

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL
"PEDRO KOURÍ"
DEPARTAMENTO DE VIROLOGÍA

"RESISTENCIA A LAS DROGAS
ANTIRRETROVIRALES
Y DIVERSIDAD GENÉTICA DEL VIH-1 EN CUBA"

*Tesis presentada en opción al grado científico de
Doctor en Ciencias de la Salud.*

Autor: Lic. Lissette Pérez Santos, MSc

Ciudad de la Habana
2010

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL

"PEDRO KOURÍ"

DEPARTAMENTO DE VIROLOGÍA

**"RESISTENCIA A LAS DROGAS ANTIRRETROVIRALES
Y DIVERSIDAD GENÉTICA DEL VIH-1 EN CUBA"**

*Tesis presentada en opción al grado científico de
Doctor en Ciencias de la Salud.*

Autor: Lic. Lissette Pérez Santos, MsC

Tutor: Lic. Carlos Duarte Cano, DrC.

Asesores: Dra. Lucia Pérez Álvarez, DrC.

Dr. Miguel M. Thomson, DrC.

Ciudad de la Habana

2010

Abreviaturas y glosario de términos

ABC: abacavir

ADN: ácido desoxirribonucleico

ANRS: agencia nacional de investigaciones para el sida

APV: amprenavir

ARN: ácido ribonucleico

ARVs: antirretrovirales

ATV: atazanavir

AZT: zidovudina

CMSP: células mononucleares de la sangre periférica

cpx: complejo, del inglés complex

CRF: forma recombinante circulante, del inglés circulating recombinant forms

DDC: zalcitabina

DDI: didanosina

DLV: delavirdina

dNTP: desoxinucleótido trifosfato natural

D4T: estavudina

EFV: efavirenz

env: gen que codifica para las proteínas de la envoltura del VIH-1

FDA: federación de drogas americanas, del inglés federal drug administration

FRs: formas recombinantes, del inglés recombinant forms

FTC: emtricitabina

g: gravedades

HSH: hombres que tienen sexo con hombres

HT: heterosexual

IDV: indinavir

IC₅₀: concentración inhibitoria del 50%

IF: inhibidores de la fusión

ITIs: inhibidores de la transcriptasa inversa

ITIANs: inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos

ITINANs: inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos

IPRs: inhibidores de la proteasa

kb: kilobases

LPV: lopinavir

min: minutos

mL: mililitros

NFV: nelfinavir

NJ: árboles de unión por vecindad, del inglés neighbor-joining trees

NVP: nevirapina

OR: cociente de probabilidades, del inglés *odds ratio*

pol: gen de la polimerasa del VIH-1

PR: proteasa

RCP: reacción en cadena de la polimerasa

RRE: elemento de respuesta a Rev, del inglés Rev responsive element

RT-RCP: retrotranscripción-reacción en cadena de la polimerasa

RTV: ritonavir

Resistencia a las drogas antirretrovirales y diversidad genética del VIH-1 en Cuba

seg: segundos

sida: síndrome de inmunodeficiencia adquirida

SQV: saquinavir

s/nt: sustituciones por nucleótidos

TA: temperatura ambiente

TAAE: terapia antirretroviral altamente eficaz

TAMs o NAMs: mutaciones asociadas a timidina, del inglés thymidine-associated mutations

TDF: tenofovir

TI: transcriptasa inversa

TLR: Terminaciones largas repetidas

UDI: usuarios de drogas intravenosas

URFs: Forma recombinante única, del inglés unique recombinant forms

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

VIH-1: virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

VIH-2: virus de la inmunodeficiencia humana tipo 2

3TC: lamivudina

μL: microlitros

SÍNTESIS

Se presentan los resultados del análisis de las secuencias de la proteasa y transcriptasa inversa del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 extraído de 425 plasmas de pacientes infectados. Las muestras fueron colectadas entre mayo y septiembre del 2003 de individuos sin tratar y tratados con antirretrovirales. Después de hacer los análisis filogenéticos del segmento del gen de la polimerasa del VIH-1 amplificado, buscamos posible asociación de las formas genéticas del virus más representativas con preferencia sexual y región. Así mismo, determinamos el porcentaje de mutaciones asociadas a resistencias a los inhibidores de la transcriptasa inversa y la proteasa. En el análisis filogenético encontramos los subtipos: B, 41,2%; C, 6,1%; G, 3,8%; y H, 2,1%; y entre las formas recombinantes: CRF19_cpx, 18,4%; recombinantes BG, 11,6%; CRF18_cpx, 7,1%; recombinante B/CRF18, 2,6%; recombinante B/CRF19_cpx, 1,7%; así como un 5,4% de otros subtipos o recombinantes únicos. Los resultados corroboraron la gran diversidad genética del VIH-1 en Cuba y adelantan la posible existencia de tres nuevas formas recombinantes circulantes relacionadas filogenéticamente. El análisis estadístico arrojó una significativa correspondencia entre el subtipo B y los hombres que tienen sexo con otros hombres y entre el subtipo G y los heterosexuales. Entre las formas genéticas principales del VIH-1 aparecieron algunos subgrupos, asociados estadísticamente con las variables de estudio. El porcentaje de mutaciones que confieren resistencia a los inhibidores de la transcriptasa inversa fue de 52,2% en los virus de pacientes tratados con estos inhibidores y del 5,2% en los de los no tratados; mientras que a los inhibidores de la proteasa fue del 30% los virus de pacientes tratados y del 3,2% en los de los no tratados. Se compararon los porcentajes de mutaciones asociadas a resistencia entre las formas genéticas no-B más frecuentes y el subtipo B y no se hallaron diferencias significativas entre ellas.

INDICE

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	2
I.1. ANTECEDENTES	2
I.2. HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	8
I.5. VALOR TEÓRICO – PRÁCTICO	9
I.6. PUBLICACIONES CIENTÍFICAS DONDE HAN SIDO PRESENTADOS LOS RESULTADOS DE LA TESIS.....	10
I.7. EVENTOS CIENTÍFICOS DONDE HAN SIDO EXPUESTOS LOS RESULTADOS DE LA TESIS	10
CAPÍTULO II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	12
II.1. RETROVIRUS.....	12
II.1.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL VIH-1	12
II.2. ESTRUCTURA DEL VIRIÓN Y GENOMA.....	13
II.2.1. Estructura del virión	13
II.2.2. Estructura del genoma.....	14
II.2.3. Ciclo replicativo	15
II.3. VARIABILIDAD GENÉTICA DEL VIH-1	18
II.4. EPIDEMIOLOGÍA.....	21
II.4.1. Distribución geográfica de los subtipos del VIH-1.....	21
II.4.2. Epidemiología en Cuba.....	22
II.5. TERAPIA ANTIRRETROVIRAL	23
II.5.1. Agentes antirretrovirales	24
II.6. RESISTENCIA A LOS FÁRMACOS	29
II.6.1. Bases moleculares de la resistencia.....	31
II.6.2. Resistencia a los inhibidores de transcriptasa inversa análogos de nucleósidos y nucleótido	33
II.6.3. Resistencia a los inhibidores de transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos.....	35
II.6.4. Resistencia a los inhibidores de la proteasa.....	35
II.6.5. Resistencia a los inhibidores de la fusión	36
II.7. ENSAYOS PARA DETERMINAR RESISTENCIA A LOS ANTIRRETROVIRALES	36
II.7.1. Ensayos genotípicos de resistencia al VIH-1.....	37
II.7.2. Ensayos fenotípicos de resistencia al VIH-1.....	39
II.7.3. Algoritmos para la interpretación de los ensayos genotípicos de resistencia al VIH-1.....	41
CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS	44
III.1. MUESTRAS CLÍNICAS.....	44
III.2. EXTRACCIÓN DE ARN.....	45
III.3. TRANSCRIPCIÓN INVERSA Y AMPLIFICACIÓN MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.....	46
III.4. PURIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN	48
III.5. ANÁLISIS FILOGENÉTICO.....	49
III.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	50
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
IV.1. FORMAS GENÉTICAS DEL VIH-1 EN EL GEN DE LA POLIMERASA	51
IV.1.1. Asociación de las formas genéticas de VIH-1 con la región geográfica y la preferencia sexual	63
IV.1.1.1. Asociación de los subgrupos del VIH-1 con las regiones geográficas de Cuba y la preferencia sexual	67
IV.2. MUTACIONES EN EL GEN <i>POL</i> DEL VIH-1 Y RESISTENCIA A LOS ANTIRRETROVIRALES	70
IV.2.1. Pacientes tratados.....	70
IV.2.2. Pacientes no tratados.....	85
IV.3. MUTACIONES EN EL GEN <i>POL</i> DE LAS FORMAS GENÉTICAS DEL VIH-1 MÁS REPRESENTATIVAS Y RESISTENCIA A LOS ANTIRRETROVIRALES	91
IV.3.1. Pacientes tratados.....	91
IV.3.2. Pacientes no tratados.....	96
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES.....	98
CAPÍTULO VI. RECOMENDACIONES	99
CAPÍTULO VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100
ANEXOS.....	119

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

I.1. Antecedentes

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) pertenece a la familia *Retroviridae*, género *Lentivirus*, integrada por virus exógenos no oncogénicos, que causan infecciones persistentes, ya sean activas o crónicas, y enfermedades con períodos de incubación relativamente extensos. Es un virus con envoltura cuyo genoma es de ácido ribonucleico (ARN) de hebra única y sentido positivo, más complejo que el de los retrovirus oncogénicos, pues posee genes adicionales (1).

Los retrovirus presentan una alta variabilidad genética debido a la ausencia de actividad correctora de las polimerasas virales, a sus cortos ciclos replicativos y sus grandes tamaños poblacionales. En consecuencia, en el organismo hospedero estos virus están presentes como mezclas de poblaciones genéticamente diferentes, pero relacionadas entre sí, denominadas *cuasiespecies* (2, 3). Los retrovirus, además son conocidos por su elevado potencial de recombinación, que constituye una parte intrínseca de su ciclo replicativo normal y sirve para mediar la reparación de genomas retrovirales defectivos, para incrementar la diversidad viral, y para acelerar la propagación de mutaciones ventajosas entre las *cuasiespecies* virales (4, 5).

