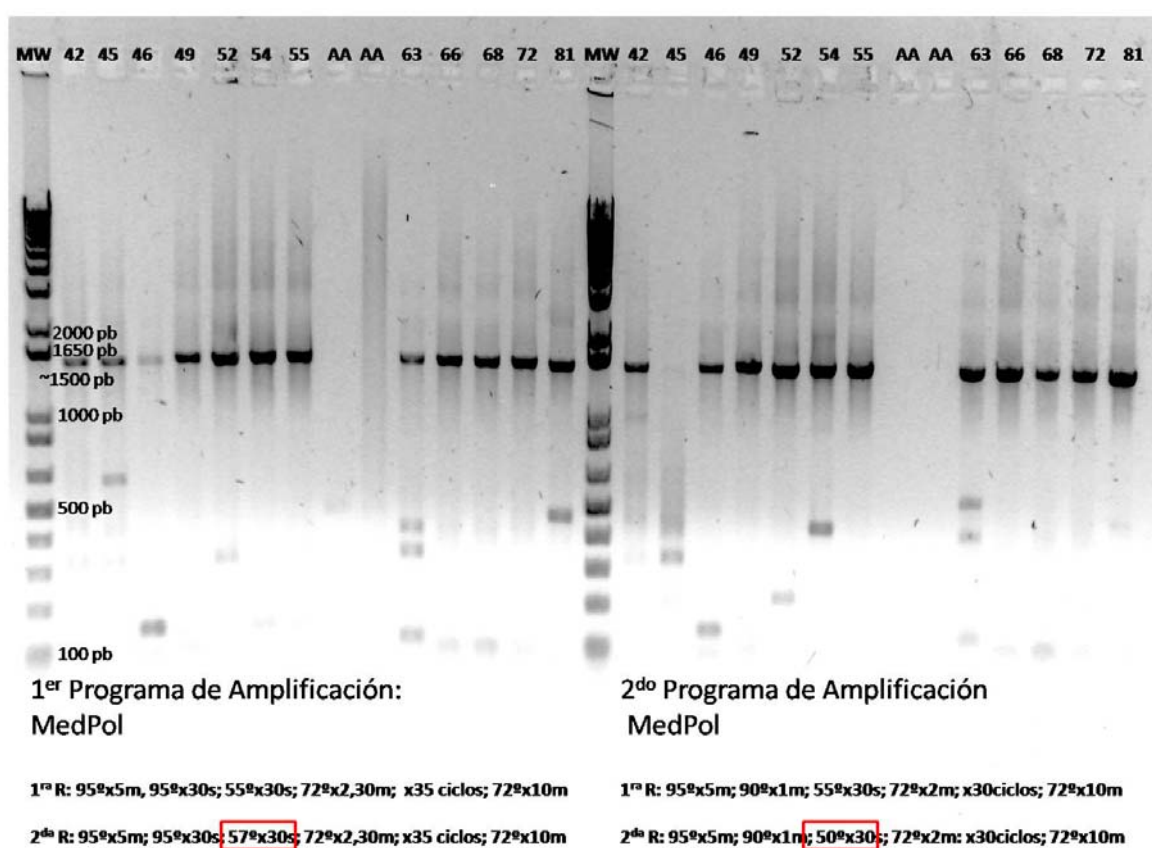


Figura 6. Fotografía de uno de los geles utilizados en la normalización de la temperatura de hibridización para la segunda ronda de amplificación de la PCR MedPol.

Gel submarino de agarosa al 1% (p/v) en TBX 1x

Condiciones de corrida: 120 V, 40 min, corriente constante

MW: 1 Kpb Plus Leader, Invitrogen

Los números corresponden a las muestras analizadas, AA es el control negativo y los rectángulos rojos resaltan las variaciones en la temperatura de hibridización.

Los iniciadores POL1 y POL2 fueron diseñados en el Laboratorio de Virología Molecular (IVIC) a fin de que su complementariedad fuese en las regiones más conservadas del gen *pol*. Para esto se analizaron secuencias de referencia encontradas en el GenBank y en la base de datos de VIH.

Las temperaturas de fusión e hibridización recomendadas de todos los iniciadores utilizados en la MedPol fueron obtenidas por medio del programa DNAMAN® 5.2.2.

En la Figura 7 puede observarse el resultado de algunas muestras procesadas con la PCR MedPol ya normalizada. La banda de amplificación corresponde a una longitud aproximada de 1.500 pb, en comparación con el marcador de peso molecular empleado (1Kpb Plus Leader, Gibco).

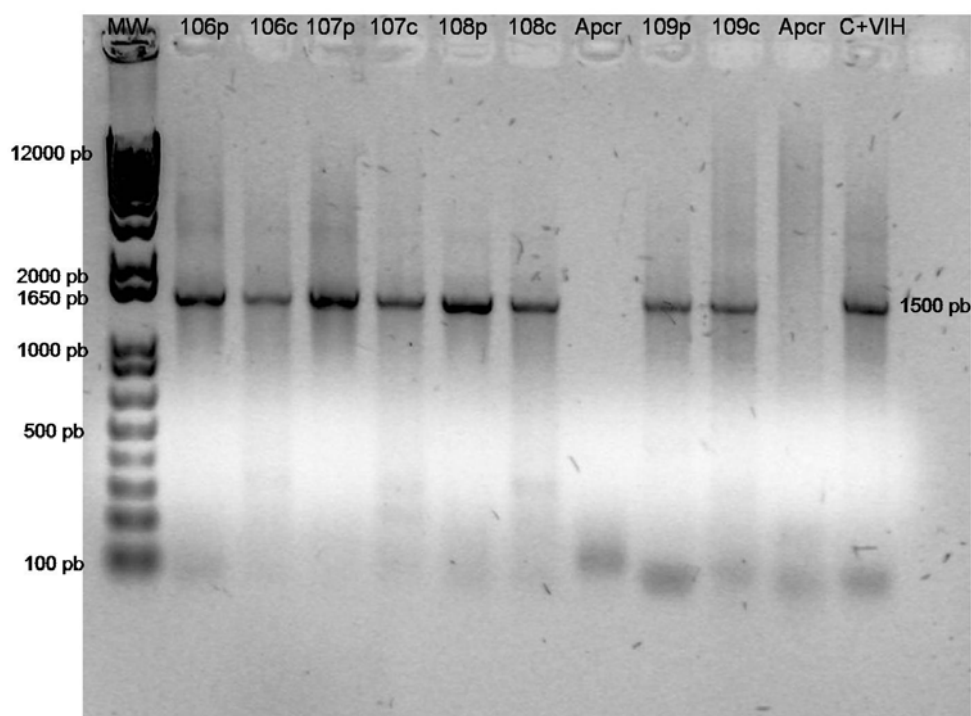


Figura 7. Fotografía de gel con muestras procesadas con la PCR MedPol normalizada.

Gel submarino de agarosa al 1% (p/v) en TBX 1x

Condiciones de corrida: 120 V, 40 min, corriente constante

MW: 1 Kpb Plus Leader, Invitrogen; p: Plasma; c: Células; Apcr: Control negativo y C+VIH: Control positivo. Los números corresponden a las muestras analizadas.

### 1.3) Estimación cualitativa de la concentración de los productos amplificadas por la PCR

#### MedPol:

Antes de proceder a la secuenciación, los productos amplificados deben ser purificados con el fin de eliminar sales, dímeros de iniciadores y restos de posibles amplificaciones inespecíficas que podrían interferir con el proceso. Además, se deben cumplir requerimientos específicos de la casa comercial MacroGen Inc. en cuanto a la cantidad óptima de muestra necesaria para la secuenciación del producto. Dicha casa requiere 50 ng, como mínimo, de la muestra purificada, de aquí la necesidad de estimar la concentración del producto amplificado.

La purificación y estimación cualitativa de la concentración de las muestras amplificadas por la PCR MedPol se realizó como se describe en los puntos 2.7 y 2.8 de Métodos. Los productos purificados con concentraciones superiores a 10 ng/μL fueron enviados a secuenciar, en presencia de 2 μL de cada uno de los siguientes iniciadores: PRT15, POL 2, A35, Sp6 y 3PRT2, a concentraciones de 5 pmol/ μL.

La presencia de los cinco iniciadores facilita el análisis de la secuencia del producto amplificado, que es de ~1.500 pb, compensando las limitaciones de los equipos de secuenciación tradicionales que sólo extienden la secuencia del templado hasta ~ 800 pb. El PRT15 y el POL2 son los iniciadores utilizados en la segunda ronda de amplificación. El A35 (Devereux y col., 2000) hibridiza en el sentido positivo (5'-3') del templado al igual que el Sp6 (Laboratorio de Virología Molecular, IVIC), el primero entre las posiciones 2.530 y 2.564 y el segundo entre las posiciones 2.976 y 2.995 del gen *pol* del VIH. 3PRT2 (Fleury y col., 2003) hibridiza en el sentido negativo (3'-5') del templado entre las posiciones 2.650 y 2.621 de dicho gen.

La Figura 8 corresponde a la estimación cualitativa de algunas muestras amplificadas por la PCR MedPol y purificadas para su envío a secuenciar.

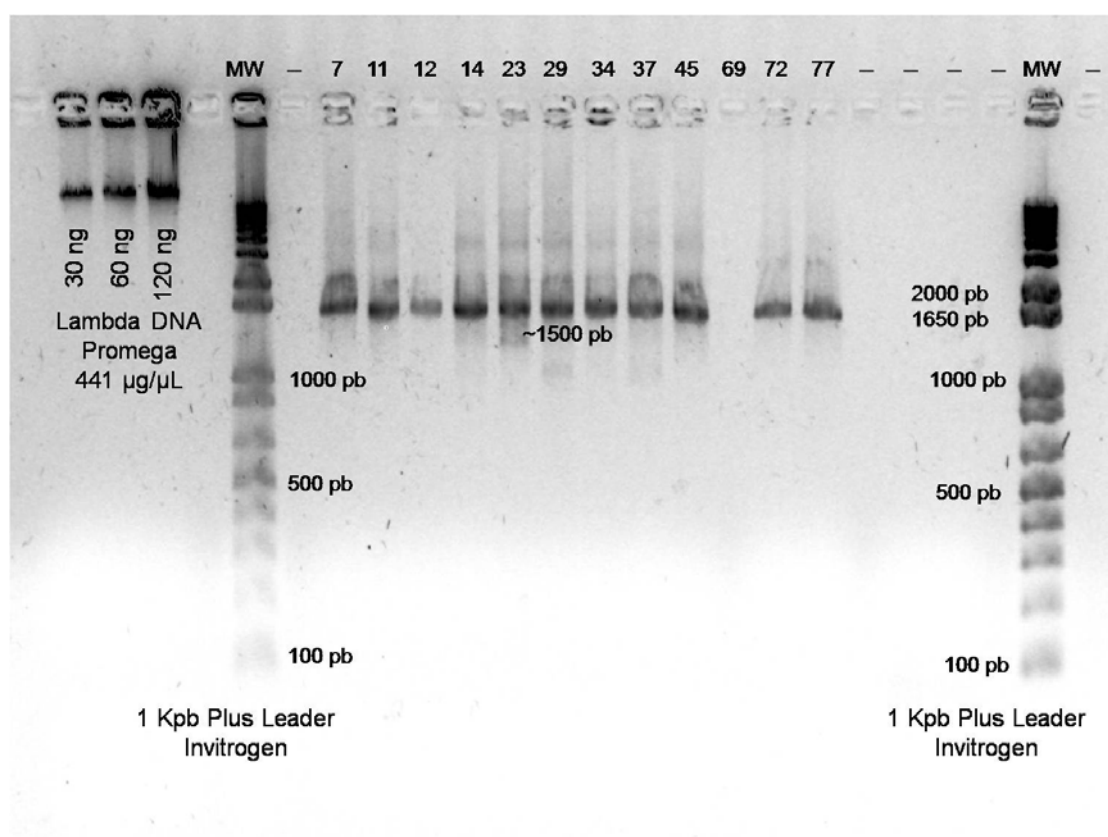


Figura 8. Fotografía de uno de los geles utilizados en la estimación cualitativa de la concentración de muestras amplificadas por la PCR MedPol.

Gel submarino de agarosa al 1% (p/v) en TBX 1x  
 Condiciones de corrida: 120 V, 40 min, corriente constante  
 MW: 1 Kpb Plus Leader, Invitrogen  
 ADN patrón para cuantificación: Lambda DNA, Promega  
 Los números corresponden a las muestras analizadas.

#### **1.4) Selección del compartimiento viral para la determinación genotípica de resistencia a DARV:**

El material genético del virus VIH-1 puede ser extraído tanto de la capa de células mononucleares de sangre periférica (PBMC), como del virus circulante en el plasma del paciente infectado. En el primer caso se obtiene integrado en el genoma celular como provirus (ADN), mientras que en el segundo caso se obtiene como ARN viral. Este último, después de un paso previo de transcripción reversa, puede ser empleado en la PCR.

A fin de seleccionar el compartimiento viral más adecuado para la determinación genotípica de resistencia a DARV, se analizó el ADN proviral y el ARN viral de 13 muestras de pacientes que han recibido o están recibiendo TAR y 7 muestras de pacientes que nunca han recibido TAR (n=20).

Las secuencias obtenidas para ambos compartimientos fueron alineadas, identificadas y editadas como se indicó en el punto 10 de Métodos, los árboles de homología se realizaron por medio del mismo programa (DNAMAN® 5.2.2). Estas secuencias fueron luego evaluadas con el programa de interpretación de resistencia genotípica HIVdb de la Universidad de Stanford. Los aminoácidos del 1 al 99 y del 1 al 342 fueron analizados para las regiones de PR y TR, respectivamente.

Los resultados de los dos compartimientos se compararon entre sí, intra e inter muestras. Se observó una similitud de 97 a 100 % cuando las secuencias pertenecían a los compartimientos de un mismo paciente y de hasta 96 % cuando eran de diferentes pacientes. En la Figura 9 se presentan estos resultados.

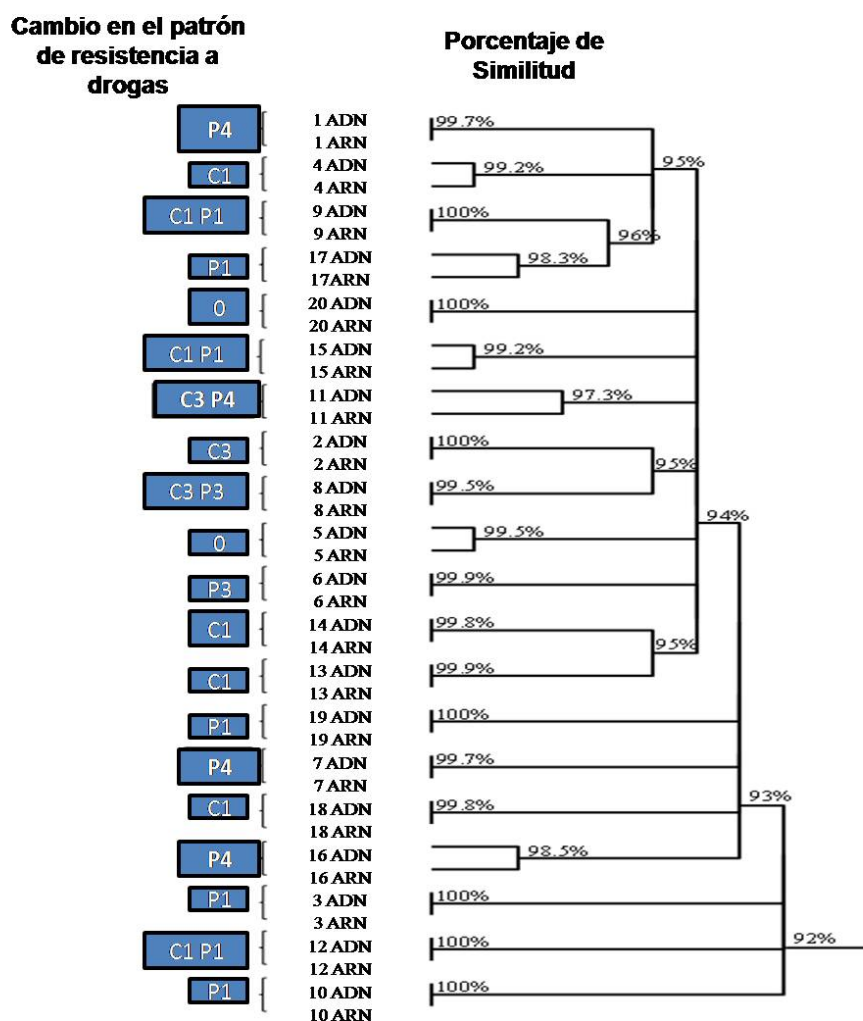


Figura 9. Diferencias en los patrones de resistencia genotípica y porcentaje de similitud entre las secuencias obtenidas del ADN proviral y el ARN viral del plasma.

Los números indican el tipo de mutación o polimorfismos observados solamente en uno de los compartimentos: **1** polimorfismo no asociado a resistencia a drogas; **2** mutación secundaria a inhibidores de proteasa; **3** mutación primaria que no confiere resistencia a una droga adicional; **4** mutación primaria que confiere resistencia a una droga adicional.

Las letras representan mutaciones encontradas exclusivamente en **C**=Células y **P**=Plasma.

Se detectaron diferencias en mutaciones de resistencia a DARV y otros polimorfismos entre los compartimientos virales de 18 de las 20 muestras estudiadas. La muestra N° 11 presentó la mayor diversidad entre las secuencias genómicas del provirus y del virus y una mutación primaria única en ambos compartimientos; esta muestra corresponde a un paciente diagnosticado hace 21 años (1987) quien ha recibido múltiples TAR desde entonces.

En general, las muestras donde se encontraron mayores diferencias entre los dos compartimientos virales, en términos de mutaciones de resistencia a drogas, fueron las provenientes de pacientes que recibieron múltiples tratamientos durante los últimos 7 años (muestras N° 1, 6, 7, 8, 11 y 16). En contraste, las muestras de pacientes sin tratamiento resultaron más similares (muestras N° 12, 14 y 15).

En cuatro de las muestras utilizadas en la evaluación de los compartimientos virales (muestras N° 1, 7, 11 y 16), el análisis genotípico del ARN viral permitió la detección de mutaciones que confieren resistencia a, como mínimo, una droga adicional. En función de estos resultados se decidió utilizar los análisis genotípicos del ARN viral presente en el plasma para la evaluación de las mutaciones que confieren resistencia a DARV de la población a estudiar.

### **1.5) Límite de detección de la PCR MedPol:**

Con la finalidad de estimar la sensibilidad del método normalizado se eligió una muestra cuya carga viral se conocía (350.000 copias de ARN/mL) y su determinación coincidía con el momento de toma de la muestra. Ésta se utilizó a manera de solución madre para preparar “patrones” por dilución con plasma humano “normal” (VIH negativo), inactivado a 56 °C por 30 min y sin inactivar. Las concentraciones obtenidas por dilución fueron: 10.000, 5.000, 1.000, 500, 250, 100, 50 y 10 copias de ARN/mL.

Los “patrones”, por triplicado, fueron sometidos al proceso de extracción del ARN

viral como se señaló en el punto 2.3 de Métodos y procesados por la PCR MedPol. No lograron amplificarse aquellos cuya concentración era menor de 1.000 copias de ARN/mL, como puede observarse en la Figura 10. De aquí que la sensibilidad para la PCR MedPol pueda estimarse como mayor a las 1.000 copias de ARN/mL.

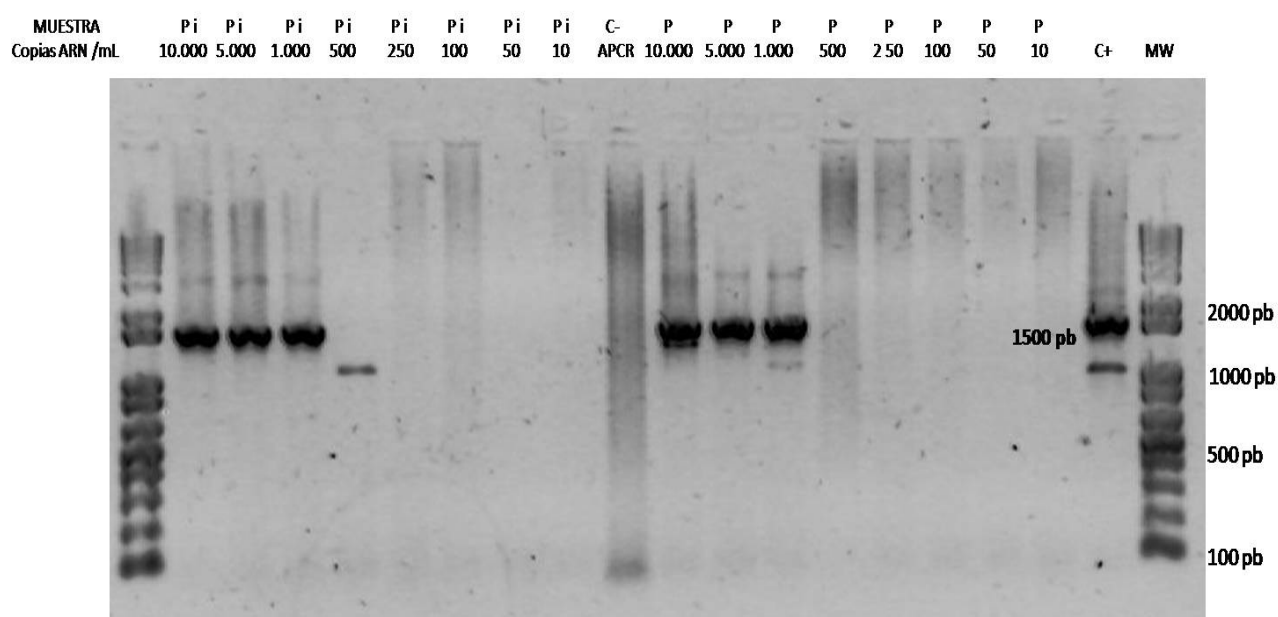


Figura 10. Fotografía de uno de los geles con el resultado obtenido en la amplificación de los patrones utilizados a fin de estimar el límite de detección de la PCR MedPol.

Gel submarino de agarosa al 1% (p/v) en TBX 1x

Condiciones de corrida: 120 V, 40 min, corriente constante

Muestra patrón (P): carga viral 350.000 copias ARN/mL, Pi= Diluida en plasma

humano normal inactivado a 56° C por 30 min, P= Diluida en plasma humano normal sin inactivar

MW: 1 Kpb Plus Leader Invitrogen

C+: Control positivo VIH.

## **2.- Comparación de la PCR MedPol con un método comercial**

A fin de evaluar el método normalizado se utilizaron 28 muestras de plasma cedidas por el Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel”, cuyas amplificaciones y secuencias fueron realizadas empleando el método comercial Trugene HIV-1/Opengene (Bayer Health Care Laboratories).

Las 28 muestras de plasma se procesaron con la PCR MedPol, las secuencias así obtenidas y las secuencias generadas con el método Trugene® se alinearon y editaron como se indicó en el punto 2.10 de Métodos. Las secuencias se identificaron con el número de muestra y siglas que indican el método mediante el cual se generaron: MP corresponde a la PCR MedPol y TG a Trugene®. Cada par de secuencias se comparó entre sí por medio de un árbol de homología realizado con el programa DNAMAN®; 25 de los pares arrojaron 100 % de similitud entre las secuencias obtenidas por ambos métodos, mientras que para 3 de los pares (14 MP-14 TG, 18 MP-18 TG y 19 MP-19 TG) el porcentaje de similitud fue de 99 %.

Los 28 pares de secuencias fueron luego evaluados con el programa de interpretación de resistencia genotípica HIVdb de la Universidad de Stanford. Se encontraron diferencias en la determinación de resistencia primaria a DARV para 8 de los pares comparados, pero debido a que el método comercial detectó mutaciones no determinadas por el método normalizado, sólo en cuatro de éstos (7MP-7TG, 13MP-13TG, 16MP-16TG y 22MP-22TG) dichas diferencias condujeron a un patrón de resistencia distinto, es decir, el diagnóstico de resistencia específica a cada droga según el tipo de inhibidor, fue diferente. Sin embargo, el diseño del método normalizado permitió el análisis de un mayor número de codones en la región de la TR lo que hizo posible detectar la mutación G333E, asociada a la susceptibilidad a la Zidovudina, y que el método comercial no logró detectar por sólo analizar hasta el codón 240 de dicha región.

En función de la alta similitud obtenida entre las secuencias generadas por ambos métodos (25/28, 89 %) y a fin de establecer una correspondencia, se cuantificó el número de mutaciones totales que confieren resistencia a los tres tipos de inhibidores obtenido por ambos métodos. Dado que dicho número es mayor para el método comercial en dos de los casos, el grado de similitud se estableció en base a éste, obteniéndose un 94 % de correlación para los IP, el 100 % para los INTR y un 94 % para los INNTR.

La Tabla V resume los resultados de la correlación entre ambos métodos y la Figura 11 muestra el árbol de homología obtenido al comparar los 28 pares de secuencias.

Tabla V. Correlación entre el total de mutaciones que confieren resistencia primaria determinado por cada método según el tipo de inhibidor.

| Tipo de inhibidor | Correlación<br>MedPol / Trugene® (%) |
|-------------------|--------------------------------------|
| IP                | 62/66 (94)                           |
| INTR              | 104/104 (100)                        |
| INNTR             | 32/34 (94)                           |

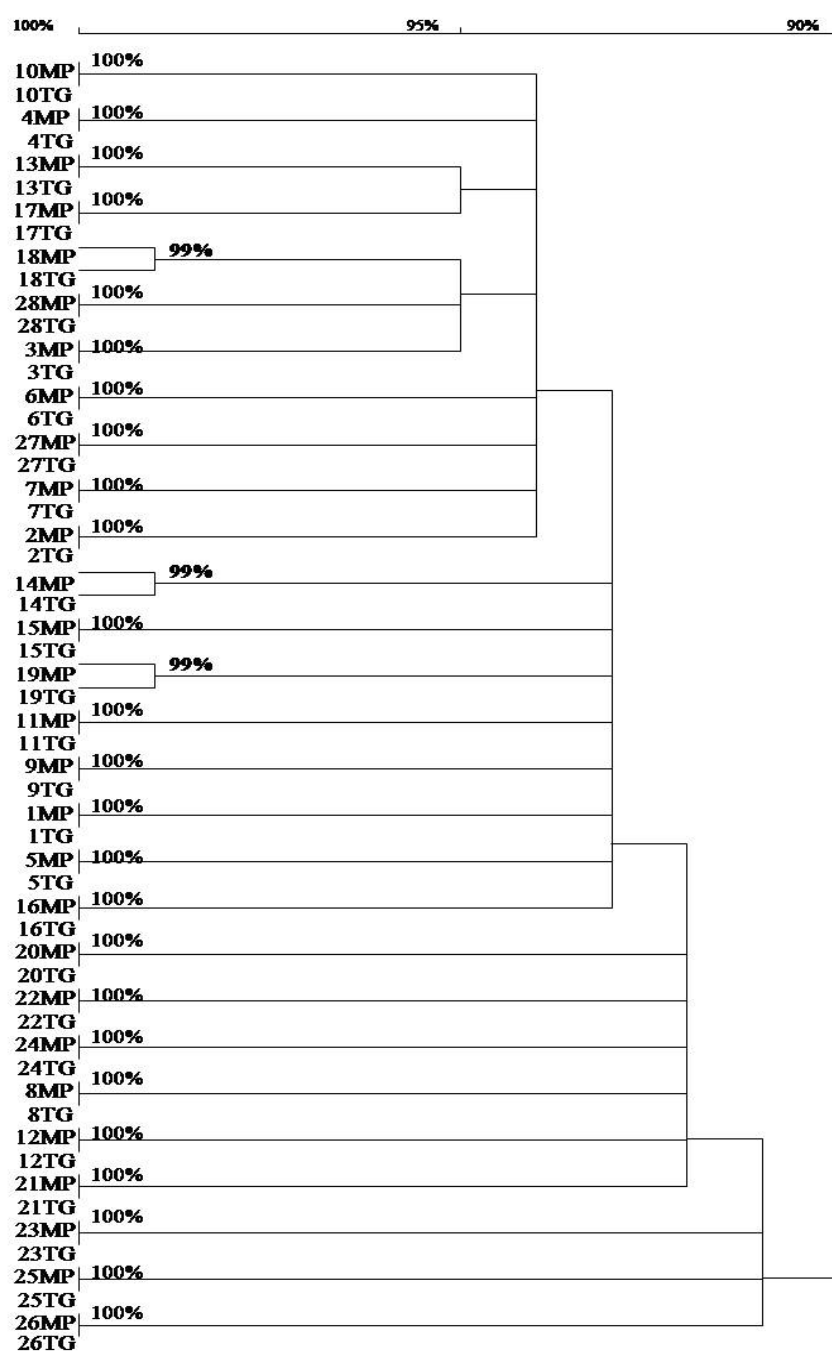


Figura 11. Porcentaje de similitud entre las secuencias de nucleótidos obtenidas empleando el método comercial Trugene® (TG) y la PCR MedPol (MP). Árbol de homología realizado con el programa DNAMAN® versión 5.2.2.