Del VIH se conocen dos tipos, el tipo 1 (VIH-1) y el tipo 2 (VIH-2). Los análisis filogenéticos basados en sus secuencias génicas, principalmente de los genes *gag* y *env*, han revelado cuatro grandes grupos dentro del VIH-1 (6): M (principal, del inglés main), O (externo, del inglés outlier), N (no M, no O, del inglés, non M, non O) y P (7). A su vez del grupo M se han identificado subtipos

que van del A al D, F-H, J y K. En los subtipos A y F se distinguen sub-subtipos designados como A1, A2, A3, A4 y F1, F2 (8). Las secuencias nucleotídicas del VIH-1 identificadas solo tienen un 50% de homología con las del VIH-2. El VIH-2 es menos variable, de este existen 8 grupos denominados con las letras de la A a la H (8, 9).

La alta diversidad genética del VIH-1 proviene no sólo de estas características biológicas virales, anteriormente expuestas, sino también de factores epidemiológicos que podrían determinar la introducción y expansión de una o más variantes en la población y la frecuencia de infecciones dobles o múltiples con generación de formas recombinantes (FRs) (1).

La recombinación entre subtipos y las subsiguientes expansiones de estos virus mosaicos originaron las formas recombinantes circulantes (CRF del inglés, circulating recombinant forms), de las cuales se han descrito 48 (10). La generación de retrovirus recombinantes requiere que dos subtipos o FRs infecten una célula, bien simultáneamente o bien de forma secuencial (11, 12).

Desde el descubrimiento del VIH-1, 33,4 millones de personas viven con el virus en todo el orbe. Según el reporte de ONUSIDA, se contabilizan 2,9 millones de muertes entre la población adulta e infantil y 4,3 millones de nuevas infecciones, al cierre del año 2008 (13).

Hasta 1987 no existía un paliativo y millones de personas morían por el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida), causado por este virus. Entre los años 1987 a 1990 se introdujo la zidovudina (AZT) en el tratamiento de los pacientes, que es un inhibidor (I) de transcriptasa inversa (TI) análogos de nucleósidos (AN). De esta misma familia de antirretrovirales (ARVs) son la zalcitabina (DDC), didanosina (DDI) y estavudina (D4T), que se introdujeron

entre 1991 y 1994 (14). En septiembre de 1995 se hizo evidente que la terapia combinada con dos AN era más efectiva que la monoterapia, lo que dio lugar a la llamada era de las combinaciones. Entre diciembre de 1995 y marzo de 1996 se aprobaron los tres primeros inhibidores (I) de la proteasa (PR): primero el saquinavir (SQV), seguido del ritonavir (RTV) e indinavir (IDV). En junio de 1996, se obtuvo la licencia para la nevirapina (NVP), el primer ITI no análogo de nucleósido (NAN), con lo que se introdujo un medicamento de una tercera clase. Comienza a extenderse la expresión “terapia antirretroviral altamente eficaz” (TAAE), que no es más que la combinación de al menos tres medicamentos, sean o no de la misma familia (15).

En la actualidad se encuentran disponibles cinco clases de agentes ARVs para el tratamiento de la infección por VIH: ITIANs y nucleótido, ITINANs, IPRs e inhibidores de la entrada (inhibidores de la fusión (IF) y de la unión a los co-receptores) e inhibidores de la integrasa (16).

La causa principal del fallo de la TAAE es la selección de variantes resistentes del VIH-1 a los medicamentos empleados en la terapia (17).

Las mutaciones, que son la causa de las resistencias inferidas, pueden clasificarse en dos grandes grupos: primarias y secundarias. En ocasiones, las mutaciones surgidas como respuesta al tratamiento con un fármaco confieren pérdida de la sensibilidad a otros fármacos de la misma familia, lo cual se conoce también como mutaciones causantes de resistencia cruzada (18, 19).

Actualmente se dispone de métodos para determinar los cambios ocurridos en el genoma (pruebas genotípicas) y para medir cambios en la susceptibilidad *in vitro* a un fármaco específico (pruebas fenotípicas) (20). Las resistencias se determinan mediante estudios del genoma del VIH que caracterizan la

secuencia primaria de nucleótidos de la TI y de la PR, con lo que pueden detectarse las mutaciones presentes en ellas (21, 22).

El ensayo genotípico resulta ser sin duda la técnica más ampliamente disponible, requiere menos tiempo para su realización, es menos compleja técnicamente, tiene un menor costo económico y presenta la ventaja adicional de que las mutaciones que se detectan pueden preceder a las resistencias fenotípicas (23, 24).

Como la interpretación de las pruebas genotípicas para la detección de resistencia al VIH-1 es independiente del proceso de genotipaje, resulta una herramienta ideal para llevar los resultados obtenidos de los ensayos a un sistema computarizado, que acepta una secuencia nucleotídica o una lista de mutaciones y sugiere un nivel de resistencia para las diferentes drogas ARVs, ofreciendo además una lista de comentarios relacionados con la mutación (25, 26). En la actualidad existen al menos tres bases de datos para la interpretación de los resultados de las pruebas de resistencia; de ellas la de la Universidad de Stanford es de las más empleadas. Se conocen dos soportes o algoritmos para inferir los resultados de estas bases: los learning machine o los rules bases (27).

La base de datos de VIH de la Universidad de Stanford utiliza los algoritmos basados en reglas (27). El sistema acepta igualmente que los usuarios envíen las secuencias del VIH o una lista de mutaciones e informa los niveles de resistencia inferidos para las 23 drogas aprobadas por la federación de drogas americanas (FDA, del inglés federal drug administration), ITI e IPR. El programa asigna una puntuación individual a cada mutación relacionada con la resistencia a la droga y realiza una sumatoria de las puntuaciones de todas y cada una de las mutaciones relacionadas con cada fármaco, lo que representa

la puntuación total para cada uno de los ARVs. Usando esta puntuación, el programa describe alguno de los siguientes niveles de resistencia a droga inferido: susceptible, resistencia baja probable, resistencia baja, intermedia y alta (28, 29).

En Cuba en el año 2001 se decidió producir siete diferentes drogas (genéricos) para el tratamiento de los pacientes infectados con el VIH-1, entre las cuales se incluyen como ITIAN: lamivudina (3TC), DDC, DDI, D4T, y AZT; entre los ITINAN la NVP y entre los IPRs, el IDV (30). Actualmente el país produce la cantidad de ARVs necesaria para cubrir el tratamiento de todos los pacientes (30).

Las drogas ARVs más frecuentemente empleadas en el tratamiento de los pacientes en Cuba son: 3TC, D4T, AZT, NVP e IDV, y el régimen más esgrimido incluye: 3TC, AZT y NVP. El 3TC es la droga más utilizada en tratamientos combinados (30).

Tras la introducción de la TAAE en el 2001, en Cuba se constató una disminución de la mortalidad por el sida e infecciones oportunistas relacionadas con VIH/sida (30). Al cierre del 2009 habían sido detectados 12 217 personas infectadas con VIH-1 en Cuba. A finales del 2003, momento en el que se toman las muestras de plasmas para el estudio que presentaremos, en Cuba se habían registrado 4 718 individuos infectados, de los cuales 3 627 estaban vivos y 951 (26,2%) seguían un TAAE (Registro Nacional del MINSAP, 2003).

Los primeros estudios sobre los subtipos circulantes en Cuba datan del año 1995, y sugerían que el subtipo B era la forma genética predominante (31), pero en estudios posteriores se describen los subtipo A, C y H (32). Cuevas y cols. encuentran un mosaico de subtipos y virus recombinantes en el año 2001 (33) y

Ruibal y cols estudian la resistencia a los ARVs de esta misma muestra (34). De las 103 muestras estudiadas por ellos, 76 pacientes recibían tratamiento ARV, con una prevalencia de resistencia a los ITIAN del 27,6%, mientras que en los no tratados fue del 7,4%. No se observó resistencia a los IPR, ni multirresistencia a los ARVs. Blanco y col. y Ruibal y col. describen un predominio del subtipo B en la población cubana de hombres que tienen sexo con hombres (HSH), hecho este también reportado en otras epidemias (34, 35). Brasil ha descrito distribuciones desiguales de subtipo dentro del país, mientras que en otras epidemias se han encontrado asociaciones de subtipo con conducta sexual o con conducta de riesgo (36-39).

Los conocimientos actuales de la resistencia a los medicamentos ARVs están fundamentalmente basados en datos obtenidos de virus de subtipo B del VIH-1, que es mayoritario en las epidemias de muchos países desarrollados. En el mundo, sin embargo, la mayoría de las infecciones de VIH-1 provienen de formas genéticas no-B, e incluyen subtipos no-B, las CRFs y las formas recombinantes únicas (URFs, del inglés unique recombinant forms). Debido a un incremento en el acceso a la TAAE en países en vías de desarrollo, donde los subtipos no-B y las FRs son las variantes de VIH-1 predominantes, constituye una necesidad conocer si existen diferencias en los patrones de mutaciones asociados a resistencias a los ARVs (40, 41).

La necesidad de conocer el porcentaje de mutaciones en el VIH-1 que inducen resistencia a los ARVs en una muestra de la población cubana infectada con VIH-1, tras la introducción de la TAAE de producción nacional, su asociación con diferentes variantes virales, así como la relación de estas variantes con la

conducta sexual o la región del país; motivaron la hipótesis y los objetivos que nos trazamos en el presente trabajo.

I.2. Hipótesis de trabajo

Los subtipos y las formas recombinantes del VIH-1 circulantes en una muestra de la población cubana se relacionan tanto con la preferencia sexual como con la región geográfica y desarrollan mutaciones que confieren resistencia frente a la terapia antirretroviral de alta eficacia con independencia de la variante viral.

I.3. Objetivos

General

Identificar los subtipos y formas recombinantes del VIH-1 circulantes en una muestra de la población cubana, su relación con la preferencia y la región geográfica; así como las mutaciones que confieren resistencia frente a la terapia antirretroviral de alta eficacia con independencia de la variante viral.

Específicos

- Identificar los subtipos y formas recombinantes del VIH-1 circulantes en una muestra de la población cubana y su posible asociación con los parámetros epidemiológicos de preferencia sexual y región geográfica.
- Identificar las mutaciones en el VIH-1 que confieren resistencia a los antirretrovirales en pacientes tratados y no tratados.
- Evaluar el porcentaje de mutaciones que confieren resistencia y su asociación con las variantes virales.

I.4. Novedad científica

- Se observa que existe una tendencia al aumento de las formas recombinantes del VIH-1 en el tiempo.
- Describe por primera vez en Cuba la asociación de algunos subtipos y formas recombinantes del VIH-1 con determinada preferencia sexual y región geográfica.
- Sugiere la posible asociación entre la aparición de las formas genéticas recombinantes BG y la disminución del subtipo B en Cuba.
- Propone la posible existencia de tres nuevas formas genéticas recombinantes circulantes en Cuba.
- Es el primer estudio después de la introducción de terapia antirretroviral de producción nacional que permite identificar las mutaciones en el gen *pol* del VIH-1, su correspondencia con el tratamiento empleado y estima los niveles de resistencias existentes a las drogas.
- Evidencia que no existen diferencias en el porcentaje de mutaciones que confieren resistencia entre los virus del subtipo B y las formas genéticas no-B estudiados.

I.5. Valor teórico – práctico

- Se demostró la necesidad del uso de las pruebas genotípicas de resistencia del VIH-1 para el manejo correcto del tratamiento antirretroviral en las personas infectadas. Puso a disposición de los médicos de asistencia elementos científicos que le permitieron decidir mejores opciones terapéuticas, lo que implicó un beneficio para el paciente.

- El conocimiento generado en este estudio será de utilidad para las autoridades de Salud Pública, lo que posibilitará adoptar estrategias futuras en la conducta a seguir en el tratamiento del paciente VIH.
- Los resultados presentados en esta investigación fueron objeto de un Premio de la Academia de Ciencias de Cuba en el año 2007.

I.6. Publicaciones científicas donde han sido presentados los resultados de la tesis

- Pérez L, Thomson MM, Blenda MJ, Aragonés C, González Z, Pérez J, Sierra M, Casado G, Delgado E, Nájera R. HIV type 1 molecular epidemiology in Cuba: high genetic diversity, frequent mosaicism, and recent expansion of BG intersubtype recombinant forms. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2006; 22(8):724-33.
- Pérez L, Pérez-Álvarez L, Carmona R, Aragonés C, Delgado E, González Z, Thomson M, Contreras G, Pérez J, Nájera R. Antiretroviral drug resistance in patients infected with several HIV-1 genetic forms in Cuba. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2007; 23(3):407-414.
- Sierra M, Thomson MM, Posada D, Pérez L, Aragonés C, González Z, Pérez J, Casado G, Nájera R. Identification of three phylogenetically-related HIV-1 BG inter-subtype circulating recombinant forms in Cuba. *J Acquir. Immune. Defic. Syndr*. 2007; 45(2):151-60.

I.7. Eventos científicos donde han sido expuestos los resultados de la tesis

- “3rd IAS Conference on HIV Pathogenesis and Treatment”, Rio de Janeiro, Brasil, 24 a 27 de julio de 2005. “Comparison of genotypic resistance to antiretroviral drugs in patients infected with different HIV-1 genetic forms in Cuba”.

- “3rd IAS Conference on HIV Pathogenesis and Treatment”, Rio de Janeiro, Brasil, 24 a 27 de julio de 2005. “HIV-1 molecular epidemiology in Cuba: high diversity of genetic forms, frequent recombination, and recent expansion of BG inter-subtype recombinant viruses”.
- “12th Conference on Retroviruses and Opportunistic infections”. Boston, Estados Unidos, 22 a 25 de febrero de 2005. “Identification of diverse phylogenetically related HIV-1 BG inter-subtypes in Cuba, including a novel circulating recombinant form (CRF20_BG)”.
- “4th European HIV Drug Resistance Workshop”. Montecarlo, Mónaco, 29 a 31 de marzo de 2006. “Genotypic resistance to antiretroviral drugs in HIV-1 infected patients from Cuba”.
- “XVI International AIDS Conference”. Toronto, Canadá, Agosto de 2006. “Prevalence of drug resistance mutation in treatment-naive and antiretroviral-treated HIV-1 subjects from Cuba”.
- “XVI International AIDS Conference”. Toronto, Canadá, Agosto de 2006. “HIV-1 molecular epidemiology in Cuba: analysis of epidemiological correlations of genetic forms and intraclade subclusters”.
- FINSA’06. Febrero de 2006. “Variabilidad y Resistencia del VIH-1”.

CAPÍTULO II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1. Retrovirus

II.1.1 Características generales del VIH-1

El VIH-1 pertenece a la familia *Retroviridae*, género *Lentivirus*, integrada por virus exógenos no oncogénicos, que causan infecciones persistentes, ya sean activas o crónicas, y enfermedades con períodos de incubación relativamente extensos. Es un virus con envoltura cuyo genoma es de ARN de hebra única y sentido positivo, más complejo que el de los retrovirus oncogénicos, pues posee genes adicionales (1).

Los integrantes de esta familia se agrupaban teniendo en cuenta la morfología del núcleo del virión. Son partículas esféricas y rodeadas por una capa lipídica compuesta por proyecciones de glicoproteínas. Suelen clasificarse de acuerdo con la apariencia de las partículas maduras y sus precursores. Los tipos de partículas son cuatro (A, B, C y D) y el VIH se acerca más a las partículas del tipo C (1, 42).

El VIH-1 se replica por un mecanismo único, la transcripción inversa ocurre a partir del molde de ARN genómico para formar una cadena de ácido desoxirribonucleico (ADN), con la posterior generación de un ADN bicatenario, que se integra luego en el ADN celular del hospedero (1, 43). Exhibe una marcada predilección por el sistema inmune, infectando macrófagos, células dendríticas y linfocitos T CD4+. Tiene la capacidad de producir la formación de sincitios y la muerte de células permisivas y, a diferencia de otros retrovirus puede infectar células que no están en proceso de división (44). Las infecciones causadas por los *Lentivirus* no son restringidas por el sistema inmune y los daños resultantes van acumulándose en el organismo a lo largo de los años (1, 45).

II.2. Estructura del virión y genoma

II.2.1. Estructura del virión

Los viriones maduros tienen un diámetro de 100 nm. Están compuestos por una nucleocápsida de forma cónica, alrededor de la cual se halla una envoltura lipídica derivada de la membrana externa de la célula hospedera. Ambas estructuras están separadas por una región llamada paranucleoide. La nucleocápsida, formada por la proteína p24, contiene dos hebras de ARN estrechamente unidas a las nucleoproteínas p9 y p7 y una copia de cada una de las enzimas TI, PR e integrasa. La proteína miristilada p17 forma una matriz entre la nucleocápsida y la envoltura, importante para el mantenimiento de la arquitectura del virión (46). La capa más externa está compuesta por la envoltura en la que se encuentran insertadas las glicoproteínas virales gp120 y gp41, así como otras proteínas celulares como la β -2 microglobulina y las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase I y II. El lazo V3 de la glicoproteína gp120, considerada una región hipervariable es el principal determinante del tropismo viral, el fenotipo y el uso del co-receptor (Figura 1) (1, 47).

El genoma del VIH tiene una longitud de 9,8 kilobases (kb). En los extremos 5' y 3' del genoma existen secuencias no codificadoras llamadas terminaciones largas repetidas (TLR). En estas terminaciones del extremo 5' se localizan las secuencias promotoras para la transcripción, mientras que en las del extremo 3' se halla la señal necesaria para la poliadenilación (48).

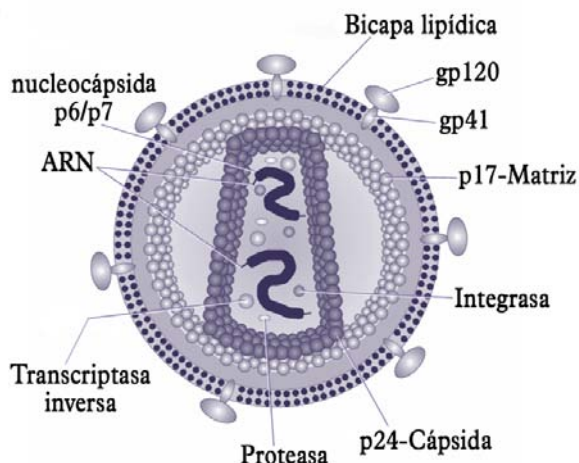


Figura 1 Estructura del VIH-1, que muestra las proteínas codificadas por los genes *gag*, *pol* y *env*.

Fuente: HIV Medicine 2005

II.2 .2. Estructura del genoma

El genoma del VIH posee tres regiones codificadoras, *gag*, *pol* y *env*, donde está codificada la información para las proteínas estructurales de la nucleocápsida (*gag*), las enzimas virales encargadas de la replicación (*pol*) y las glicoproteínas estructurales de la envoltura (*env*). De estas últimas, la gp120 participa en el proceso de adsorción a los receptores específicos en las células hospederas. Las proteínas generadas por el gen *pol* son la TI, la PR y la integrasa (Figura 2) (49).

El genoma del VIH-1 también codifica proteínas no estructurales derivadas de las regiones codificadoras *gag*, *pol* y *env*. La información para la síntesis de estas proteínas está contenida en los genes *vif*, *vpr*, *vpu*, *nef*, *tat* y *rev*. Por su función, las proteínas derivadas de *tat* y *rev* son conocidas bajo el nombre de proteínas reguladoras y las de *vif*, *vpr*, *vpu* y *nef* como proteínas accesorias, aunque estas últimas también son esenciales para completar el ciclo de vida en el hospedero (Tabla 1) (49, 50).

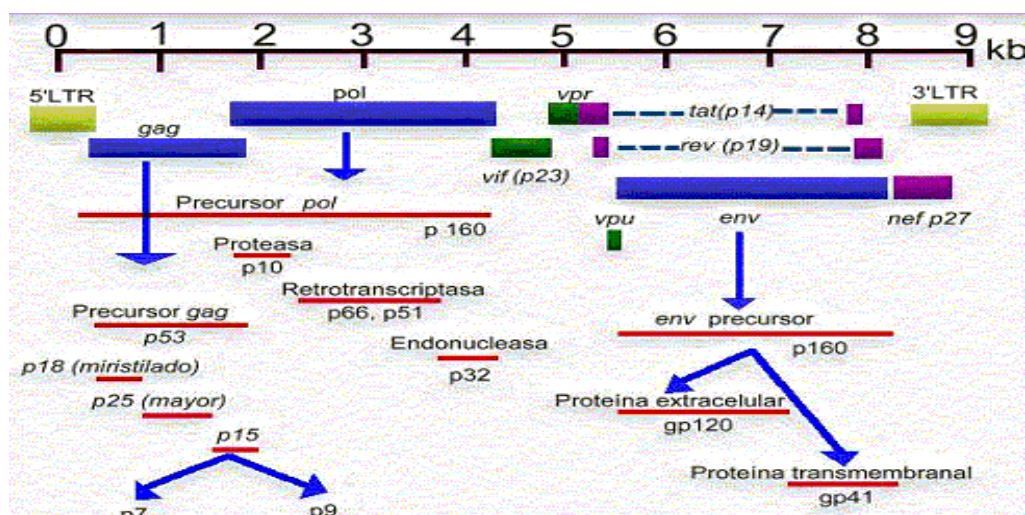


Figura 2 Organización del genoma del VIH-1.