### **3.-Evaluación de la prevalencia de resistencia a drogas en población venezolana a través del método PCR MedPol**

#### **3.1) Población:**

El estudio se llevó a cabo en una población de 171 pacientes venezolanos provenientes principalmente de la región del Distrito Capital. Los criterios de selección de estos pacientes fueron los siguientes:

- a) Ser positivos a la infección por VIH, a través de diagnósticos serológicos por las técnicas ELISA y Western Blot.
- b) Ser remitidos por un médico tratante al Laboratorio de Virología Molecular del IVIC.
- c) Haber aceptado y firmado el consentimiento válido de participación en el estudio.
- d) Estar sometidos o no a tratamiento antirretroviral.

Del total, 63 pacientes nunca han recibido tratamiento antirretroviral (pacientes “naïve” o pacientes no tratados) y 108 están o han estado bajo algún esquema de tratamiento antirretroviral al menos una vez desde el diagnóstico inicial de la infección (pacientes tratados).

La población fue principalmente de sexo masculino, 83% (52/63) de los pacientes no tratados y 93% (100/108) de los pacientes tratados. Los pacientes tratados tenían una edad promedio de 39,7 años y los no tratados de 33 años. El entorno de transmisión predominante se debió a hombres que tienen sexo con otros hombres (HSH) (51/88, 58%).

A través de un cuestionario se obtuvo información sobre el cumplimiento estricto del tratamiento por parte del paciente (conocido como “adherencia al tratamiento” en términos clínicos). Se consideró que se cumplía el tratamiento en función del número de dosis perdidas en las últimas dos semanas, previas a la realización del análisis de resistencia genotípica a

drogas antirretrovirales (DARV). Dicho cumplimiento se clasificó porcentualmente de la siguiente forma: De 1 a 2 dosis perdidas, 90-100 % de rigurosidad; de 2 a 3 dosis perdidas, 70-90 %; de 3 a 4 dosis perdidas, 50-70 % y más de 4 dosis perdidas, < 50 %.

De los pacientes tratados, sólo 45 suministraron información confiable en relación al cumplimiento del tratamiento. El 49 % (22/45) de ellos lo cumple con una rigurosidad mayor al 90 %, el 29 % (13/45) con 70-90 % y el 22 % (10/45) con menos del 70 %. Estos datos indican que alrededor de la mitad de los pacientes entrevistados dejan de consumir más de 3 dosis del tratamiento al que están sometidos, lo cual debe ser tomado en cuenta para la interpretación final de la resistencia genotípica.

### **3.2) Secuenciación y prevalencia de mutaciones que confieren resistencia:**

Por medio de la PCR MedPol se logró amplificar el ARN viral obtenido del plasma de 108 muestras de pacientes tratados y de 63 muestras de pacientes no tratados. Una vez purificados los productos de la amplificación, se obtuvieron las 171 secuencias de la población en estudio para el análisis de la prevalencia de mutaciones que confieren resistencia a DARV. Dichas secuencias fueron alineadas, editadas y evaluadas tal como se indicó en el punto 2.10 de Métodos.

A fin de facilitar la interpretación de las mutaciones cabe indicar lo siguiente: Las mutaciones encontradas en los análisis de resistencia genotípica a DARV se denotan con una primera letra mayúscula, seguida de un número y una o más letras mayúsculas. La primera letra indica el aminoácido prevalente en el virus salvaje, el número corresponde al codón del gen donde ese aminoácido se encuentra y la siguiente letra, señala el aminoácido que sustituye al prevalente en el virus salvaje (primera letra) y causa la mutación.

#### **3.2.1) Pacientes no tratados**

El 38 % (24/63) de la población no tratada presentó mutaciones relacionadas a DARV,

de estas 24 muestras 7 exhibieron mutaciones que confieren resistencia primaria al menos a una DARV (11 %, 7/63), mientras que 10 mostraron mutaciones secundarias a IP (16 %, 10/63). De las 7 muestras que exhiben mutaciones que confieren resistencia primaria, 3 la presentan a INTR, 3 a INNTR y 1 a IP. La Tabla VI resume los resultados antes mencionados en relación a la población total de pacientes no tratados.

Tabla VI. Prevalencia de mutaciones encontradas en las cepas de VIH aisladas de la población total de pacientes no tratados (n=63).

| Tipo de mutación                          | Número de pacientes | Prevalencia (%) |
|-------------------------------------------|---------------------|-----------------|
| Ninguno                                   | 39                  | 62              |
| Relacionada a DARV                        | 24                  | 38              |
| Confiere resistencia al menos a una droga | 7                   | 11              |
| Confiere resistencia a IP                 | 1                   | 2               |
| Secundaria a IP                           | 10                  | 16              |
| Confiere resistencia a INTR               | 3                   | 5               |
| Confiere resistencia a INNTR              | 3                   | 5               |

La Tabla VII presenta la prevalencia de las mutaciones que confieren resistencia a IP, INTR e INNTR y la prevalencia que la base de datos de la Universidad de Stanford indica para cada mutación (Prevalencia de referencia BD Universidad Stanford), obtenida en base a una población de 7.407 pacientes VIH-1+ subtipo B no tratados para la región PR y 5.539 pacientes para la región TR. Además, se incluye el valor de significancia estadística (p) obtenido en la comparación de ambas prevalencias para cada mutación.

Tabla VII. Mutaciones que confieren resistencia primaria en las secuencias de nucleótidos obtenidas de los pacientes no tratados.

| Mutación | Tipo de inhibidor al que confiere resistencia | Prevalencia en la población estudiada (%) | Prevalencia de referencia BD Universidad Stanford (%) | p           |
|----------|-----------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-------------|
| M46I     | IP                                            | 1,6                                       | 0,1                                                   | 0,07        |
| M184V    | INTR                                          | 3,2                                       | 0,2                                                   | <b>0,01</b> |
| K70R     | INTR                                          | 1,6                                       | 0,2                                                   | 0,13        |
| T215S    | INTR                                          | 1,6                                       | 0,5                                                   | 0,28        |
| K219E    | INTR                                          | 1,6                                       | 0,1                                                   | 0,08        |
| K103N    | INNTR                                         | 1,6                                       | 0,3                                                   | 0,19        |
| G190A    | INNTR                                         | 1,6                                       | 0                                                     | <b>0,01</b> |

Los valores resaltados indican diferencias estadísticamente significativas en la prevalencia de la mutación ( $p < 0,05$ ) con respecto a la prevalencia indicada en la BD Universidad Stanford (BDUS).

### 3.2.2) Pacientes tratados

La distribución de mutaciones relacionadas a DARV en la población de pacientes tratados fue la siguiente: 76 % (82/108) de las secuencias exhiben mutaciones que confieren algún tipo de resistencia, 50 % (54/108) mutaciones primarias que confieren resistencia a IP, 65 % (70/108) a INTR y 39 % (42/108) a INNTR. El 69 % (75/108) presentó mutaciones secundarias a IP. Un 33 % (36/108) de las secuencias mostró mutaciones que confieren resistencia a ambos tipos de inhibidores de la TR, mientras que un 18 % (19/108) lo hizo tanto a los dos tipos de inhibidores de la TR como a IP.

Las 108 secuencias obtenidas para los pacientes tratados fueron analizadas con el programa CPR a fin de conocer los porcentajes de prevalencia para cada mutación. Dichos porcentajes son calculados como la proporción entre el número de veces que aparece la mutación y el número de veces que la posición del codón estuvo representada en la población bajo estudio.

Las Tablas VIII y IX muestran, respectivamente, los resultados obtenidos para la prevalencia de mutaciones primarias que confieren resistencia a IP y la prevalencia de mutaciones secundarias asociadas a resistencia a dichos inhibidores. De igual forma, las Tablas X y XI muestran, respectivamente, los resultados correspondientes a la prevalencia de mutaciones que confieren resistencia a INTR e INNTR. Con la finalidad de establecer una comparación, en las tablas se incluye la prevalencia que la base de datos de la Universidad de Stanford indica para cada mutación (Prevalencia de referencia BD Universidad Stanford), obtenida en base a una población de 6.651 pacientes VIH-1+ subtipo B tratados para la región PR y 10.942 pacientes para la región TR. También se incorpora el valor de significancia estadística (p) obtenido en la comparación de ambas prevalencias para cada mutación.

Tabla VIII. Mutaciones que confieren resistencia primaria a inhibidores de la Proteasa (IP) en las secuencias de nucleótidos obtenidas de los pacientes tratados.

| Mutación | Prevalencia en la población estudiada (%) | Prevalencia de referencia BD Universidad Stanford (%) | p           |
|----------|-------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-------------|
| I54V     | 26,2                                      | 19,8                                                  | 0,25        |
| L90M     | 25,2                                      | 34,4                                                  | 0,17        |
| M46I     | 20,6                                      | 20,4                                                  | 0,91        |
| V82A     | 18,7                                      | 23,1                                                  | 0,43        |
| I84V     | 14,0                                      | 12,7                                                  | 0,86        |
| L33F     | 9,4                                       | 4,8                                                   | 0,08        |
| N88D     | 8,4                                       | 7,4                                                   | 0,88        |
| V32I     | 8,4                                       | 4,7                                                   | 0,16        |
| G73S     | 7,5                                       | 9,1                                                   | 0,70        |
| D30N     | 6,5                                       | 11,6                                                  | 0,18        |
| L24I     | 5,6                                       | 5,4                                                   | 0,88        |
| I54L     | 5,6                                       | 1,8                                                   | <b>0,02</b> |
| F53L     | 5,6                                       | 3,9                                                   | 0,33        |
| M46L     | 4,7                                       | 9,7                                                   | 0,14        |
| I47V     | 3,7                                       | 2,1                                                   | 0,30        |
| G73T     | 2,8                                       | 2,1                                                   | 0,50        |
| G73C     | 1,9                                       | 1,1                                                   | 0,34        |
| I47A     | 1,9                                       | 0,3                                                   | 0,05        |
| I50V     | 0,9                                       | 1,0                                                   | 1,00        |
| N88S     | 0,9                                       | 2,0                                                   | 0,73        |
| G48V     | 0,9                                       | 4,3                                                   | 0,14        |
| V82C     | 0,9                                       | 0,2                                                   | 0,20        |
| V82T     | 0,9                                       | 2,9                                                   | 0,38        |

Los valores resaltados indican diferencias estadísticamente significativas en la prevalencia de la mutación ( $p < 0,05$ ) con respecto a la prevalencia indicada en la BDUS.

Tabla IX. Mutaciones asociadas a resistencia secundaria a inhibidores de la Proteasa (IP) en las secuencias de nucleótidos obtenidas de los pacientes tratados.

| Mutación | Prevalencia en la población estudiada (%) | Prevalencia de referencia BD Universidad Stanford (%) | p            |
|----------|-------------------------------------------|-------------------------------------------------------|--------------|
| L10F     | 14,0                                      | 5,4                                                   | <b>0,001</b> |
| L33F     | 9,4                                       | 4,8                                                   | 0,08         |
| K43T     | 7,5                                       | 2,9                                                   | <b>0,02</b>  |
| L33I     | 6,5                                       | 1,9                                                   | <b>0,01</b>  |
| M46L     | 4,7                                       | 9,7                                                   | 0,14         |
| K20T     | 3,7                                       | 2,6                                                   | 0,54         |
| V11I     | 3,7                                       | 0,9                                                   | <b>0,02</b>  |
| K55R     | 3,7                                       | 2,9                                                   | 0,56         |
| A71I     | 2,8                                       | 2,1                                                   | 0,50         |
| C95F     | 2,8                                       | 1,4                                                   | 0,20         |
| T91S     | 1,9                                       | 0,2                                                   | <b>0,02</b>  |
| E34Q     | 1,9                                       | 0,8                                                   | 0,22         |
| N83D     | 0,9                                       | 0,3                                                   | 0,29         |

Los valores resaltados indican diferencias estadísticamente significativas en la prevalencia de la mutación ( $p < 0,05$ ) con respecto a la prevalencia indicada en la BDUS.