Fuente: ejb.ucv.cl/.../Asparchivos/capitulo011fig.htm

Tabla 1. Genes y proteínas del VIH-1.

Gen	Producto génico	Descripción	Localización
<i>gag</i>	Pr55 ^{Gag} p17 p24 p7 p6	Precursor de proteínas Gag Proteína de matriz Proteína de la cápsida Nucleoproteína	Virión
<i>pol</i>	Pr160 ^{Gag-Pol} p10 p51 y p66 p32	Precursor de proteínas Pol Proteasa Transcriptasa inversa Integrasa	Virión
<i>env</i>	gp160 gp 120 gp41	Precursor de gp de envoltura gp externa de envoltura gp de transmembrana	Virión
<i>tat</i> (transactivador)	Tat	Transactivador de la síntesis de ARNs virales	Nucleolo/Núcleo
<i>rev</i> (regulador)	Rev	Regula la expresión de ARNs virales	Nucleolo/Núcleo
<i>vif</i> (factor de infectividad)	Vif	Incrementa la infectividad viral Inhibición de APOBEC3G	Citoplasma
<i>vpr</i>	Vpr	Asiste en la replicación viral	Virión
<i>nef</i>	Nef	Pleiotrópico	Citoplasma/ Membrana plasmática
<i>vpu</i>	Vpu	Involucrado en la liberación del virus	Membrana plasmática

Fuente: Field, 2007

II.2.3. Ciclo replicativo

El VIH infecta *in vivo* las células que expresan la molécula CD4+: los linfocitos T, las células del linaje de los monocitos, los macrófagos, entre otras. El comienzo del ciclo replicativo vírico está marcado por la interacción de la proteína viral gp120 con la molécula

CD4+ de la célula diana (51). Se ha observado que la presencia de co-receptores o segundos receptores es el factor esencial para el establecimiento, en estas células, de la infección por el VIH. Los prototipos son CXCR4 y CCR5, dos miembros de la familia de receptores de las quimiocinas (52, 53).

Se ha postulado que la penetración del virus en las células CD4+ ocurre mediante la unión de la gp120 al CD4+ y al co-receptor para quimiocina, induciendo un cambio conformacional de la gp120, que a su vez provoca cambios conformacionales en la gp41, lo cual permite la fusión de la envoltura viral con la membrana de la célula hospedera y la subsiguiente entrada de la cápsida al citoplasma celular (54, 55).

Después de la penetración, la cápsida viral pierde su arquitectura y la TI se activa completamente. Existen evidencias de que el proceso de transcripción inversa puede comenzar en el interior del virión. En el citoplasma de la célula infectada se forma un complejo ribonucleoproteico adecuado para la transcripción inversa y para el transporte al núcleo celular del ADN de doble cadena recién sintetizado (56).

Las proteínas virales que participan en el transporte del ADN al núcleo celular son la p17 y la p18 (57). Una vez concluido el transporte hacia este compartimiento, sólo las moléculas de ADN lineal con TLR en cada extremo son integradas como provirus en sitios aleatorios del genoma celular, un proceso mediado por la integrasa viral. Las moléculas de ADN circulares que alcanzan el núcleo pueden, en cambio, expresar proteínas (1).

El provirus integrado se replica únicamente cuando el ADN celular se replica. En muchas células individuales el virus se encuentra en estado de latencia y en otras se expresa de forma continua, razón por la cual la infección por este virus se clasifica como crónicamente activa (58). En las células T en reposo la actividad vírica es mínima. No es hasta que ocurre la activación celular por infecciones a repetición o exposición a antígenos alogénicos cuando el virus se activa del estado quiescente. Otros factores principales de la activación del VIH son la coinfección de las células hospederas con virus no relacionados

con potencial para la activación de la expresión génica viral, la infección por más de una cepa del VIH o por parásitos entéricos, el uso de drogas o diversos factores tóxicos y genéticos (1, 59). El promotor del VIH es altamente regulado por factores virales o celulares (1, 60).

La transcripción del provirus por la ARN polimerasa II celular tiene como resultado un transcrito primario con dos funciones principales, por una parte, actuar como ARN genómico que se incorpora a las cápsidas nuevamente ensambladas y por otra parte, servir de precursor para la formación de los ARNs mensajeros. En la transcripción del VIH, la proteína viral derivada de *tat* es un regulador positivo único, favoreciendo la síntesis de transcritos primarios a partir del promotor del VIH. Subsiguientemente, la maquinaria de procesamiento nucleotídico de la célula hospedera utiliza como sustrato a estos transcritos para generar los ARNs mensajeros (ARNm) completamente procesados que codifican para las proteínas reguladoras (61-64). Otro elemento importante en la transcripción del genoma viral del VIH es la proteína Rev, que actúa sobre el elemento de respuesta a Rev (RRE, del inglés Rev responsive element), localizado también en el ARN. La unión de Rev al RRE estabiliza los ARN largos y los protege del procesamiento múltiple por la maquinaria celular. De esta forma estos ARNm largos son transportados al citoplasma y a partir de ellos se expresan de forma eficiente las proteínas víricas estructurales (61, 64). La actividad cooperada de las proteínas reguladoras Tat y Rev permite el control preciso de la replicación vírica (65).

Las proteínas precursoras de la cápsida (p55) y envoltura (gp160) se acumulan en la cara interna de la membrana y se producen interacciones entre ellas. Algunas proteínas celulares tales como la β_2 -microglobulina y las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad, con sus clases I y II, pueden estar incluidas en el virión (66). Como paso final ocurre el empaquetamiento del ARN viral y el ensamblaje de viriones inmaduros.

El virus abandona la célula por un mecanismo de gemación y la maduración de la partícula viral se efectúa fuera de la célula (1).

II.3. Variabilidad genética del VIH-1

El mundo se halla en constante evolución. Los virus patógenos no son excepciones y algunos de ellos explotan su gran capacidad evolutiva para persistir en los organismos que infectan (67).

Cuando los métodos de genética molecular y de secuenciación rápida alcanzaron operatividad en la década del 70, se empezó a entender cuál era la característica diferencial de los virus ARN. A nivel molecular su tasa de mutación (número de incorporaciones erróneas por nucleótido copiado durante el proceso de replicación) era unas 10^5 veces mayor que la estimada para organismos superiores. Las tasas de mutación de los virus ARN, incluidos los retrovirus, se estimó en 10^{-3} a 10^{-5} sustituciones por nucleótidos (s/nt) por ronda de copia (68-70). La base bioquímica de esta alta tasa de mutación es la ausencia, en la replicasa y la TI de los virus ARN, de la actividad correctora (exonucleasa 3'-5'), asociada a muchas ADN polimerasas celulares. De acuerdo con ello, la TI del VIH-1 *in vitro* muestra también una alta tasa de error, estimada en 10^{-3} a 10^{-4} sustituciones por nucleótido (71).

La variación genética de los virus ARN no sólo puede ocurrir por mutaciones puntuales (transiciones y transversiones) sino también por inserciones y supresiones, por recombinación homóloga (entre secuencias muy parecidas) y no homóloga (entre secuencias distintas) y por reordenamiento de segmentos en virus de genoma segmentado (71).

Los análisis filogenéticos basados en sus secuencias génicas, principalmente de los genes *gag* y *env*, han revelado cuatro grandes grupos dentro del VIH-1 (6): M (principal, del inglés main), O (externo, del inglés outlier), N (no M, no O, del inglés, non M, non O) y P (7). A su vez del grupo M se han identificado subtipos que van del A al D, F-H, J y K. En

los subtipos A y F se distinguen sub-subtipos designados como A1, A2, A3, A4 y F1, F2 (8).

Los virus de un mismo subtipo difieren de un 15 a un 20% en la envoltura, mientras que los de diferentes subtipos difieren entre un 25 y un 35%(65).

Las secuencias nucleotídicas del VIH-1 identificadas solo tienen un 50% de homología con las del VIH-2. En este último se distinguen 8 grupos denominados con las letras de la A a la H (8, 9).

La recombinación constituye una fuente adicional de variación del VIH y desempeña un papel esencial en su evolución y en la expansión geográfica de los subtipos. La generación de retrovirus recombinantes requiere que dos virus infecten una célula, bien simultáneamente, a través de un episodio único de transmisión, bien de forma secuencial, en varios episodios. En el VIH-1, la recombinación se puede producir entre diferentes cepas del mismo subtipo (intra-subtipo), distintos subtipos (inter-subtipo) o diferentes grupos (inter-grupo) (4, 5).

Las FRs del VIH-1 son mucho más prevalentes de lo admitido hasta la fecha, con una distribución geográfica mucho más amplia. Esto se aplica no sólo a las CRFs, FRs idénticas en al menos tres individuos no relacionados desde el punto de vista epidemiológico. También, y de forma más significativa, se puede ver en las URFs, que son las encontradas en un único individuo o en varios, pero que están relacionados epidemiológicamente (72).

La recombinación en los retrovirus requiere de la co-encapsidación en cada virión de los ARNs genómicos genéticamente distintos. La recombinación entre los genomas encapsidados en dos virus diferentes es posible solamente mediante la infección productiva de una única célula por ambos viriones, lo que permite la generación de partículas heterocigóticas. En un ciclo infectivo posterior, puede generarse un genoma

recombinante mediante saltos alternativos de la TI entre ambos genomas co-encapsidados (12).

La nomenclatura actual de CRFs y los criterios para definir las se adoptaron en 1999. Según estos criterios, para definir una CRF, se deben caracterizar tres virus sin relación epidemiológica entre ellos, con idénticos patrones de recombinación y agrupación consistente en árboles filogenéticos. De los tres virus se necesita tener secuenciado, al menos, dos genomas completos (≥8 kb). Las CRFs se designan con números consecutivos a medida que se van describiendo, seguido por los subtipos parentales, o cpx cuando derivan de más de dos subtipos parentales (12). Hasta el momento se han identificado 48 CRFs originadas en todos los continentes (10).

La recombinación *in vitro* puede ligar mutaciones en el VIH-1 y aumentar la resistencia a un determinado antirretroviral (73) o generar virus multirresistentes (74). Este fenómeno puede darse también *in vivo*. La recombinación puede facilitar la adquisición de mutaciones que compensen la pérdida de la capacidad replicativa de estos virus, producida por mutaciones previas que causan resistencia. La alta frecuencia de recombinantes encontrados en las zonas donde circulan múltiples formas genéticas nos advierte sobre el posible efecto negativo del uso incontrolado de las drogas ARVs. Esto podría potenciar la aparición y circulación generalizada de cepas multirresistentes generadas a partir de la recombinación.

Las poblaciones de virus ARN se replican como distribuciones complejas de genomas diferentes pero genéticamente relacionadas y se les denomina *cuasiespecies* (68). Otros autores las describen como distribuciones dinámicas de genomas víricos no idénticos pero genéticamente muy cercanos, sometidos a un continuo proceso de variación, competición y selección (75).

Toda población de virus ARN presenta una secuencia nucleotídica promedio, también llamada secuencia consenso, que tiene en cada posición el nucleótido más frecuente del

conjunto de moléculas de la población. La *cuasiespecie* constituye un reservorio de variantes víricas, que presentan un amplio rango de fenotipos respecto a virulencia, tropismo, cinética de replicación y composición antigénica. El tamaño poblacional es de gran importancia en la heterogeneidad genética. En un individuo infectado por VIH-1 pueden existir de 10^9 a 10^{12} viriones, con un recambio de virus y de células infectadas muy elevado (71).

El parámetro que mide la capacidad que tiene la *cuasiespecie* de llegar a imponerse a otra en un proceso de replicación competitiva es la eficacia biológica (75).

II.4. Epidemiología

Hay en el mundo 33,4 millones de personas infectadas con el VIH (13). En Europa occidental, Estados Unidos y Oceanía la mayoría son drogadictos y hombres que practican sexo con hombres. En Asia, África del norte y zonas del Pacífico las personas más afectadas son las prostitutas y los drogadictos. En África sub-sahariana, América Latina y el Caribe, el grupo de mayor riesgo es el heterosexual (HT) (8).

Los grupos O y N representan menos de un 1% de las infecciones en el mundo y se han detectado casi exclusivamente en África centro-occidental. El grupo O ha sido identificado en personas de Camerún y países vecinos, mientras que el N solo se ha encontrado en Camerún.

II.4.1. Distribución geográfica de los subtipos del VIH-1

La distribución geográfica de subtipos del VIH-1 es un proceso dinámico, dada la gran movilidad de la sociedad humana moderna. Aparecen subtipos en áreas donde no se habían descrito con anterioridad. La generación de FRs contribuye ampliamente a ésta diversidad, la que se vislumbra en aumento con la diseminación de subtipos a nivel global (76, 77).

Las formas genéticas con mayor prevalencia en todo el mundo son los subtipos A, B, C, D, y G y las FRs CRF01_AE y CRF02_AG. El subtipo A se localiza principalmente en el este

de África y Rusia, el subtipo B está expandido globalmente, con predominio en América, Europa occidental y Australia. El subtipo C es el responsable de más del 40% de todas las infecciones a nivel mundial y se concentra en el sur y este de África y en la India. El subtipo D circula en el este de África. El subtipo G tiene su mayor prevalencia en Nigeria. La CRF01_AE predomina en el sudeste de Asia, mientras que la CRF02_AG lo hace en el África occidental (77). La mayor diversidad del VIH-1 se encuentra en África central (72).

II.4.2. Epidemiología en Cuba

Hasta el cierre del 2009 habían sido detectados 12 217 casos de personas seropositivas al VIH-1, de las cuales en 2 921 la infección ha evolucionado a sida. La transmisión sexual es el factor de riesgo más frecuente y a ella corresponde el 99% de los casos descritos. La transmisión vertical, parenteral y la exposición ocupacional, constituyen otras causas de infección, con mucha menor incidencia. El mayor número de casos son del sexo masculino con un 81%, del cual los hombres que tienen sexo con otros hombres constituyen el 89%. Las edades de mayor incidencia corresponden a grupos entre los 24 y 49 años, según datos del Programa Nacional de Prevención y Control de las Infecciones de Transmisión Sexual VIH/sida del Ministerio de Salud Pública de Cuba (Registro Nacional VIH MINSAP, informe de balance 2009).

Los diferentes estudios realizados de la epidemia cubana han identificado los subtipos A, B, C, D, F, G, H, CRF01_AE, CRF02_AG, FRs complejas como la CRF18_cpx y la CRF19_cpx y recombinantes únicos como resultado de la circulación de los diferentes subtipos (32, 33, 78). Algunos de estos subtipos fueron adquiridos en África en la década del 70 y del 80. Se ha encontrado una mayor proporción de subtipo B en HSH, mientras que el resto de los subtipos se han hallado tanto en HTs como en HSH (33).

II.5. Terapia antirretroviral

La infección por VIH ha dejado de ser una enfermedad mortal a corto plazo para convertirse en una enfermedad crónica que puede tratarse y el desarrollo de la terapia antirretroviral ha constituido uno de los avances más significativos en la historia de esta enfermedad. Sin embargo, para la gran mayoría de las personas que viven con VIH/sida, la terapia antirretroviral permanece inaccesible; en especial en los países en vías de desarrollo, en los que el VIH continúa devastando familias y comunidades enteras, especialmente las pobres y marginadas socialmente.

Los inicios de la terapia antirretroviral datan del año 1987, con el empleo de la AZT, un inhibidor de la TI. Entre los años del 1987 al 1990, se utilizó este antiviral en monoterapia (79, 80). Con posterioridad, de 1991 a 1994 se incorporan al tratamiento de los pacientes un gran número de fármacos de esta familia, como la DDC, DDI y D4T (81, 82). Los estudios publicados en 1995 evidenciaron que la terapia combinada con dos análogos de nucleósidos era más efectiva que la monoterapia, dando lugar a lo que se conoció como era de las combinaciones (83, 84).

En 1995 se comenzó a utilizar una nueva clase de medicamento, los IPRs. Los tres primeros fueron, el RTV, SQV e IDV, (85) y a partir de este momento se comienza a hablar de TAAE; que no es más que la combinación de al menos tres fármacos, que pueden pertenecer o no a familias diferentes (86).

En junio de 1996 se obtuvo la aprobación para el empleo de la NVP, primer inhibidor de TI no nucleósido, y se introdujo entonces un medicamento de una tercera clase en el tratamiento de los pacientes (15).

Antes de Mayo del 2001 un número reducido de pacientes infectados con VIH-1 cubanos se trataban con terapia de importación y luego de esta fecha, en el país se decide producir un grupo de estos medicamentos (genéricos). Los pacientes se incorporaron

paulatinamente y en el año 2003 se logra una cobertura total de todos aquellos que necesitasen tratamiento (30).

II.5.1. Agentes antirretrovirales

En la actualidad se encuentran disponibles cinco clases de agentes ARVs para el tratamiento de la infección por VIH-1: ITIANs, ITINANs, IPR, inhibidores de la entrada (IF y de la unión a los co-receptores) e inhibidores de la integrasa. Se han aprobado hasta la fecha 26 fármacos individuales más varias combinaciones de estos. Es previsible que en los próximos años se aprueben nuevos fármacos, entre ellos inhibidores de la unión al receptor CD4+. La investigación también se enfoca en estrategias inmunomoduladoras, con vacunas o citocinas (interferones, interleuquinas) (15).

Los fármacos aprobados hasta la fecha son:

- Inhibidores de la Transcriptasa Inversa Análogos de Nucleósidos y Nucleótidos: AZT, DDI, DDC, D4T, 3TC, Emtricitabina (FTC), Abacavir (ABC) y Tenofovir (TDF).
- Inhibidores de la Transcriptasa Inversa no Análogos de Nucleósidos: Delavirdina (DLV), NVP, Efavirenz (EFV) y Etravirina (ETR).
- Inhibidores de la Proteasa: SQV, IDV, RTV, Nelfinavir (NFV), Amprenavir (APV), Lopinavir (LPV), Atazanavir (ATV), Fosamprenavir (FSV), Tipranavir (TPV) y Darunavir (DRV).
- Inhibidor de Fusión: Enfuvirtide ó T-20.
- Antagonista de los co-receptores: Maraviroc.
- Inhibidor de la Integrasa: Raltegravir.

II.5.1.1. Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos

Mecanismo de acción

La TI es un heterodímero constituido por las proteínas p66 y p51. La segunda es el resultado de la hidrólisis de la molécula p66 en la p51 y p15 (ARNasa H), esta última responsable de degradar el molde de ARN tras ser copiado a ADN durante la transcripción

inversa. La estructura tridimensional de la TI determinada por cristalografía de rayos X semeja a la mano derecha, con diferentes dominios de la proteína denominados “dedos”, “pulgar”, “palma”, “región conectora”, y dominio de la ARNasa H. El ARN viral y la cadena creciente de ADN se sitúan en un hueco conformacional existente entre los dominios “dedo” y “pulgar” (87, 88).

Los ITIAN son compuestos fosforilados por quinasas celulares, después de la endocitosis, para convertirse en derivados de trifosfato (89) y actúan bloqueando la síntesis del ADN durante la retrotranscripción. Su estructura química es similar a la de los desoxinucleótidos trifosfatados naturales (dNTPs) y en general carecen del extremo 2'-OH en el anillo de ribosa, por lo que una vez incorporados en la hebra de ADN recién sintetizada no permiten la posterior elongación de ésta.

La AZT y la D4T son análogos de timidina, mientras que la DDC, FTC y 3TC son análogos de citidina. La DDI es un análogo de inosina, que es convertido en didesoxiadenosina; el ABC es un análogo de guanosina.

En consecuencia, las combinaciones de AZT más D4T, DDC más 3TC, o FTC más 3TC carecen de sentido, puesto que ambos fármacos de cada combinación competirían por las mismas bases.