Tabla X. Mutaciones que confieren resistencia a inhibidores nucleósidos de la Transcriptasa Reversa (INTR) en las secuencias de nucleótidos obtenidas de los pacientes tratados.

| Mutación | Prevalencia en la población estudiada (%) | Prevalencia de referencia BD Universidad Stanford (%) | p             |
|----------|-------------------------------------------|-------------------------------------------------------|---------------|
| M184V    | 47,1                                      | 52,3                                                  | 0,61          |
| M41L     | 31,8                                      | 34,1                                                  | 0,76          |
| T215Y    | 28,9                                      | 34,2                                                  | 0,45          |
| D67N     | 26,2                                      | 25,2                                                  | 0,98          |
| L210W    | 26,0                                      | 19,6                                                  | 0,23          |
| V118I    | 22,4                                      | 11,8                                                  | <b>0,01</b>   |
| K70R     | 16,8                                      | 22,7                                                  | 0,27          |
| K219E    | 14,4                                      | 2,1                                                   | <b>0,00</b>   |
| T215F    | 13,5                                      | 6,8                                                   | <b>0,02</b>   |
| L74V     | 9,4                                       | 3,1                                                   | <b>0,003</b>  |
| K219Q    | 7,7                                       | 12,8                                                  | 0,17          |
| L74I     | 6,5                                       | 0,8                                                   | <b>0,0001</b> |
| G333E    | 6,5                                       | 9,8                                                   | 0,37          |
| T69D     | 6,5                                       | 5,4                                                   | 0,80          |
| K219R    | 5,8                                       | 1,0                                                   | <b>0,001</b>  |
| E44D     | 5,6                                       | 5,8                                                   | 0,92          |
| A62V     | 5,6                                       | 2,3                                                   | 0,05          |
| T69N     | 5,6                                       | 5,3                                                   | 0,92          |
| Q151M    | 4,7                                       | 2,8                                                   | 0,24          |
| F77L     | 3,7                                       | 2,0                                                   | 0,29          |
| F116Y    | 3,7                                       | 2,1                                                   | 0,30          |
| D67G     | 2,8                                       | 1,0                                                   | 0,10          |
| K219N    | 1,9                                       | 0,9                                                   | 0,26          |
| Y115F    | 1,9                                       | 1,0                                                   | 0,30          |
| T69S     | 1,9                                       | 1,5                                                   | 0,68          |
| E44A     | 1,9                                       | 0,7                                                   | 0,18          |
| K70G     | 1,9                                       | 0,3                                                   | 0,05          |
| T215I    | 1,9                                       | 0,5                                                   | 0,11          |
| T215D    | 1,0                                       | 0,8                                                   | 0,59          |
| M184I    | 1,0                                       | 0,7                                                   | 0,54          |
| K70N     | 0,9                                       | 0,1                                                   | 0,11          |
| V75M     | 0,9                                       | 1,0                                                   | 1,00          |

Los valores resaltados indican diferencias estadísticamente significativas en la prevalencia de la mutación ( $p < 0,05$ ) con respecto a la prevalencia indicada en la BDUS.

Tabla XI. Mutaciones que confieren resistencia a inhibidores no nucleósidos de la Transcriptasa Reversa (INNTR) en las secuencias de nucleótidos obtenidas de los pacientes tratados.

| Mutación | Prevalencia en la población estudiada (%) | Prevalencia de referencia BD Universidad Stanford (%) | p           |
|----------|-------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-------------|
| K103N    | 28,0                                      | 48,8                                                  | <b>0,01</b> |
| G190A    | 10,6                                      | 13,4                                                  | 0,64        |
| L100I    | 5,6                                       | 5,2                                                   | 0,95        |
| K101E    | 4,7                                       | 5,2                                                   | 0,97        |
| A98G     | 4,7                                       | 4,6                                                   | 1,00        |
| K103S    | 3,7                                       | 1,0                                                   | <b>0,03</b> |
| V108I    | 3,7                                       | 6,4                                                   | 0,38        |
| V179D    | 2,9                                       | 2,6                                                   | 0,76        |
| Y181C    | 2,9                                       | 25,2                                                  | <b>0,00</b> |
| P225H    | 2,9                                       | 2,9                                                   | 1,00        |
| G190S    | 1,9                                       | 3,2                                                   | 0,78        |
| Y188L    | 1,9                                       | 4,9                                                   | 0,24        |
| K238T    | 1,9                                       | 2,1                                                   | 1,00        |
| K101P    | 1,9                                       | 1,4                                                   | 0,67        |
| G190C    | 1,0                                       | 0,1                                                   | 0,11        |
| G190Q    | 1,0                                       | 0,4                                                   | 0,36        |
| K101H    | 0,9                                       | 0,8                                                   | 0,59        |

Los valores resaltados indican diferencias estadísticamente significativas en la prevalencia de la mutación ( $p < 0,05$ ) con respecto a la prevalencia indicada en la BDUS.

#### **4.- Subtipificación por análisis filogenéticos**

Los análisis filogenéticos de las secuencias de los pacientes tratados se realizaron como se indicó en el punto 2.12 de Métodos. La totalidad de las secuencias de los pacientes de este estudio se agrupó en el clado correspondiente al subtipo B del grupo M del VIH-1, al igual que las secuencias de referencia del mismo subtipo obtenidas del GenBank. Otras secuencias de referencia, pertenecientes a diferentes subtipos del mismo grupo, se concentraron en sus respectivos clados. Las secuencias externas del grupo O y del grupo N, O-Senegal y N-Camerún, completan la filogenia del VIH-1, con un índice de confiabilidad mayor al 90 % para 1.000 réplicas de “bootstrap”.

Cabe destacar que toda la población en estudio corresponde al subtipo B según el programa CPR de la base de datos de la Universidad de Stanford y los algoritmos empleados por éste para la determinación de resistencia genotípica a DARV, con un promedio de  $93,2 \pm 2,3$  % de similitud para la población de pacientes tratados y un promedio de  $95,6 \pm 1,5$  % para la de pacientes no tratados, con respecto a las secuencias de referencia del subtipo B utilizadas por esta base de datos. Estos resultados indican que las secuencias de los pacientes no tratados presentan una mayor similitud a las secuencias de referencia, probablemente por no estar sometidas a presiones selectivas de un TAR en contraste con los pacientes tratados; sin embargo, en relación al subtipo viral, no existen diferencias estadísticamente significativas entre la población estudiada ( $p=0,934$ ).

A fin de tener una mejor visualización del análisis filogenético, la Figura 12 muestra la reconstrucción del árbol filogenético de 40 secuencias de pacientes tratados y no tratados, tomadas al azar de la población total, y las secuencias de referencia tomadas del GenBank (Tabla III).

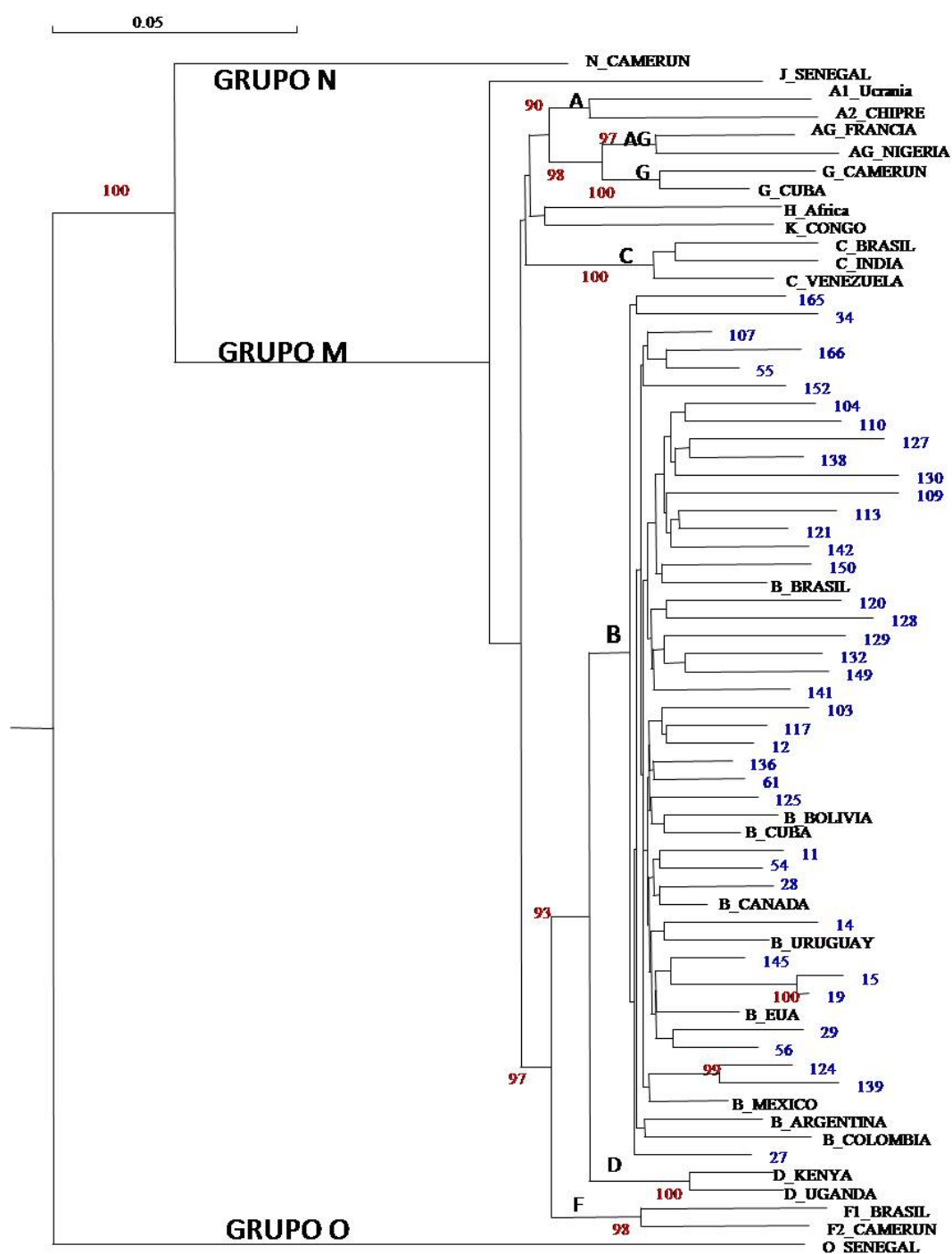


Figura 12. Árbol filogenético de 40 secuencias de la población en estudio.

Modelo K2P, técnica del vecino más cercano, 1.000 réplicas de secuencia de arranque.

Números en **rojo**: % de confiabilidad ("bootstrap"), números en **azul**: secuencias de este trabajo, letras mayúsculas en **negro**: subtipos del grupo M y letras mayúsculas\_páís: secuencias de referencia del GenBank indicadas en la Tabla III.

## **DISCUSIÓN**

Existen diversas causas para la falla terapéutica de un tratamiento antirretroviral, como la falta de su cumplimiento estricto por parte del paciente, la intolerancia a corto plazo de los medicamentos, la toxicidad de las drogas y los niveles insuficientes de estas mismas (Saag, 2001); sin embargo, la presencia de mutaciones que confieren resistencia a las drogas administradas es una de las principales (Haubrich y Demeter, 2001). Las pruebas de susceptibilidad a drogas antirretrovirales (DARV) han constituido en la última década una herramienta indispensable en la práctica clínica para la aplicación y el seguimiento de terapias asertivas en pacientes infectados por VIH-1.

La susceptibilidad a drogas antirretrovirales puede ser analizada tanto fenotípica, como genotípicamente. Las pruebas fenotípicas evalúan *in vitro* la sensibilidad del virus haciéndolo replicar en presencia de agentes antirretrovirales y determinando el grado de inhibición de dicha replicación frente a diversas concentraciones de las drogas utilizadas. Por otro lado, las pruebas genotípicas examinan la secuencia genética viral para identificar y analizar, a través de los algoritmos de una base de datos, las mutaciones relacionadas con la resistencia a DARV (Demeter y Haubrich, 2001; Shafer, 2002).

El VIH conforma cuasiespecies que contienen innumerables variantes relacionadas a la cepa infecciosa original. Si un aislamiento viral contiene la mezcla de variantes virales mutadas y no mutadas (“silvestres”) en una posición asociada a resistencia a drogas, las pruebas fenotípicas podrían no detectar la resistencia si la mutación está presente a bajos niveles, mientras que si las pruebas genotípicas detectan la cuasiespecie, considerarán que la mutación está presente e inferirán la resistencia (Parkin y col., 2003; Zolopa, 2003).

Por otro lado, las mutaciones que causan resistencia a una droga comúnmente sensibilizan al virus contra una segunda droga (resistencia cruzada). Utilizando pruebas

fenotípicas se detectará resistencia a la primera droga, pero la detección de resistencia a una segunda o tercera droga requerirá ensayos paralelos, mientras que el análisis genotípico inferirá resistencia a varias drogas simultáneamente. Este tipo de mutaciones confieren resistencia latente que los estudios han señalado como clínicamente relevantes (Parkin y col., 2003; Zolopa, 2003).

Los métodos de determinación genotípica también pueden detectar la presencia de mutaciones que por sí mismas no causan resistencia (mutaciones secundarias) y que pueden compensar los efectos negativos sobre la replicación viral producidos por aquellas mutaciones que si la confieren (mutaciones primarias). Los métodos fenotípicos considerarán los aislamientos que presenten estas mutaciones como completamente sensibles a los agentes antirretrovirales (Parkin y col., 2003; Zolopa, 2003).

El desarrollo de los métodos y técnicas de biología molecular y secuenciación, le da otra ventaja a las pruebas de determinación genotípica de resistencia al hacerlas relativamente más rápidas, simples y económicas que las fenotípicas. Sin embargo, el uso de métodos comerciales para la determinación genotípica añade un costoso elemento al ya oneroso tratamiento contra la infección por el VIH-1 que limita su uso de manera generalizada.

Si bien Venezuela fue el segundo país de América del Sur que brindó en forma gratuita el servicio de análisis de resistencia genotípica a DARV, por tratarse de una prueba comercial muy costosa y de alta tecnología, en el Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel” (INHRR) sólo se realizan 20 pruebas mensuales, bajo estrictas normas de prioridad establecidas por un comité de expertos en la materia (Ministerio de la Salud, 2005). De aquí que el desarrollo de un método alternativo más económico representa un paso importante en los estudios de genotipificación de pacientes venezolanos.

De las 23 drogas aprobadas por la FDA y dirigidas al tratamiento de pacientes VIH-1

positivos, 19 centran su acción terapéutica sobre los genes Proteasa (PR) y Transcriptasa Reversa (TR) (Hoffman y Mulcahy, 2007). En las regiones PR y TR del gen *pol* del VIH se concentra el mayor número de mutaciones que confieren resistencia al tratamiento antirretroviral. Tradicionalmente su amplificación se realiza a través de técnicas PCR o TR-PCR de manera individual, es decir, una PCR para cada región.

Al comparar diferentes estrategias de amplificación, la tradicional (PCR PR y PCR TR) no mostró una buena eficiencia, especialmente en el análisis del plasma, además generó un mayor costo en reactivos y horas hombre y un considerable tiempo de respuesta en la entrega del diagnóstico al paciente, debido a que cada muestra a ser evaluada se traducía en una duplicación de material al requerirse la amplificación, por separado, de dos regiones del gen *pol*.