El TDF actúa como un inhibidor de la TI, de manera similar a los análogos de nucleósidos, tiene como blanco a la enzima TI. No obstante, además de la pentosa y la base, se monofosforila y por lo tanto, se le denomina análogo de nucleótido, se activa intracelularmente mediante dos pasos de fosforilación (90).

II.5.1.2. Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos

Mecanismo de acción

Los ITINANs se describieron por primera vez a finales de la década de los 90. A diferencia de los ITIANs, no inhiben a la TI como un sustrato alternativo, sino que interactúan directamente con una región hidrofóbica de la subunidad p66 del enzima, distinta a la zona

de unión del sustrato (91, 92). El complejo que resulta bloquea el sitio de unión de la TI, la cual entonces se puede unir con menos nucleósidos y la polimerización se hace significativamente más lenta (93-96). Estos compuestos no necesitan de activación dentro de la célula.

Mientras que la utilización de la DLV ha perdido importancia por diversas razones, la NVP y el EFV pueden considerarse que aportan una eficacia similar (97, 98). La etravirina, que es el más reciente de los ITINANs, puede actuar en presencia de mutaciones ya descritas en los virus, que causan resistencia al resto de los compuestos de esta familia (99).

II.5.1.3. Inhibidores de la proteasa

Mecanismo de acción

La PR del VIH-1 es un homodímero constituido por dos subunidades de 99 aminoácidos codificadas en el extremo 5' del gen *pol*. Cada monómero contiene un aspartato en el residuo 25 localizado en el centro activo del enzima, lo que le incluye en la familia de las proteasa aspárticas. Su función es procesar los precursores poliproteicos Gag (p55) y Gag-Pol (p160) resultantes del proceso de transcripción y traslación para producir proteínas estructurales (p17, p24, p2, p7, p1, p6) y funcionales (PR, TI e integrasa) (100). Tres de las dianas de procesamiento de las poli-proteínas del virus están constituidas por los aminoácidos F-P o Y-P, los cuales son dianas inusuales de proteasas de mamíferos. La PR es empaquetada en los virus y su acción enzimática tiene lugar a partir del momento de la liberación de los mismos por las células infectadas. La actividad proteolítica resulta en cambios en la partícula viral, incluyendo la condensación de la nucleoproteína, y por ende la maduración de ellos en términos infectivos (101).

En 1988 se cristalizó la PR del VIH-1 y se determinó su estructura tridimensional, allanándose así el camino para el desarrollo de los inhibidores (102). Estas drogas no afectan directamente a las células que contienen ADN proviral sino que bloquean la infectividad de los nuevos virus generados, previniendo la infección de las nuevas células.

Son moléculas estructuralmente relacionadas que contienen un análogo sintético de la secuencia F-P contenida en la poliproteína Gap-Pol (103).

II.5.1.4. Inhibidores de la entrada

Mecanismo de acción

Hay tres etapas cruciales para la entrada del VIH-1 a los linfocitos T CD4+ (104, 105):

- Unión del virus al receptor CD4+.
- Unión a los co-receptores.
- Fusión del virus a la célula.

Teóricamente, todas las etapas de la entrada del VIH-1 pueden inhibirse. Las tres clases de fármacos, es decir, inhibidores de la unión, antagonistas de co-receptores e IF, se incluyen actualmente en los inhibidores de la entrada. El T-20 fue el primer fármaco de esta clase aprobado en Europa y en EUA en el 2003 (106).

II.5.1.4.1. Inhibidores de la fusión

El primer paso de la entrada del virus a la célula tiene lugar cuando la glicoproteína gp120 de envoltura del VIH-1 se une al receptor de las células CD4+ y a los co-receptores de las quimiocinas CCR5 o CXCR4 de la célula diana. Una vez que la gp120 se une al complejo CD4+/quimiocina, sucede un cambio conformacional en la subunidad transmembranal de la glicoproteína 41 (gp 41) que permite la fusión de la membrana viral con la membrana celular y con ello la entrada del VIH-1 en la célula huésped (107).

El inhibidor de la fusión T-20 (enfuvirtide) es un péptido sintético que inhibe el cambio conformacional de gp41 necesario para la fusión del virus con la célula huésped. La sustitución de un aminoácido en gp41 puede reducir la eficacia del T-20 (108).

El T-20 (Enfuvirtide, Fuzeon) es el prototipo de los IF. Es un péptido relativamente grande, compuesto por 36 aminoácidos, y por consiguiente, debe administrarse mediante una inyección subcutánea. Este fármaco fue aprobado en Europa y EUA en el 2003 para el

tratamiento de la infección por VIH-1 en adultos que hubieran recibido tratamiento previo con ARVs y en niños mayores de 6 años de edad (109).

II.5.1.4.2. Inhibidores de la unión

Este grupo es muy heterogéneo, de manera que no es posible hablar de una sola clase de fármacos (110, 111). El Pro-542 (o CD4-IgG₂ recombinante) es una proteína de fusión, que previene la unión del VIH-1 con linfocitos T CD4+, al unirse con la gp120 (112, 113). El BMS-488,043 es un inhibidor de la unión temprana, el que se une de manera muy específica y reversible con la gp120 del VIH-1 (114). El TNX 355 (previamente Hu5A8) es un anticuerpo monoclonal que se une al receptor CD4+ del linfocito T y así evita la entrada del VIH-1. A diferencia de otros inhibidores, parece prevenir la unión de la gp120 con los co-receptores. Algunos expertos lo describen como un antagonista de co-receptores por esta razón (115, 116).

II.5.1.4.3. Antagonistas de los co-receptores

Además del receptor CD4+, el VIH-1 requiere co-receptores para entrar a la célula diana (117, 118). Las sustancias se clasifican en antagonistas de CCR5 o de CXCR4 en base a su especificidad por el co-receptor (119). Aunque los estudios filogenéticos han demostrado que los virus con tropismo X4, que surgen cuando hay un tratamiento con antagonistas del CCR5, se seleccionan probablemente a partir de reservas preexistentes y no se desarrollan como resultado de un cambio en el uso del receptor; (120, 121) el riesgo asociado con una posible selección de virus X4 aún es incierto.

El vicriviroc es un antagonista del CCR5 (122), al igual que el maraviroc (122-125), aunque este último carece de actividad contra los virus X4. También el aplaviroc (126) funciona como un antagonista del CCR5. El AMD 11070 es un antagonista del co-receptor CXCR4 y no es eficaz contra los virus con tropismo por el R5 (127).

II.5.1.5. Inhibidores de la integrasa

La integrasa es una de las tres enzimas codificadas por el gen *pol* del VIH. Participa en la integración del ADN viral al genoma del huésped (128, 129). Los inhibidores de la integrasa son diferentes de los inhibidores de la entrada, puesto que no previenen la entrada del virus a la célula (130, 131).

II.6. Resistencia a los fármacos

Actualmente existen más de dos docenas de productos disponibles para el tratamiento de la infección por VIH, a pesar de ello hay una creciente necesidad de fármacos nuevos; no sólo para los pacientes con virus multirresistentes que están esperando nuevas opciones de tratamiento. También se prevén problemas relacionados con una toxicidad a largo plazo y con la adherencia a las drogas, ya que las terapias posiblemente necesitarán prolongarse durante décadas enteras, dado que la erradicación del VIH-1 no es posible en la actualidad (15).

La terapia antirretroviral tiene como fin prolongar la vida del paciente y mantener la mejor calidad de salud y de vida posible. El éxito o el fracaso del tratamiento puede evaluarse mediante diferentes criterios: el virológico, el inmunológico o el clínico. De estos, el indicador más utilizado, por ser el primero en reflejar la respuesta al tratamiento, es el éxito o el fracaso virológico (disminución o incremento de la carga viral). A continuación se encuentra el éxito o el fracaso inmunológico del tratamiento (elevación o caída del conteo de células CD4) y, por último, el fracaso clínico del tratamiento, que por lo general se hace evidente mucho después (132-134).

Entre las causas del fracaso terapéutico se encuentran:

- Incumplimiento del tratamiento por parte del paciente (135, 136).
- Insuficiente potencia antirretroviral en la combinación de drogas (86).
- Deficiente absorción del fármaco o de la combinación de fármacos.
- Interacciones farmacocinéticas (137).

- Activación farmacológica inadecuada.
- Replicación viral en compartimentos santuarios para la droga (138).

Una vez excluidas las demás causas de fracaso, se precisan parámetros para reconocer precozmente cuándo empieza a disminuir la eficacia de las drogas en uso, debido a la selección de virus resistentes.

En una enfermedad como el sida, con una fase asintomática prolongada, la posibilidad de monitorizar la progresión de la infección mediante el recuento de linfocitos CD4+, o la de predecir su evolución a merced de la determinación de la carga viral (139); ha permitido establecer recomendaciones terapéuticas y de prevención que han resultado de gran eficacia para frenar la progresión clínica o reducir el riesgo de infecciones oportunistas. Puesto que los ARVs no logran la erradicación del VIH-1 (140) aunque, consiguen controlar su replicación por un lapso variable de tiempo, se precisan nuevos parámetros que permitan conocer precozmente cuándo empieza a fallar la medicación en uso o, mejor aún, que ayuden a seleccionar aquellas combinaciones más eficaces tras el fracaso del tratamiento ARV previo (141).

El desarrollo de mutaciones en los virus que causan resistencia es una de las principales razones del fracaso de la terapia antirretroviral. Cuando hay resistencia a diferentes clases de medicamentos, el número de regímenes alternativos de tratamiento es limitado y es probable que el éxito virológico de las terapias posteriores o de los regímenes de rescate sea efímero.

Las pruebas de detección de resistencia se han utilizado en algunos estudios clínicos y se ha demostrado su correlación con la pérdida de la eficacia antiviral. Hoy día se ha subrayado su valor para pronosticar la respuesta a la medicación antiviral como marcador temprano de fracaso terapéutico (142, 143).

II.6.1. Bases moleculares de la resistencia

El VIH-1, como otros virus ARNs, presenta una gran variabilidad. La carencia de la actividad correctora de errores de la TI de este virus hace que las nuevas moléculas que se formen tengan frecuentes mutaciones con respecto al genoma parental (144, 145). Esto podría suponer un grave inconveniente para la variabilidad del virus pero en realidad pasa a ser un buen mecanismo de adaptación biológica cuando se considera la alta tasa de replicación. Se entiende así que los nuevos virus generados cada día formen partículas virales con alguna ventaja adaptativa respecto a los progenitores. Todas y cada una de las variantes posibles (*cuasiespecies*) existen, incluidas aquellas que causan resistencia a los ARVs, y su proporción respecto al total de la población dependerá del grado relativo de compromiso o de ventaja de adaptación que cada variante tenga en ese ambiente y momento concreto (2, 70, 146). La gran variabilidad del VIH-1 implica la posible existencia de mutaciones en estas variantes que causan resistencia, aún antes de la exposición al fármaco, lo que también se conoce como resistencia natural (147, 148). Las variantes virales con mutaciones que confieren resistencia a un inhibidor, aunque la mutación sea parcial, adquieren una ventaja selectiva por el aumento de su eficacia biológica en presencia del inhibidor, respecto al virus salvaje (147, 149, 150).

La menor susceptibilidad a un fármaco generalmente depende de la presencia de cambios genéticos en el genoma vírico que supone una alteración de la enzima diana del medicamento, ya sea la TI, la PR u otra de las enzimas blanco (21, 151).

Por otra parte, las cepas resistentes pueden transmitirse y por lo tanto detectarse en pacientes recién infectados que no han recibido tratamiento; en estos casos se habla de resistencias transmitidas (152).

Además de los mecanismos de resistencia antes expuestos, existen la llamada: resistencia celular. Ella es desencadenada en la célula hospedera (linfocitos T CD4+ o macrófagos) como respuesta a la exposición a fármacos ARVs. Por ejemplo, se ha detectado que luego

de la administración de AZT se produce un fenómeno de contrarregulación de la timidinaquinasa celular responsable de su activación a la forma trifosfato, lo que provoca que el D4T sea menos efectivo en pacientes pretratados con AZT (153, 154). Igualmente se ha descrito que cuando un paciente recibe un fármaco por un período prolongado de tiempo se inducen moléculas que actúan como transportadores de membrana (p. e. la glicoproteína P), que operan extrayendo los IPRs de la célula (155).

Ante una carga viral detectable debemos recordar que la resistencia a los fármacos ARVs no es la única causa de fracaso al tratamiento. Probablemente la falta de adherencia sea la causa más frecuente del aumento de la carga viral y, en función del grado de incumplimiento, puede ser que incluso el genotipo detectado no presente ninguna mutación de resistencia (156-158).

II.6.1.1. Mutaciones primarias y secundarias

Cuando existen niveles plasmáticos disminuidos de los fármacos ARVs no se consigue evitar el ciclo replicativo celular del VIH-1 y, por tanto, se siguen generando virus que presentan como mínimo un nucleótido distinto cada vez que emergen de la célula infectada. Ante esta circunstancia y dada la gran dinámica de replicación del VIH, se favorece que aparezcan cambios en el genoma del mismo que confieren resistencia tanto genotípica como fenotípica.

Las mutaciones primarias aparecen precozmente cuando se aplica una presión farmacológica insuficiente, y suelen ser específicas para cada fármaco. Este tipo de mutación produce una reducción del efecto antiviral del fármaco utilizado y suele causar una disminución de la capacidad replicativa viral. Las secundarias se acumulan en el genoma del VIH-1 (que ya contiene mutaciones primarias) en un intento por mejorar la capacidad replicativa que ha sido alterada por las primarias. En ocasiones, las mutaciones surgidas como respuesta al tratamiento con un fármaco confieren pérdida de sensibilidad a otros fármacos de la misma familia, lo cual se conoce también como mutaciones

causantes de resistencia cruzada. En algunos casos, la resistencia cruzada se debe a que la mutación primaria es la misma; por ejemplo, la mutación en la posición 82 de la PR condiciona resistencia a IDV y RTV, o la mutación M184V en la TI confiere resistencia de alto grado al 3TC y de bajo grado al DDI, y DDC y ABC (159). Una situación especial es la del D4T, que entre 10 a 15% de las ocasiones se producen en los virus mutaciones clásicamente vinculadas a AZT (por ejemplo, en los codones 215, 41, 70) que causan resistencia a AZT pero que apenas comprometen su eficacia (160).

El acúmulo de mutaciones secundarias produce un gran aumento de las resistencias cruzadas (161).

Aquellas mutaciones que revierten la pérdida de sensibilidad provocada por otra mutación (p. e. pérdida por la adquisición previa de la mutación T215Y), son llamadas mutaciones antagónicas; por ejemplo, la mutación 74V, que induce resistencia al DDI revierte parcialmente la sensibilidad fenotípica a AZT (162, 163).

Las mutaciones que disminuyen simultáneamente la sensibilidad a varios de los fármacos administrados en una combinación, y que son diferentes de las mutaciones específicas para cada uno de ellos, son denominadas mutaciones de resistencia a terapias combinadas. Este es el caso de la mutación G333E en el gen *pol*, que confiere resistencia simultánea al AZT y 3TC (164).

II.6.2. Resistencia a los inhibidores de transcriptasa inversa análogos de nucleósidos y nucleótido

Estos compuestos son pro-medicamentos que sólo son efectivos al convertirse en trifosfatos y así compiten con los dNTPs. La incorporación de un inhibidor fosforilado en el ADN pro-viral bloquea la elongación del ADN pro-viral e interrumpe la síntesis.

Hay dos mecanismos bioquímicos principales implicados en la resistencia a los ITIANs (165). El primero, conocido como “inhibición estérica”, es causado por las mutaciones que modifican la estructura de la enzima. Entonces la incorporación de los ITIANs se bloquea a

favor de los dNTPs. Las mutaciones involucradas con este mecanismo son: M184V, Q151M, L74V, o K65R (166-169). El segundo, denominado “fosforilisis vía trifosfato de adenosina o pirofosfato” causa la eliminación de los ITIANs incorporados en la cadena de ADN. Con este mecanismo están relacionadas las mutaciones: M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y y K219Q (169, 170). La fosforilisis causa resistencia cruzada entre los ITIANs que puede variar entre las sustancias (AZT, D4T > ABC > DDC, DDI > 3TC). Este mecanismo también es conocido como escisión nucleotídica.

Las mutaciones más comunes observadas en virus de pacientes infectados con VIH-1 tratados con regímenes que contienen ITIANs fueron identificadas, en sus inicios, por su papel en la resistencia al AZT. Se ha demostrado que también están asociadas con resistencia fenotípica y clínica a cada uno de los otros ITIANs (164).

II.6.2.1. Resistencia múltiple a inhibidores de transcriptasa inversa análogos de nucleósidos

La resistencia múltiple es frecuente en pacientes con un prolongado uso de los ITIANs. Se han descrito varias rutas para la generación de virus multirresistentes, entre ellas, la conocida como “complejo 151”, que implica la aparición de la mutación Q151M en la secuencia del gen que codifica para la TI seguida de la acumulación secuencial de otras cuatro mutaciones en las posiciones, A62V, V75I, F77L y F116Y; lo que deriva en virus altamente resistentes a los ITIANs. Su prevalencia en la población de pacientes tratados varía entre un 2 y un 6% (171).

La segunda ruta de mutirresistencia es conocida como “inserción 69” e incluye una familia de inserciones de seis nucleótidos extras, los cuales codifican para dos nuevos residuos entre los aminoácidos 67 y 70. Existen diferentes patrones mutacionales (T69SSA, T69SSS) generalmente combinados con otras mutaciones de resistencia al AZT, D4T, DDI, DDC, 3TC o ABC, entre ellos los que se dan en las posiciones 41, 210, 215 y

ocasionalmente 62V, del gen *pol* (172, 173). Su prevalencia en pacientes tratados con estos inhibidores es aproximadamente de un 2% (174-176).

La mutación K65R causa resistencia a cada uno de los ITIANs excepto al AZT. Emerge e incrementa su frecuencia de aparición causando fallo virológico en regímenes que incluyan tres análogos, exceptuando al AZT, y se asocia con otras mutaciones como la M184V y raramente con la Q151M. No se observa en presencia de las mutaciones asociadas a timidina (TAMs o NAMs del inglés thymidine-associated mutations) (174, 177).

II.6.3. Resistencia a los inhibidores de transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos

Este grupo también inhibe la actividad de la enzima viral TI. Los ITINANs son moléculas pequeñas que se unen al sitio hidrofóbico adyacente al dominio catalítico de la TI. Se han sugerido dos mecanismos involucrados con la resistencia a este grupo: el primero relacionado con cambios conformacionales en el sitio de unión de los dNTP y el segundo con cambios en la actividad de la ARNasa H (178, 179).

Las mutaciones en el sitio de unión reducen la afinidad de los ITINANs a la TI y provocan una mala respuesta al tratamiento. El riesgo de resistencia cruzada es muy alto y ésta puede desarrollarse muy rápidamente; una única mutación en la posición 103 (K103N) del gen *pol* es suficiente para impedir la acción de todos los miembros de esta familia de fármacos (180).

II.6.4. Resistencia a los inhibidores de la proteasa

Los IPRs actúan impidiendo el rompimiento del precursor viral Gag (p55) y Gag-Pol (p160) por la PR del VIH-1, por lo que se producen partículas virales inmaduras no infecciosas. La resistencia a los IPR suele desarrollarse lentamente puesto que primero deben acumularse varias mutaciones. El patrón de mutaciones para cada uno de los IP es más complejo que el descrito para los ITI. A pesar de su pequeño tamaño, la PR puede tolerar una gran cantidad de mutaciones. Muchas de éstas mutaciones se localizan en el centro

de unión al sustrato e interfieren directamente con la unión de los IPRs. Otras se sitúan en regiones de la PR diferentes al centro activo y parecen actuar modulando la actividad de las PRs mutantes sin afectar directamente la unión del inhibidor.

La interpretación de las mutaciones en la PR es especialmente compleja por la extensa presencia de polimorfismos (variaciones naturales de la secuencia) en las regiones codificadoras de la PR de aislamientos virales de pacientes que nunca han recibido terapia ARV (181). Hay un alto grado de resistencia cruzada entre los IPRs, descrito incluso antes de que los IPRs estuvieran disponibles en el mercado (182).

II.6.5. Resistencia a los inhibidores de la fusión

Los IF son compuestos diferentes de los ITIANs, ITINANs y de los IPRs, ya que bloquean la entrada del VIH a las células diana. El T-20 o enfurvitide es un péptido lineal que se une a la región HR1 de la gp41, inhibiendo los cambios necesarios para que se produzca la fusión. Se han descrito mutaciones en el gen que codifica para ésta proteína que causan resistencia y afectan la capacidad replicativa viral. El T-20 es un péptido relativamente grande que induce la producción de anticuerpos, aunque esto no parece dañar su eficacia (183).