De las dos estrategias que permiten amplificar una región más extensa del gen utilizando una sola PCR, la MacroPol resultó ser poco eficiente. La extensión de la región que se pretendía abarcar (~2.189 pb) dificulta *per se* la amplificación y reproducibilidad y, por ende, una óptima normalización del método. Éste se hace muy dependiente de la especificidad de los iniciadores y sus temperaturas de hibridización, complicando su selección y el establecimiento de dichas temperaturas, especialmente en genomas de alta variabilidad, como es el caso del VIH-1. También los ciclos de amplificación en la PCR se hacen más largos por la necesidad de incrementar el tiempo de extensión, lo que contribuye con la demora en el resultado final.

Se eligió la PCR MedPol como el método a desarrollar y evaluar para la determinación de resistencia genotípica a DARV por simplificar el método de diagnóstico, mostrar una alta eficiencia y permitir la secuenciación de alrededor de 336 aminoácidos en la región de la TR, en contraste con los 250 aminoácidos que permite la PCR TR. Esto facilita el

análisis de los aminoácidos 318 y 333 que han sido asociados a resistencia a drogas (Harrigan y col., 2002; [www.hivdb.stanford.edu](http://www.hivdb.stanford.edu)), con lo que se incluiría el estudio de nuevas sustituciones en zonas de la TR usualmente no analizadas. Además, con esta PCR se puede analizar simultáneamente el ADN proviral y, mediante un paso previo de transcripción reversa, el ARN viral que se encuentra presente en las muestras estudiadas (TR-PCR).

La selección del mejor compartimiento viral para estudios de genotipificación sigue siendo materia de debate, aunque ambas estrategias (plasma sanguíneo y/o células PBMC) parecen proveer, en la mayoría de los casos, resultados coincidentes (Chew y col., 2005; Devereux y col., 2000). Algunos autores recomiendan la determinación genotípica de resistencia a DARV de manera simultánea en ambos compartimientos, para obtener así una mayor sensibilidad en el diagnóstico (Parisi y col., 2007; Vicenti y col., 2007). En este estudio se observaron diferencias en mutaciones de resistencia a DARV y otros polimorfismos entre los compartimientos virales de 19 de las 20 muestras analizadas. Estas diferencias fueron particularmente evidentes cuando los pacientes seleccionados para la comparación estaban bajo tratamiento (13/20), debido a la presión selectiva que éste ejerce sobre la población viral. No obstante, el relativo bajo costo del método normalizado (menos de una cuarta parte del costo de un método comercial) permitiría el eventual análisis de ambos compartimientos, a fin de obtener un diagnóstico más sensible.

Los métodos comerciales actuales sólo utilizan el compartimiento plasmático (ARN viral) porque se supone que en él prevalece la cuasiespecie dominante y más reciente en la evolución de la infección (Parisi y col., 2007). La PCR MedPol ofrece la posibilidad de realizar la determinación genotípica de resistencia en los dos compartimientos virales, con resultados cuya correlación es alta en ambas regiones del gen (94,8 % para plasma y 95,0 % para células), al ser comparados con secuencias de referencia de la base de datos de la

Universidad de Stanford.

Por otro lado, la carga viral, uno de los parámetros utilizados para el seguimiento de la infección por VIH, es determinante en la capacidad que tenga una PCR para la amplificación del genoma viral cuando se trabaja con plasma sanguíneo. Por lo general, los pacientes que requieren análisis de resistencia genotípica a DARV acuden a la consulta y toma de muestra con valores de carga viral determinados con anterioridad, lo que no permite conocer el valor preciso de dicha carga al momento de realizar la determinación genotípica de resistencia, valor que puede haber variado debido a características intrínsecas del virus infectante, características fisiológicas del paciente y TAR asignado, entre otras razones.

Los métodos comerciales más ampliamente usados para la determinación de resistencia genotípica son Trugene® y Viroseq®, éstos indican una sensibilidad igual o mayor de 1.000 copias de ARN/mL y de 500 copias de ARN/mL, respectivamente. El límite de detección del método desarrollado y normalizado en este trabajo se estableció como mayor a las 1.000 copias de ARN/mL, valor apoyado por el hecho de que lograron amplificarse cuatro muestras de la población en estudio, cuyas cargas virales coincidían con el día de la toma de muestra y presentaban valores entre 900 y 2.000 copias de ARN/mL.

La PCR MedPol fue comparada con el método comercial Trugene®, por ser el utilizado en el INHRR para la determinación de resistencia genotípica en pacientes venezolanos. Este estuche comercial fue aprobado por la FDA en septiembre de 2001; se basa en la genotipificación de las secuencias de las regiones de la PR, incluyendo desde el codón 1 hasta el 99, y de la TR desde el codón 40 hasta el 247. Utiliza una TR PCR y una tecnología de secuenciación (llamada CLIP®) integrada en el mismo estuche, lo cual permite dar un resultado con la determinación de resistencia a drogas antirretrovirales en un tiempo estimado de 14 a 21 días. La determinación de resistencia genotípica a DARV obtenida con el método

Trugene® se alcanza a través de un algoritmo normalizado (Guidelines ®) que permite la interpretación de los patrones de mutación.

La interpretación final con los detalles para cada mutación que confiere resistencia a 19 DARV aprobadas por la FDA, es indicada por el estuche comercial en forma de tres niveles de resistencia: Sin evidencia de resistencia, posible resistencia y resistencia. Además, señala un valor de evidencia insuficiente cuando no es posible determinar la susceptibilidad de la muestra a las DARV. Así mismo, Trugene® sólo permite analizar el ARN viral presente en las muestras.

Al comparar el método desarrollado en el presente trabajo con el método comercial se observó que el 89 % (25/28) de las secuencias analizadas mostró el 100 % de identidad. Sólo tres de los pares de secuencias divergían en su similitud en apenas el 1 %. En términos de determinación de resistencia a DARV, la PCR MedPol exhibió una correlación satisfactoria con Trugene® (94% para IP, 100% para INTR, 94% para INNTR) en la detección de mutaciones que confieren resistencia. Sin embargo, en cuatro casos, el método comercial fue capaz de detectar mutaciones que el método normalizado no pudo detectar, generándose patrones de resistencia diferentes para una misma muestra. La razón puede estar en que el análisis de las muestras a través de la PCR MedPol se hizo tiempo después del correspondiente al método comercial, lo que implicó dos pasos de descongelación, como mínimo, para las muestras utilizadas en la comparación de los métodos, pudiendo afectar la integridad del material genético (ARN viral) a extraer, lo que conllevaría a diferencias en los resultados.

Cabe destacar que el diseño del método normalizado proporciona el análisis de un fragmento mayor de la región TR e hizo posible detectar la mutación G333E (Tabla X), la cual está asociada a una disminución en la susceptibilidad a la Zidovudina o AZT (INTR),

especialmente cuando aparece en conjunto con la mutación M184V, como sucede en este estudio. Esta mutación no puede ser detectada empleando el método comercial debido a que éste sólo analiza desde el codón 40 hasta el 247 de la región de la TR.

La PCR MedPol se utilizó para evaluar la prevalencia de resistencia genotípica a DARV en una población de pacientes venezolanos VIH-1 positivos. Para el grupo correspondiente a pacientes no tratados, la prevalencia de las mutaciones que confieren resistencia primaria es, en todos los casos (Tabla VII), superior a la prevalencia de referencia indicada por la Base de Datos de la Universidad de Stanford (BDUS), aunque desde el punto de vista estadístico sólo existen diferencias significativas para las mutaciones M184V ( $p=0,01$ ) y G190A ( $p=0,01$ ). Esto puede deberse, en primer lugar, al tamaño poblacional comparado (63 vs 7.407 para la región PR y 5.539 para la región TR) y, en segundo término, a la posibilidad de que los pacientes no tratados incluidos en este estudio no hayan sido diagnosticados temprano, en el transcurso de la infección. La alta variabilidad genética del virus puede generar mutaciones aún en ausencia de una presión selectiva debida al TAR.

Es de hacer notar que las mutaciones primarias que confieren resistencia detectadas en los pacientes no tratados en este estudio, se encuentran en la lista SDRM (“Surveillance Drug Resistance Mutations”) de la BDUS por considerarse indicadores de resistencia transmitida en este tipo de pacientes. Las mutaciones incluidas en dicha lista fueron seleccionadas bajo los siguientes criterios: a) Son reconocidas como causantes o contribuyentes de la resistencia a DARV, b) no son polimórficas en paciente no tratados y c) aparecen en todos los subtipos de VIH-1 ([www.hibdb.stanford.edu](http://www.hibdb.stanford.edu)).

En publicaciones previas para poblaciones venezolanas de pacientes no tratados, Delgado y col. (2001) indican una prevalencia de 3 % de mutaciones que confieren resistencia primaria a DARV ( $n=31$ ). Por su parte, Bouchard y col. (2007) señalan una prevalencia del 10

% para este tipo de mutaciones (n=20). Este estudio reveló una prevalencia del 11 % (Tabla VI), similar a la obtenida por el grupo de Bouchard y más de 3 veces superior a la indicada por Delgado y colaboradores en el 2001. El incremento, en el período 2001-2007, de la prevalencia de resistencia primaria a DARV en los pacientes no tratados puede sugerir, como también lo afirman Bouchard y colaboradores, la transmisión de cepas resistentes en la epidemia local. La ligera diferencia detectada en el período 2007-2008 apoyaría lo dicho anteriormente, resaltando la necesidad de realizar pruebas de resistencia genotípica en pacientes no tratados que permitan la detección y el seguimiento de la transmisión de cepas que confieren resistencia primaria dentro de la población venezolana.

El 11 % (7/63) de prevalencia de mutaciones que confieren resistencia primaria a DARV encontrado en este estudio, es mayor que el 4,2 % señalado para Argentina (Dilernia y col., 2007) y el 2,5 % indicado para Chile (Ríos y col., 2007). En el primero de los casos la población estudiada fue de 284 pacientes no tratados, mientras que en el caso de Chile la muestra analizada fue de 70, similar a la del presente trabajo. Sin embargo, ese porcentaje de prevalencia de mutaciones que confieren resistencia primaria, es muy similar al 12 % obtenido por Ross y col. (2007) en su estudio sobre una población estadounidense de 317 pacientes no tratados.

La mutación M184V presentó la mayor prevalencia entre los pacientes no tratados (3,2%, p=0,01). Esta mutación está relacionada con altos niveles de resistencia a INTR como la Lamivudina (3TC) y la Emtricitabina (FTC). Por sí sola no parece estar asociada a la disminución en la susceptibilidad a Abacavir (ABC), pero acompañada de las mutaciones K70R y K219E contribuye a reducir esa susceptibilidad (Johnson y col., 2008).

La evaluación de la resistencia genotípica a DARV de los pacientes no tratados, sugiere realizar futuros estudios en grupos más numerosos, a fin de establecer el costo-

beneficio de implantar un programa de vigilancia y determinación de resistencia genotípica en este tipo de pacientes, que permita la detección temprana de mutaciones que confieren resistencia primaria y establecer esquemas terapéuticos asertivos en las etapas iniciales de la infección.

Con respecto al grupo correspondiente a pacientes tratados, la prevalencia de mutaciones que confieren resistencia primaria a DARV, muestra un considerable incremento en relación a los valores obtenidos en estudios previos sobre poblaciones venezolanas. Delgado y colaboradores (2001) indicaron un 26 % de prevalencia de resistencia a los inhibidores de la TR y un 9 % de prevalencia de resistencia primaria a IP; por su parte, Dieudonne y col. (2006) señalaron un 35 % de prevalencia de resistencia a INTR, un 12 % a INNTR y ninguna prevalencia de resistencia primaria a IP. Los datos publicados por Delgado y col. están basados en una población de 69 pacientes tratados y no discriminan la prevalencia por tipo de inhibidores a la TR; mientras que Dieudonne y col. indican sus valores de prevalencia en una población de 17 pacientes. En contraste, este estudio muestra prevalencias de 65 % de resistencia a INTR, 39 % a INNTR y 50 % de resistencia primaria a IP, en una población de 108 pacientes.

El incremento en la prevalencia de mutaciones que confieren resistencia primaria obtenido en el presente trabajo puede estar asociado al significativamente mayor número de pacientes analizados, lo que sugiere la importancia de continuar este tipo de estudios con mayores tamaños poblacionales, a fin de lograr una mejor representación de la prevalencia de resistencia primaria en la epidemia local.

Los valores de prevalencia de mutaciones que confieren resistencia primaria a DARV encontrados en los pacientes tratados de este estudio, fueron semejantes a los descritos recientemente en Chile (Ríos y col., 2007) para IP e INTR (46 y 61 %, respectivamente); sin

embargo, la resistencia a INNTR fue significativamente mayor en ese país (84 %). Similares porcentajes de prevalencia de resistencia a IP e INTR (41 y 71 %, respectivamente) fueron señalados en un amplio estudio (n=1.797) realizado en EUA (Richman y col., 2004), mientras que la prevalencia de resistencia a INNTR detectada fue menor (25 %). No obstante, el valor de prevalencia de resistencia primaria, sin discriminar el tipo de inhibidores, no presenta diferencias significativas en los tres estudios: 77 % en Chile (Ríos y col., 2007), 76 % en EUA (Richman y col., 2004) y 76 % en Venezuela (este estudio).

Al comparar la prevalencia individual de mutaciones que confieren resistencia en las secuencias analizadas con la prevalencia de referencia de la BDUS, se observa para los inhibidores de la PR (Tabla VIII) valores relativamente mayores en las mutaciones asociadas a los codones 47 y 54 de esta región (I47A, I47V, I54L e I54V). Estas mutaciones están asociadas a una disminución en la susceptibilidad a varios IP; en particular, la I54V disminuye la susceptibilidad a Atazanavir (ATV) y, en estudios recientes se ha evidenciado que la presencia de I47A e I47V, acompañadas de la V32I, causan altos niveles de resistencia a Lopinavir (LPV), especialmente en pacientes para quienes esta droga fue el primer IP administrado en el tratamiento (Johnson y col., 2008).

Las mutaciones asociadas a resistencia secundaria a IP más que mutaciones debidas a la presencia de una presión selectiva producto del TAR, son polimorfismos que parecen generarse como parte de una estrategia evolutiva del virus frente a dicha presión, para así aumentar su capacidad replicativa (Shafer, 2002). La prevalencia de este tipo de mutaciones en la población de pacientes tratados de este estudio se ubicó en un 69 %. A su vez, la prevalencia individual de esas mutaciones fue, en líneas generales, mayor o igual a la prevalencia indicada por la BDUS (Tabla IX).

La significativamente ( $p=0,001$ ) alta prevalencia de la mutación L10F puede atribuirse

a que está asociada con niveles de resistencia a la mayoría de los inhibidores de la PR, inclusive está presente en 5-10 % de pacientes no tratados ([www.hibdb.stanford.edu](http://www.hibdb.stanford.edu)). Esta mutación en conjunto con la L33F, la K43T y la M46L, incrementan los niveles de resistencia primaria a IP conferidos por mutaciones como la I54V, la L90M y la M46I, entre otras (Johnson y col., 2008).

Según Johnson y colaboradores (2008), las mutaciones L33F y L33I aparecen bajo presión selectiva de cinco de los ocho inhibidores de la PR aprobados por la FDA, y contribuyen al aumento de resistencia contra éstos.

Al comparar la prevalencia individual de mutaciones que confieren resistencia a inhibidores nucleósidos de la TR con la prevalencia de referencia de la BDUS (Tabla X), se observa que más de la mitad de las mutaciones detectadas presenta valores relativamente mayores. Aunque este no es el caso de la mutación M184V, también para los pacientes tratados esta es la mutación de más alta prevalencia para cualquier tipo de inhibidor (47,1%).

La mutación M184V está asociada a altos niveles de resistencia contra la 3TC, uno de los INTR más ampliamente usados en los esquemas de TAR, también se relaciona a altos niveles de resistencia contra FTC y bajos niveles contra Didanosina (ddI) y ABC ([www.hibdb.stanford.edu](http://www.hibdb.stanford.edu)).

La mutación K219E se encontró en una significativa ( $p=0,00$ ) alta prevalencia al compararla con la prevalencia de referencia. Esta mutación está asociada a una pérdida de susceptibilidad a AZT y Stavudina (d4T), en especial si está acompañada de las mutaciones K70R, T215Y y T215F ([www.hibdb.stanford.edu](http://www.hibdb.stanford.edu)), lo que se observó en este trabajo. Otra mutación en la misma posición, la K219R, se presenta en pacientes sometidos a fuertes tratamientos de INTR y origina los mismos patrones de resistencia que la K219E (Johnson y col., 2008). En este trabajo la mutación K219R presentó una prevalencia significativamente

alta ( $p=0,001$ ) en comparación con la prevalencia de referencia.

Resulta interesante que la mutación Y115F (Tabla X,  $p=0,30$ ) encontrada en nuestros pacientes, presenta una prevalencia sin diferencia significativa a la señalada en la BDUS. Esta mutación está asociada con la administración de Tenofovir o TDF ([www.hivdb.stanford.edu](http://www.hivdb.stanford.edu)), una droga no disponible en Venezuela durante la realización de este estudio. Su presencia puede estar relacionada con la introducción al país de virus resistentes originarios de regiones donde el TDF forma parte del TAR. Además, esta mutación puede ocasionar resistencia cruzada a drogas como d4T y ABC, ampliamente empleadas en los esquemas del país (Rangel y col., 2008a).

Al comparar la prevalencia individual de mutaciones que confieren resistencia a INNTR con la prevalencia de referencia de la BDUS (Tabla XI), en general se observa que los valores son menores o iguales. En este tipo de mutaciones, la K103N presentó la mayor prevalencia en las secuencias estudiadas (28%,  $p=0,01$ ), valor muy similar al 27,7% señalado en un estudio hecho en Brasil (Couto-Fernández y col., 2005). Esta similitud puede estar relacionada con la alta persistencia de esta mutación en pacientes tratados.

La mutación K103N es capaz, por sí sola, de conferir resistencia a tres de los cuatro INNTR ya que aparece en el lugar de enlace hidrofóbico de la enzima TR, impidiendo el mecanismo de acción de dichos inhibidores. El desarrollo de resistencia a los INNTR no es sólo alto, sino también rápido debido, probablemente, a su larga vida media en el organismo del paciente (Hoffman y Mulcahy, 2007). Algunos estudios indican el aumento de la prevalencia de la mutación K103N en el tiempo y la asocian a un incremento de la capacidad replicativa del virus (Capetti y col., 2005; de Mendoza y col., 2007), también ha sido relacionada con el creciente aumento de resistencia primaria transmitida, especialmente en pacientes infectados con cepas del subtipo B del VIH-1 (Wensing y col., 2005).

La mutación G190A está asociada con niveles de resistencia a tres de los cuatro INNTR: Altos niveles de resistencia a Nevirapina (NVP), resistencia intermedia a Efavirenz (EFV) y disminuye la respuesta a Etravirina o ETR ([www.hivdb.stanford.edu](http://www.hivdb.stanford.edu)).

Es de hacer notar que, de la población en estudio (171 pacientes), el 62% está infectada con virus que poseen una reducción de su susceptibilidad a los tres tipos clásicos de drogas antirretrovirales (IP, INTR, INNTR), a sólo 5 años de su diagnóstico inicial. Esto puede deberse a diferentes factores: Detección y diagnóstico tardío de la infección, mala prescripción del TAR, falta de disponibilidad de algunas importantes drogas en el país y una falta de cumplimiento estricto del tratamiento por parte del paciente.

Un estudio reciente demostró que en Venezuela el 40% de los paciente VIH + se presentan para el diagnóstico en estados tardíos de la infección (Bonjour y col., 2008). Además, se debe enfatizar que la población de pacientes tratados analizada en este trabajo se encontraba en condiciones clínicas de presunta falla terapéutica y, si se extrapola la información confiable obtenida sobre el cumplimiento del tratamiento, alrededor del 20% de esta población deja de consumir más de 3 dosis de sus respectivos TAR.

Los datos obtenidos en este estudio subrayan la importancia del uso racional de las drogas antirretrovirales y la necesidad de una adecuada información e instrucción al paciente, para que se apegue de forma estricta al tratamiento antirretroviral que se le prescribe.

Por último, los análisis filogenéticos realizados a las secuencias obtenidas utilizando la PCR MedPol, confirman la prevalencia del subtipo B del grupo M del VIH-1 en la población venezolana, tal como fue indicado inicialmente por Quiñones-Mateu y col. en 1995 y, posteriormente, por Delgado y col. en 2001, Dieudonne y col, en 2006 y Bouchard y col, en 2007. No hubo evidencia de recombinación de subtipos en la población en estudio.

El 100% de prevalencia del subtipo B en este estudio difiere de lo señalado con

respecto a la prevalencia de este subtipo en otros países americanos, como Brasil donde se indica un 91,2% (Couto-Fernández y col., 2005), Argentina con un 45,1% (Dilernia y col., 2007), Chile con 85% (Ríos y col., 2007) y EUA con un 97% de prevalencia del subtipo B (Ross y col., 2007). Estos datos sugieren la presencia de una epidemia local estable, con muy pocas evidencias de introducción de otros subtipos o formas recombinantes (CRF) del grupo M (Castro y col., 2005; Delgado y col., 2001), o de otros tipos virales como el VIH-2 (Torres y col., 2007).

La relativa estabilidad de la epidemia local puede deberse a que la principal vía de transmisión del VIH-1 sigue siendo la de hombres que tienen sexo con otros hombres (HSH), a diferencia de los países del Cono Sur (Argentina, Chile, Uruguay, Paraguay) donde, la transmisión entre usuarios de drogas endovenosas en estas últimas décadas, ha constituido un factor de riesgo altamente significativo de adquisición del VIH y de la difusión de cepas recombinantes, como la BF (Rangel y col., 2008b).

La ausencia del uso de drogas endovenosas en nuestro país, como importante factor de riesgo de transmisión y dispersión de otros subtipos y formas recombinantes del VIH-1, refuerza la necesidad de realizar, a corto y mediano plazo, estudios más amplios de subtipificación viral y prevalencia de resistencia genotípica a drogas antirretrovirales que redundarán en un mejor conocimiento de las características específicas de la infección por VIH en nuestro entorno.

## **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

-El método desarrollado, normalizado y evaluado en este estudio (PCR MedPol) es una técnica de determinación genotípica que puede detectar la presencia de mutaciones que causan tanto resistencia primaria, como resistencia secundaria a las principales drogas antirretrovirales suministradas en el país.

-La PCR MedPol es relativamente rápida, sencilla y representa una alternativa más económica que los métodos comerciales tradicionalmente utilizados como pruebas de determinación genotípica.

-El método desarrollado simplifica el diagnóstico a través de una sola PCR, muestra una alta eficiencia de amplificación en plasma (88%) y su diseño permite la secuenciación de más codones (342) en la región de la TR, ampliando el estudio de nuevas sustituciones en zonas de esta región usualmente no analizadas.

-La PCR MedPol permite analizar simultáneamente el ADN proviral y, mediante un paso previo de transcripción reversa, el ARN viral para un mismo paciente, facilitando así la obtención de un diagnóstico más sensible, con una similitud de secuencias del 97 al 100% entre los compartimientos.

-El método PCR MedPol exhibió una satisfactoria correlación con el método comercial en la detección de mutaciones que confieren resistencia, siendo de 100% para los INTR y de un 94% para los IP e INNTR, con similar límite de detección ( $> 1.000$  copias ARN/mL) y tiempo de respuesta del diagnóstico.

-La prevalencia de mutaciones (11%, 7/63) que confieren resistencia primaria a drogas antirretrovirales de los paciente no tratados sugiere la transmisión de cepas resistentes en la epidemia local.

-La prevalencia de mutaciones (76%, 82/108) que confieren resistencia primaria en pacientes tratados no mostró diferencias significativas con respecto a estudios realizados en otros países de la región (Chile: 77%, EUA: 76%).

-Los datos obtenidos en este estudio enfatizan la importancia del uso racional de las drogas antirretrovirales y la necesidad de una adecuada información e instrucción al paciente, para que se apegue de forma estricta al tratamiento antirretroviral que se le prescribe.

-Los resultados de subtipificación confirman que el subtipo del VIH-1 circulante en aislados de poblaciones venezolanas es el B (100%, 171/171), sugiriendo la presencia de una epidemia local estable.

-Se debería aprovechar la relativa estabilidad de la epidemia local para realizar, a corto y mediano plazo, estudios más amplios sobre la prevalencia de resistencia genotípica a drogas antirretrovirales que redundarán en un mejor conocimiento de las características específicas de la infección por VIH en nuestro entorno.

-Se sugiere realizar futuros estudios en grupos más numerosos de pacientes no tratados, a fin de establecer el costo-beneficio de implantar un programa de vigilancia y determinación de resistencia genotípica en este tipo de pacientes, que permita la detección temprana de mutaciones que confieren resistencia primaria y establecer esquemas terapéuticos asertivos en las etapas iniciales de la infección.

-Se recomienda continuar los estudios de determinación de resistencia genotípica con mayores tamaños poblacionales, a fin de lograr una mejor representación de la prevalencia de resistencia primaria en la epidemia local.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- \*Agrawal, L., Lu, X., Jin, Q. y Alkhatib, G. (2006). Anti-HIV therapy: Current and future directions. *Curr. Pharm. Des.* 12(16): 2031-2055.
- \*Alcorn, T. M. y Faruki, H. (2000). HIV resistance testing: Method, utility and limitations. *Mol Diagn.* 5: 159-168.
- \*Arthur, L.O., Bess, J.W., Sowder, R.C. y col. (1992). Cellular proteins bound to immunodeficiency virus: Implications for pathogenesis and vaccines. *Science.* 258: 1935-1938.
- \*Bahia, F., Pedroso, C., Netto, E. M. y col. (2004). Evaluation of the genotypic pattern of HIV-1 resistance in AIDS patients failing antiretroviral therapy. *Braz. J. Infect. Dis.* 8(4): 281-289.
- \*Bangsberg, D. R., Kroetz, D. L. y Deeks, S. G. (2007). Adherence-resistance relationships to combination HIV antiretroviral therapy. *Current HIV-AIDS Report.* 4: 65-72.
- \*Barbaro, G., Scozzafava, A., Mastrolorenzo, A. y Supuran, C. (2005). Highly active antiretroviral therapy: Current state of the ART, new agents and their pharmacological interactions useful for improving therapeutic outcome. *Curr. Pharm. Des.* 11(14): 1805-1843.
- \*Barré-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F. y col. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). *Science.* 220: 868-871.
- \*Bonjour, M.A., Montagne, M., Zambrano, M. y col. (2008). Determinants of late disease-stage presentation at diagnosis of HIV infection in Venezuela: A case-case comparison. *AIDS Res. Ther.* 5:6.
- \*Bouchard, M., Masquelier, B., Moreno, M. y col. (2007). HIV type 1 drug resistance among Naive patients from Venezuela. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 23(3): 482-485.
- \*Brinkman, K., Smeitink, J. A., Romijn, J. A. y Reiss, P. (1999). Mitochondrial toxicity induced by nucleoside-analogue reverse transcriptase inhibitors is a key factor in the pathogenesis of antiretroviral therapy related lipodystrophy. *Lancet.* 354: 1112-1115.
- \*Briz, V., Poveda, E. y Soriano, V. (2006). HIV entry inhibitors: Mechanisms of action and resistance pathways. *JAC.* 57(4): 619-627.
- \*Brumme, Z.L., Goodrich, J., Mayer, H.B. y col. (2005). Molecular and clinical epidemiology of CXCR4-using HIV-1 in a large population of antiretroviral-naive individuals. *J. Infect. Dis.* 192: 466-474.
- \*Cane, P. A., Green, H., Fearnhill, E. y col. (2007). Identification of accessory mutations

associated with high-level resistance in HIV-1 reverse transcriptase. *AIDS*. 21: 447-455.

\*Capetti, A.F., Gabris, A.I., Drago, L. y Vigevani, G.M. (2005). Can a K103N HIV strain stably overcome the wild type in the absence of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor selective pressure?. *AIDS*. 19:633-634.

\*Castro, E., Echeverría, G. Deibis, L. y col. (2003). Molecular epidemiology of HIV-1 in Venezuela: High prevalence of HIV-1 subtype B and identification of a B/F recombinant infection. *JAIDS*. 32:338-344.

\*Castro, E., Moreno, M., Deibis, L. y col. (2005). Trends of HIV-1 molecular epidemiology in Venezuela: Introduction of subtype C and identification of a novel B/C mosaic genome. *J. Clin. Virol.* 32: 257-258.

\*Chew, C.B., Potter, S.J., Wang, B. y col. (2005). Assessment of drug resistance mutations in plasma and peripheral blood mononuclear cells at different plasma viral loads in patients receiving HAART. *J. Clin. Virol.* 33: 206-216.

\*Clavel, F. y Hance, A. J. (2004). HIV drug resistance. *N. Engl. J. Med.* 350: 1023-1025.

\*Clavel, F., Guetard, D., Brun-Vezinet, F. y col. (1986). Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science*. 233: 343-346.

\*Coffin, J. M. (1992). Genetic diversity and evolution of retroviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 176: 143-164.

\*Coffin, J. M., Hughes, S. H. y Varmus, H. E. (1997). The place of Retroviruses in biology. En: *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA. Disponible en línea en: [www.ncbi.nlm.nih.gov/books/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/)

\*Cohen, O. J. y Fauci, A. S. (2001). Pathogenesis and medical aspects of HIV-1 infection. En: Knipe, D. M. y Howley, P. M. (Ed.). *Fields Virology*. 4<sup>ta</sup> Edición. Vol 2. Lippincott Williams & Wilkins. Capítulo 60. Pp: 2043-2094.

\*Couto-Fernández, J.C., Silva-De-Jesús, C., Veloso, V.G. y col. (2005). Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) genotyping in Rio de Janeiro, Brazil: Assessing subtype and drug-resistance associated mutations in HIV-1 infected individuals failing highly active antiretroviral therapy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 100(1): 73-78.

\*Crumpacker, C. (2001). Antiviral therapy. En: Knipe, D. M. y Howly, P. M. (Ed.). *Fields Virology*. 4<sup>ta</sup> Edición. Vol 1. Lippincott Williams & Wilkins. Cap 15. Pp: 393-434.

\*Cullen, B. R. (1991). Human immunodeficiency virus as a prototypic complex Retrovirus. *J. Virol.* 65 (3): 1053-1056.

- \* Cullen, B. R. (1998). HIV-1 auxiliary proteins: Making connections in a dying cell. *Cell*. 93: 685-692.
- \*De Clercq, E. (1994). HIV resistance to reverse transcriptase inhibitors. *Biochem. Pharmacol.* 47(2): 155-169.
- \*De Clercq, E. (1996). What can be expected from non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) in the treatment of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infections?. *Rev. Med. Virol.* 6: 97-117.
- \*De Clercq, E. (2002). New anti-HIV agents and targets. *Med. Res. Rev.* 22(6): 531-565.
- \*De Clercq, E. (2004a). Antiviral drugs in current clinical use. *J. Clin. Virol.* 30: 115-133.
- \*De Clercq, E. (2004b). HIV-Chemotherapy and prophylaxis: New drugs, leads and approaches. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36: 1800-1822.
- \*Delgado, E., Leon-Ponte, M., Villahermosa, M. L. y col. (2001). Analysis of HIV type 1 protease and reverse transcriptase sequences from Venezuela for drug resistance-associated mutations and subtype classification: A UNAIDS study. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 17(8): 753-758.
- \*De Mendoza, C., Garrido, C., Corral, A. y col. (2007). Changing rates and patterns of drug resistance mutations in antiretroviral-experienced HIV-infected patients. *AIDS Res. Hum. Retro.* 23(7): 879-885.
- \*Demeter, L. y Haubrich, R. (2001). Phenotypic and genotypic resistance assays: Methodology, reliability, and interpretations. *JAIDS*. 26(1): 3-9.
- \*Devereux, H.L., Loveday, C., Youle, M. y col. (2000). Substantial correlations between HIV type 1 drug-associated resistance mutations in plasma and peripheral blood mononuclear cells in treatment-experienced patients. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 16(11): 1025-1030.
- \*Dieudonne, M., Garzaro, D., Torres, J. y col. (2006). High prevalence of secondary resistance mutations in venezuelan HIV-1 isolates. *Invest. Clin.* 47(1): 27-34.
- \*Dilernia, D.A., Lourtau, L., Gómez, A.M. y col. (2007). Drug-resistance surveillance among newly HIV-1 diagnosed individuals in Buenos Aires, Argentina. *AIDS*. 21(10): 1355-1360.
- \*Domaol, R. A. y Remeter, L. M. (2004). Structural and biochemical effects of human immunodeficiency virus mutants resistant to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36(9): 1735-1751.
- \*Dybul, M., Fauci, A. S., Bartlett, J. G. y col. (2002). Guidelines for using antiretroviral agents among HIV-infected adults and adolescents. *Ann. Inter. Med.* 3(137): 381-433.

- \*Emerman, M. y Malim, M. H. (1998). HIV-1 regulatory/accessory genes: Keys to unraveling viral and host cell biology. *Science*. 280: 1880-1884.
- \*Esnouf, R., Ren, J., Ross, C. y col. (1995). Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by non-nucleoside inhibitors. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2: 303-308.
- \*Espona, M., Ferrández, O., Grau, S. y Carmona, A. (2005). Enfuvirtida: Primer fármaco de una nueva familia de antirretrovirales. *Farm. Hosp.* 29(6): 375-383.
- \*Falco, V., Rodríguez, D. Ribera, E. y col. (2002). Severe nucleoside-associated lactic acidosis in human immunodeficiency virus-infected patients: Report of 12 cases and review of the literature. *Clin. Infect. Dis.* 34: 838-846.
- \*Fauci, A. S. (2003). HIV and AIDS: 20 years of science. *Nat. Med.* 9 (7): 839-843.
- \*Fauci, A.S. y Lane, H. (1994). En: *Principios de Medicina Interna*. 13<sup>ava</sup> edición. Interamericana-McGraw Hill. Vol II. Cap 279. Pp: 1802-1860.
- \*FDA. (2006). Drugs Used in the Treatment of HIV Infections. Disponible en línea: [www.fda.gov/oashi/aids/virals.html](http://www.fda.gov/oashi/aids/virals.html).
- \*Ferguson, M. R., Rojo, D. R., von Lindern, J. J. y O'Brien, W. A. (2002). HIV-1 replication cycle. *Clin. Lab. Med.* 22: 611-635.
- \*Fleury, H., Recordon-Pinson, P., Caumont, A. y col. (2003). HIV type 1 diversity in France, 1999-2001: Molecular characterization of non-B HIV type 1 subtypes and potential impact on susceptibility to antiretroviral drugs. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 19(1): 41-47.
- \*Flexner, C. (1998). HIV-Protease inhibitors. *N. Engl. J. Med.* 338(18): 1281-1292.
- \*Flint, S. J., Enquist, L. W., Skalka, A. M. y Skalka, A. M. (2004). Human immunodeficiency virus pathogenesis. En: *Principles of Virology*. 2<sup>da</sup> edición. American Society for Microbiology Press. Cap 17. Pp: 623-653.
- \*Freed, E. O. y Martin, M. A. (2002). En: Fields, B.N. *et al.* (Ed.) *Fields Virology*. Sección 2: Specific Virus Familias. Cap 59: HIV and their replication. 4<sup>ta</sup> edición. Lippincot-Raven. Versión digital.
- \*Furman, P.A., Fyfe, J.A., St Clair, M.H. y col. (1986). Phosphorylation of 3'- azido - 3' - deoxythymidine and selective interaction of the 5'- triphosphate with human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 83(21): 8333-8337.
- \*Gallo, R. C., Salahuddin, S. Z., Popovic, M. y col. (1984). Frequent detection and isolation of cytopathic Retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science*. 224: 500-503.

- \*Gao, F., Morrison, S., Robertson, D. y col. (1996). Molecular cloning and analysis of functional envelope genes from human immunodeficiency virus type 1 sequence subtype A through G. *J. Virol.* 70: 1651-1667.
- \*Gayle, H. y Hill, G. (2001). Global impact of Human Immunodeficiency Virus and AIDS. *Clin. Microbiol. Rev.* 14(2): 327-335.
- \*Goff, S.P. (2001). Retroviridae: The Retroviruses and their replication. En: Knipe, D.M. y Howley, P.M. (Ed.). *Fields Virology*. 4<sup>ta</sup> edición. Vol 2. Lippincot Williams & Wilkins. Cap 57. Pp: 1871-1939.
- \*Gojobori, T., Moriyama, E. y Kimura, M. (1990). Molecular clock of viral evolution, and the neutral theory. *PNAS.* 87: 10015-10018.
- \*Goldsby, R. A., Kindt, T. J., Osborne, B. A. y Kubi, J. (2000). AIDS and Other immunodeficiencies. En: *Immunology*. 4<sup>ta</sup> edición. W. H. Freeman and Co. Cap 19. Pp 467-494.
- \*Greenberg, M. L. y Cammack, N. (2004). Resistance to enfuvirtide, the first HIV fusion inhibitor. *J. Antimicrob. Chemother.* 54: 333-340.
- \*Grinzstejn, B., Nguyen, B.Y., Katlama, C. y col. (2006). Potent antiretroviral effect of MK-0518, a novel HIV-1 integrase inhibitor, in patients with triple-class resistant virus. Abstract 159 LB, 13<sup>th</sup> CROI 2006, Denver, EUA. Disponible en [www.aegis.com/conferences/croi/2006/159LB.html](http://www.aegis.com/conferences/croi/2006/159LB.html).
- \*Gu, Z., Quan, Y., Li, Z., Arts, E. J. y Wainberg, M. A. (1995). Effects of non-nucleoside inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 in cell-free recombinant reverse transcriptase assays. *J. Biol. Chem.* 270(52): 31046-31051.
- \*Guatelli, J. C. (2002). Human Immunodeficiency Virus. En: Richman, D., Whitley, R. y Hayden, F. (Ed.). *Clinical Virology*. 2<sup>da</sup> edición. American Society for Microbiology Press. Cap 32. Pp: 685-729.
- \*Gulick, R. N. (2003). New antiretroviral drugs. *Clin. Microbiol. Infect.* 9: 186-193.
- \*Hammond, J., Larder, B. A., Schinazi, R. F. y Mellors, J. W. (1997). Mutations in retroviral genes associated with drug resistance. En: *Human Retroviruses and AIDS: A Compilation and Analysis of Nucleic and Aminoacid Sequences*. Korber, Foley, Hahn et al. (Ed.). Theoretical Biology and Biophysics Group. Los Alamos National Laboratory. Pp: 36-79.
- \*Hanna, G. J. y Caliendo, A. M. (2001). Testing for HIV-1 drug resistance. *Mol. Diagn.* 6: 253-263.

- \*Harrigan, P.R., Salim, M., Stammers, D.K. y col. (2002). A mutation in the 3' region of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase (Y318F) associated with non nucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance. *J. Virol.* 76(13): 6836-6840.
- \*Haubrich, R. y Demeter, L. (2001). Clinical utility of resistance testing: Retrospective and prospective data supporting use and current recomendations. *JAIDS.* 26(1): 51-59.
- \*Heeney, J.L., Dalglish, A.G. y Weiss, R.A. (2006). Origins of HIV and the evolution of resistance to AIDS. *Science.* 313: 462-466.
- \*Henry, D. H., Volberding, P.A., Leitz, G. (2004). Epoetin Alfa for treatment of anemia in HIV-infected patients: Past, Present and Future. *JAIDS.* 37: 1221-1227.
- \*Ho, D. D., Schooley, R. T., Rota, T. R. y col. (1984). HTLV-III in the semen and blood of a healthy homosexual man. *Science.* 226(4673): 451-453.
- \*Hoffman, C. y Mulcahy, F. (2006). ART 2006. En: Hoffman, C., Rockstroh, J. K. y Kamps, B. S. (Ed.). *HIV Medicine 2006.* 14<sup>ava</sup> edición. Flying Publisher. Cap 5. Pp: 89-161. Disponible en línea en: [www.hivmedicine.com](http://www.hivmedicine.com).
- \*Hoffman, C. y Mulcahy, F. (2007). ART 2007. En: Hoffman, C., Rockstroh, J. K. y Kamps, B. S. (Ed.). *HIV Medicine 2007.* 15<sup>ava</sup> edición. Flying Publisher. Cap 5.3. Pp: 147-149. Disponible en línea en: [www.hivmedicine.com](http://www.hivmedicine.com).
- \*Hong, L. (2000). Crystal structure of an *in vivo* HIV-1 protease mutant in complex with saquinavir: Insights into the mechanism of drug resistance. *Potein Science.* 9: 1898-1904.
- \*Imamichi, T. (2004). Action of anti-HIV drugs and resistance: Reverse transcriptase inhibitors and protease inhibitors. *Curr. Pharm. Des.* 10: 4039-4053.
- \*Jensen, M.A. y Van't Wout, A.B. (2003). Predicting HIV-1 coreceptor usage with sequence analysis. *AIDS Rev.* 5: 104-112.
- \*Johnson, V. A., Brum-vecinét, F., Bonaventura, C. y col. (2006). Update of the drug resistance mutations in HIV-1: Fall 2006. *Top. HIV. Med.* 14(3): 125-130.
- \*Johnson, V. A., Brum-vecinét, F., Bonaventura, C. y col. (2008). Update of the drug resistance mutations in HIV-1: Spring 2008. *Top. HIV. Med.* 16(1): 62-68.
- \*Jonckheere, H., Anne, J. y De Clercq, E. (2000). The HIV-1 reverse transcription (RT) process as target for RT inhibitors. *Med. Res. Rev.* 20(2): 129-154.
- \*Joshi, S. y Joshi, R. L. (1996). Molecular biology of human immunodeficiency virus type 1. *Tranfus. Sci.* 17(3): 351-378.
- \*Kagan, R. M., Cheung, P. K., Huard, T. K. y Lewinski, M. A. (2006). Increasing prevalence

of HVI-1 protease inhibitor-associated mutations correlates with long-term non-suppressive protease inhibitor treatment. *Antiviral Res.* 71: 42-52.

\*Kak, V., McArthur, R. D., y Krane, L. R. (2000). Treatment of HIV in the new millenium. *Semin. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 12(2): 140-144.

\*Kamps, B. S. y Hoffmann, Ch. (2007). Introduction. En: *HIV Medicine 2007*. Hoffmann, Rockstroh y Kamps (Ed.). Pp: 23. Disponible en línea en: [www.hivmedicine.com](http://www.hivmedicine.com).

\*Kanki, P. J., Hamel, D. J., Sankale, J. L. y col. (1999). Human immunodeficiency virus type 1 subtypes differ in disease progression. *J. Infect. Dis.* 179: 68-73.

\*Katz, R. A. y Skalka, A. M. (1990). Generation of diversity in Retroviruses. *Annu. Rev. Genet.* 24: 409-445.

\*Katzenstein, T. L. (2003). Molecular biological assessment methods and understanding the course of the HIV infection. *Apmis. Suppl.* 114: 1-37.

\*Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16(2): 111-120.

\*Lazzarin, A. (2005). Enfuvirtide: The first HIV fusion inhibitor. *Expert. Opin. Pharmacother.* 6(3): 453-464.

\*Letvin, N. L. y Walker, B. D. (2003). Immunopathogenesis and immunotherapy in AIDS virus infections. *Nat. Med.* 9(7): 861-866.

\*Levy, J.A., Hoffman, A.D., Kramer, S.M. y col. (1984). Isolation of lymphocytopathic Retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science.* 225(4664): 840-842.

\*Margot, N. A., Isaacson, E., McGowan, I. y col. (2002). Genotypic and phenotypic analyses of HIV-1 in antiretroviral-experienced patients treated with Tenofovir DF. *AIDS.* 16(9): 1227-1235.

\*McColl, D. J., Margot, N. A., Wulfsohn, M. y col. (2004). Patterns of resistance emerging in HIV-1 from antiretroviral-experienced patients undergoing intensification therapy with Tenofovir Disoproxil Fumarate. *JAIDS.* 37(3): 1340-1350.

\*McCutchan, F. E. (2006). Global epidemiology of HIV. *J. Med. Virol.* 78(1): S7-S12.

\*Merluzzi, V. J., Hargrave, K. D., Labadia, M. y col. (1990). Inhibition of HIV-1 replication by a nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor. *Science.* 250(4986): 1411-1413.

\*Ministerio de Salud. República Bolivariana de Venezuela. Programa Nacional de SIDA e ITS. Declaración de compromiso en la lucha contra el VIH/SIDA. UNGAS. 2001.

\*Moatti, J P., Spire, B. y Kazatchkine, M. (2004). Drug resistance and adherence to HIV/

AIDS antiretroviral treatment: Against a double standard between the north and south. *AIDS*. 18(3): 55-61.

\*Morozov, V. A., Morozov, A. V., Schürmann, D. y col. (2007). Transmembrane protein polymorfism and resistance to T-20 (Enfuvirtide, Fuzeon®) in HIV-1 infected therapy-naive seroconverters and AIDS patients under HAART-T-20 therapy. *Virus Genes*. 35(2): 167-174.

\*Moyle, G.J., Wildfire, A., Mandalia, S. y col. (2005). Epidemiology and predictive factors for chemokine receptor use in HIV-1 infection. *J. Infect. Dis*. 191: 866-872.

\*Nadler, J. (2003). New anti-HIV protease inhibitors provide more treatment options. *AIDS Patient Care STDs*. 17(11): 551-564.

\*Nielsen, M. H. (2005). Molecular estrategies to inhibit HIV-1 replication. *Retrovirology*. 2:10.

\*Nisole, S. y Saib, A. (2004). Early steps of Retrovirus replicative cycle. *Retrovirology*. 1(1): 9.

\*Pantaleo, G., Graciosi, C. y Fauci, A. S. (1993). New concepts in the immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *N. Engl. J. Med*. 328(5): 327-335.

\*Paolucci, S., Baldanti, F., Campanini, G. y col. (2001). Analysis of HIV drug-resistant quasiespecies in plasma, peripheral blood mononuclear cells and viral isolates from treatment-naive and HAART patients. *J. Med. Virol*. 65: 207-217.

\*Parisi, S.G., Boldrin, C., Cruciani, M. y col. (2007). Both human immunodeficiency virus cellular DNA sequencing and plasma RNA sequencing are useful for detection of drug resistance mutations in blood samples from antiretriviral-drug-naive patients. *J. Clin. Microbiol*. 45(6): 1783-1788.

\*Parkin, N.T., Chappey, C. y Petropoulos, C.J. (2003). Improving lopinavir genotype algorithm through phenotype correlations: Novel mutation patterns and amprenavir cross-resistance. *AIDS*. 17: 955-961.

\*Pereira, C. F. y Paridaen, J. T. (2004). Anti-HIV drug development-an overview. *Curr. Farm. Des*. 10(32): 4005-4037.

\*Pérez, S. L. (2000). Biología molecular del virus de la inmunodeficiencia humana y los recientes progresos en el tratamiento del SIDA. *Rev. Chil. Pediat*. 71(2): 83-88.

\*Persaud, D., Pierson, T., Ruff, C. y col. (2000). A stable latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T lymphocytes in infected children. *J. Clin. Invest*. 105(7): 905-1003.

\*Piacenti, F. J. (2006). An update and review of antiretroviral therapy. *Pharmacotherapy*.

26(8): 1111-1133.

\*Pichova, I., Weber, J., Litera, J. y col. (1997). Peptide inhibitors of HIV-1 and HIV-2 proteases: A comparative study. *Leukemia*. 11(3): 120-122.

\*Pomerantz, R. J. y Hom, D. L. (2003). Twenty years of therapy for HIV-1 infection. *Nat. Med.* 9(7): 867-873.

\*Quan-en, Y. (2004). Erradication of HIV in infected patients: Some potential approaches. *Med. Sci. Monit.* 10(7): 155-165.

\*Quinn, T.C. (1995). The epidemiology of the acquired immunodeficiency syndrome in the 1990s. *Emerg. Med. Clin. North. Am.* 13(1): 1-25.

\*Quiñones-Mateu, M. E., Dopazo, J., Este, J. A. y col. (1995). Molecular characterization of human immunodeficiency virus type 1 isolates from Venezuela. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 11(5): 605-616.

\*Quiñones-Mateu, M. E., Domingo, E. (1999). Nucleotide diversity in three different genomic regions of venezuelan HIV type 1 isolates: A subtyping update. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 15(1): 73-79.

\*Raffanti, S. y Haas, D. W. (2001). Antimicrobial agents. Antiretroviral agents. En: Hardman, J., Linbird, L. y Gilman, G. (Ed.). *Goodman & Gilman's. The farmacological basis of therapeutics*. 10<sup>ma</sup> edición. McGraw-Hill. Cap 51. Pp: 1349-1380.

\*Rangel, H. R., Garzaro, D. J., Torres, J. R. y col. (2008a). Antiretroviral drug resistance prevalence in Venezuela assayed by an in house genotypic test. Enviado a *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*.

\*Rangel, H. R., Garzaro, D. J. y Pujol, F.H. (2008b). Diversidad genética del virus de inmunodeficiencia humana en las Américas, con énfasis en la situación venezolana. Enviado a *Interciencia*

\*Reeves, J. y Doms, R. (2002). Human immunodeficiency virus type 2. *J. Gen. Virol.* 83: 1253-1255.

\*Rhee, S., Kantor, R., Katzenstein, D. A. y col. (2006). HIV-1 *pol* mutation frequency by subtype and treatment experience: Extension of the HIVseq program to seven none-B subtypes. *AIDS*. 20: 643-651.

\*Ribera, E., Moreno, S., Viciano, P. y col. (2007). Recomendaciones españolas sobre el uso adecuado de enfuvirtida. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 25(2): 131-142.

\*Richman, D. D. (2001). HIV chemotherapy. *Nature*. 4(10): 995-1001.

- \*Richman, D. D., Morton, S. C., Wrin, T. y col. (2004). The prevalence of antiretroviral drug resistance in the United States. *AIDS*. 18: 1393-1401.
- \*Ríos, M., Delgado, E., Pérez-Alvarez, L. y col. (2007). Antiretroviral drug resistance and phylogenetic diversity of HIV-1 in Chile. *J. Med. Virol.* 79: 647-656.
- \*Robbins, B. L., Srinivas, R. V., Kim, C. y col. (1998). Anti-human immunodeficiency virus activity and cellular metabolism of a potential prodrug of the acyclic nucleoside phosphonate 9-R- (2-phosphonomethoxypropyl) adenine (PMPA), bis (isopropylloxymethylcarbonyl) PMPA. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 42: 612-617.
- \*Ross, L., Lim, M.L., Liao, Q. y col. (2007). Prevalence of antiretroviral drug resistance and resistance-associated mutations in antiretroviral therapy-naïve HIV-infected individuals from 40 United States cities. *HIV Clin Trials*. 8(1): 1-8.
- \*Saag, M. S. (2001). HIV resistance testing in clinical practice: A QALY-fied success. *Ann. Inter. Med.* 134(6): 475-477.
- \*Sabbatini, S. y Manfredi, R. (2006). A novel antiretroviral class (fusion inhibitors) in the management of HIV infection. Present features and future perspectives of enfuvirtide (T-20). *Curr. Med. Chem.* 13(20): 2369-2384.
- \*Saitou, N. y Masatoshi, N. (1987). The Neighbour-joining Method: A new method for reconstructing phylogenetics trees. *Mol. Biol. Evol.* 4(4): 406-425
- \*Sanger, F. y Coulson, A.R. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.* 94(3): 441-448.
- \*Sepkowitz, K. (2006). One disease, two epidemics-AIDS at 25. *N. Engl. J. Med.* 354(23): 2411-2414.
- \*Shafer, R.W. (2002). Genotypic testing for human immunodeficiency virus type 1 drug resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 15(2): 247-277.
- \*Shafer, R. W., Rhee, S., Pillay, D. y col. (2007). HIV-1 protease and reverse transcriptase mutations for drug resistance surveillance. *AIDS*. 21: 215-223.
- \*Sierra, S., Kupfer, B. y Kaiser, R. (2005). Basics of the virology of HIV-1 and its replication. *J. Clin. Virol.* 34(4): 233-244.
- \*Smerdon, S. J., Jäger, J., Wang, J. y col. (1994). Structure of the binding site for nonnucleoside inhibitors of the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91(9): 3911-3915.
- \* Soares, M. A., Brindeiro, R. M. y Tanuri, A. (2004). Primary HIV-1 drug resistance in

Brazil. *AIDS*. 18(3): 9-13.

\*Soriano, V., de Mendoza, C., Gallego, O. y col. (2001). Utilidad de las pruebas de resistencia a los antirretrovíricos en la práctica clínica. *Rev. Clin. Esp.* 201: 508-512.

\*Spence, R. A., Kati, W. M., Anderson, K. S. y Johnson, K. A. (1995). Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by nonnucleoside inhibitors. *Science*. 267(5200): 988-993.

\*Starcich, B., Ratner, L., Josephs, S. F. y col. (1985). Characterization of long terminal repeat sequences of HTLV-III. *Science*. 227(4686): 538-540.

\*Stevenson, M. (2003). HIV-1 pathogenesis. *Nat. Med.* 9(7): 853-860.

\*Tee, K. K., Kamarulzaman, A. y Ng, K. P. (2006). Prevalence and pattern of drug resistance mutations among antiretroviral-treated HIV-1 patients with suboptimal virological response in Malaysia. *Med. Microbiol. Immunol.* 195: 107-112.

\*Teppler, H., Azrolan, N., Chen, J. y col. (2006). Differential effect of MK-0518 and Efavirenz on serum lipids and lipoproteins in antiretroviral therapy (ART) naive patients. Abstract H-256a. 46<sup>th</sup> ICAAC. 2006, San Francisco, EUA. Disponible en [www.virologycme.com](http://www.virologycme.com).

\*Torres, J. R., Torres-Viera, M. A., Schupbach, J. y col. (2007). Non-immune thrombocytopenia responsive to antiretroviral therapy and HIV-2 infection. *J. Infect.* 54(1): 21-24.

\*Turner, B. G. y Summers, M. F. (1999). Structural virology of HIV. *J. Mol. Biol.* 285: 1-32.

\*UK Collaborative Group on HIV Drug Resistance y UK CHIC Study Group. (2005). Long term probability of detection of HIV-1 drug resistance after starting antiretroviral therapy in routine clinical practice. *AIDS*. 19: 487-494.

\*UNAIDS/WHO. (2006). [www.unaids.org/en/KnowledgeCentre/HIVData/GlobalReport/Default.asp](http://www.unaids.org/en/KnowledgeCentre/HIVData/GlobalReport/Default.asp)

\*UNAIDS/WHO.(2007). [www.unaids.org/en/KnowledgeCentre/HIVData/GlobalReport/Default.asp](http://www.unaids.org/en/KnowledgeCentre/HIVData/GlobalReport/Default.asp)

\*Vicenti, I., Razzolini, F., Saladini, F. y col. (2007). Use of peripheral blood DNA for genotype antiretroviral resistance testing in drug-naïve HIV-infected subjects. *Clin Infect. Dis.* 44: 1657-1661.

\*Wang, W. K., Chen, M. Y., Chuang, C. Y. y col. (2000). Molecular biology of human immunodeficiency virus type 1. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 33: 131-140.

\*Wensing, A. M., van de Vijver, D. A., Angarano, G. y col. (2005). Prevalence of drug-resistant HIV-1 variants in untreated individuals in Europe: Implications for clinical

management. *JID*. 192: 958-966.

\*Wirten, M., Marcelin, A. G., Simon, A. y col. (2005). Resistance mutations before and after Tenofovir regimen failure in HIV-1 infected patients. *J. Med. Virol.* 76(3): 297-301.

\*Yahi, N., Tamalet, C., Tourres, Ch. y col. (1999). Mutation patterns of the reverse transcriptase and protease genes in human immunodeficiency virus type 1-infected patients undergoing combination therapy: Survey of 787 sequences. *J. Clin. Microbiol.* 37(12): 4099-4106.

\*Zdanowicz, M. M. (2006). The pharmacology of HIV drug resistance. *A. J. Pharm. Educ.* 70(5): 1-9.

\*Zhou, Z., Madrid, M., Evanseck, J. D. y Madura, J. D. (2005). Effect of a bound non-nucleoside RT inhibitor on the dynamics of wild-type and mutant HIV-1 reverse transcriptase. *J. Am. Chem. Soc.* 127: 17253-17260.

\*Zolopa, A.R. (2003). Genotype-phenotype discordance: The evolution in our understanding HIV-1 drug resistance. *AIDS*. 17: 1077-1078.