Los pacientes que tienen una carga viral bien controlada o quienes tienen opciones con una TAAE clásica, no necesitarán el T-20. Este fármaco suele ser útil en terapias de rescate (109, 184).

II.7. Ensayos para determinar resistencia a los antirretrovirales

La literatura describe la existencia de una correlación entre la presencia de mutaciones que confieren resistencia y la pérdida de la eficacia antiviral, lo que permite considerarlas un marcador precoz de fracaso terapéutico aún antes de que ocurra una elevación de la carga viral (185, 186).

A pesar de que cada año se aprueban nuevos fármacos ARVs, cada vez más se desarrollan resistencias directas a los mismos y cruzadas a otros compuestos ARVs, claro

está, las opciones terapéuticas no son ilimitadas. Así pues, entender los mecanismos básicos del desarrollo de resistencias, las pruebas utilizadas para detectar su presencia y los enfoques para su manejo en la clínica resultan cruciales para conseguir una terapia mucho más eficaz (187, 188).

A medida que se utilicen más ampliamente todas las distintas familias de fármacos ARVs en el diseño de la TAAE y los pacientes presenten fracaso virológico a los mismos, existirá un número mayor de portadores de virus resistentes y, por tanto, un número más elevado de posibles transmisores de cepas resistentes.

Actualmente se dispone de métodos para determinar los cambios ocurridos en el genoma (pruebas genotípicas) y para medir cambios en la susceptibilidad *in vitro* a un fármaco específico (pruebas fenotípicas) (20). Las resistencias se determinan mediante estudios del genoma del VIH-1 que caracteriza la secuencia primaria de nucleótidos de la TI y de la PR, con lo que pueden detectarse las mutaciones presentes en ellas (21, 22).

I.7.1. Ensayos genotípicos de resistencia al VIH-1

El ensayo genotípico resulta ser sin duda la técnica más ampliamente disponible, requiere menos tiempo para su realización, es menos compleja técnicamente, tiene un menor costo económico y presenta la ventaja adicional de que las mutaciones que se detectan pueden preceder a las resistencias fenotípicas (23, 189, 190).

Para la realización de los ensayos genotípicos de resistencia al VIH-1 se emplean generalmente las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (RCP); sin embargo para poder detectar el virus mediante esta técnica se requiere que la carga viral presente en el plasma sea superior a 1 000 copias/mililitros. Por otro lado, las especies mayoritarias de virus se detectan con facilidad, aunque las que constituyen menos del 20% del producto amplificado pueden no ser detectadas. Es decir, el hecho de no hallar una mutación determinada no excluye su presencia (16).

Los ensayos genotípicos se caracterizan por su sensibilidad. Con ellos se obtiene una secuencia consenso de la región amplificada del gen del VIH-1 de interés que permite conocer el patrón de todas las mutaciones, relacionadas o no con resistencia (191).

Las mutaciones detectadas en el gen viral y asociadas con menor sensibilidad están bien descritas para la mayoría de los medicamentos, pero la gran diversidad de patrones de resistencia que puede involucrar mutaciones secundarias dificulta la determinación del grado de resistencia a cada medicamento en particular.

II.7.1.1. Ensayos genotípicos de resistencia convencionales

1. Secuenciación del ADN

Secuenciación cíclica mediante dideoxinucleótidos

1.1 Amplificación de una muestra de genomas del VIH y determinación de secuencia promedio. Conlleva una retrotranscripción, RCP y reacción de secuenciación para determinar secuencia consenso promedio (192).

1.2 Determinación de secuencias de genomas individuales de una población. Para ello el material amplificado por RCP se clona (192).

2. Detección de mutaciones puntuales

Amplificación por RCP mediante uso de cebadores específicos o RCP selectiva. Se emplea cuando se conocen los codones que confieren resistencia a un fármaco y se diseñan cebadores que hibridan durante la RCP con el ácido nucleído del virus salvaje o del mutado.

2.1 Afimetrix. Esta técnica utiliza chip de hibridación múltiple que cubre los puntos de mutación conocidos. Consiste en la hibridación de fragmentos pequeños de ARN obtenidos del aislado por RCP y transcripción in vitro. Es un método rápido y que permite procesar gran número de muestras. El método se encuentra limitado por la heterogeneidad genética del virus, la presencia de deleciones o inserciones y

que los oligos incluidos son derivados de la secuencia consenso del subtipo B (192).

2.2 Ensayo LiPA VIH-1 TR y LiPA VIH-1 P. Para la realización de éste ensayo son empleadas sondas específicas que discriminan el virus mutado de los que presentan resistencia primaria. Se amplifica la zona del genoma que cubre las principales regiones de resistencia y posteriormente se hibrida con oligonucleótidos específicos para las distintas mutaciones. Las principales deficiencias son: no detecta la variedad de combinaciones de mutaciones, se puede ver afectado por el polimorfismo y es un método dirigido. Es útil para el estudio de mutaciones conocidas (192).

II.7.1.2. Ensayos genotípicos de resistencia comerciales

Entre los ensayos genotípicos que se comercializan podemos encontrar, TrueGene HIV (Siemens), ViroSeq HIV (Abbott Diagnostic), GENChec (Virco) y GeneSeq. HI (Monogram Biosciences).

El fenotipo virtual (del inglés, Virtual/Phenotype) es uno de los ensayos comerciales con características especiales, ya que permite hacer una aproximación del fenotipo a partir del genotipo (193). En este caso un patrón de mutación se interpreta con ayuda de una gran base de datos de asociación del genotipo con el fenotipo de las muestras. Los genotipos que correspondan al virus del paciente se identifican mediante búsqueda en la base de datos. Se obtiene el promedio de las IC₅₀ de los virus correspondientes para obtener el fenotipo más probable del virus del paciente (106).

II.7.2. Ensayos fenotípicos de resistencia al VIH-1

Las pruebas de resistencia fenotípicas implican la cuantificación directa de la sensibilidad al medicamento. La replicación viral se mide en cultivos celulares a concentraciones ascendentes del medicamento antirretroviral y se compara con la replicación viral del virus salvaje (106).

Las concentraciones del medicamento se expresan como valores de la concentración inhibitoria del 50% (IC_{50}). La IC_{50} es la concentración del fármaco requerida para inhibir al 50% la replicación viral. La sensibilidad del virus se expresa como la IC_{50} comparada con el valor del punto de corte. Actualmente se utilizan tres diferentes puntos de corte: el punto de corte técnico (una medición de la variabilidad metodológica del ensayo, aproximadamente 2.5 veces mayor que la IC_{50}); el punto de corte biológico (involucra la variabilidad entre los virus aislados de pacientes con VIH-1 sin tratamiento previo con ARVs, es ligeramente mayor que el punto de corte técnico y no permite predecir la respuesta clínica a un medicamento) y por último, el punto de corte clínico, que indica hasta qué valor de IC_{50} puede esperarse éxito virológico. Las desventajas de la prueba fenotípica incluyen el prolongado tiempo del proceso y el alto costo del ensayo (106).

II.7.2.1. Ensayos fenotípicos de resistencia convencionales

1. Método de sensibilidad del virus en células mononucleares de la sangre periférica (CMSP). Los linfocitos de sangre periférica del paciente son cultivados con células de donante sano y seronegativo. La sensibilidad se determina añadiendo una concentración estándar del virus (obtenido a partir de sangre del paciente) a células de donante seronegativo en presencia de concentraciones crecientes del fármaco. La presencia del virus se mide por cuantificación del Ag p24. Al final se calcula la IC_{50} . Entre estos ensayos encontramos: Hela-CD4, detección de efecto citopático en líneas T y ensayos en CMSP (192).
2. Técnica de virus recombinantes. Generación de un virus recombinante. Los virus recombinantes incluyen una región de un gen o el gen completo y un clon que carece del gen que se ha amplificado. El análisis de la sensibilidad se realiza mediante ensayos de reducción de placas o de detección de muerte celular. Las células que sobreviven a la infección convierten un reactivo empleado en el ensayo en un producto de color azul. La cantidad de ese producto estará correlacionado

con el número de células que quedan protegidas de la infección. El reactivo se mide por espectrofotómetro. Entre estas técnicas podemos citar: la inducción de mutaciones en clones infecciosos y el ensayo de recombinación por clonaje de RT (192).

II.7.2.2. Ensayos fenotípicos de resistencia comerciales

Entre los ensayos fenotípicos que se comercializan están el Antivirogram® (Virco); el PhenoSense (Monogram Biosciences), y el PhenoScript (Viralliance).

Las pruebas genotípicas y fenotípicas ofrecen resultados confiables intra-ensayo e inter-ensayo. No obstante, la interpretación de los perfiles de resistencia genotípica se ha vuelto muy compleja y requiere de la actualización constante de las normas (106).

Aunque la falla del tratamiento requiere de la consideración de otros factores causales, las pruebas de resistencia son de gran importancia en el manejo y seguimiento de la terapia antirretroviral (106).

Finalmente, es necesario enfatizar que aún con el beneficio de las pruebas de resistencia interpretadas correctamente, sólo los médicos con experiencia en el tratamiento del HIV deberían iniciar, interrumpir o cambiar la terapia antirretroviral y hacerlo, teniendo en cuenta, la situación clínica y el contexto psicosocial del paciente (106).

El costo de los ensayos genotípicos es de 350 a 500 euros según el ensayo y el laboratorio utilizado. Los fenotípicos cuestan aproximadamente el doble (106).

II.7.3. Algoritmos para la interpretación de los ensayos genotípicos de resistencia al VIH-1

La interpretación de los ensayos de resistencia genotípica al VIH-1 es complicada por muchas razones. Primero, existen muchas mutaciones relacionadas con la resistencia a drogas que emergen con patrones complejos. Segundo, la resistencia a las drogas suele ser un fenómeno de todo o nada. Tercero, los resultados de los ensayos de resistencia

deben corresponderse con los principios de la terapia antirretroviral, como se describe en las guías de tratamiento publicadas en la actualidad (16, 28, 194).

Como la interpretación de las pruebas genotípicas para la detección de resistencia al VIH-1 es independiente del proceso de genotipaje, resulta una herramienta ideal para llevar los resultados obtenidos de los ensayos a un sistema computarizado, que acepta una secuencia nucleotídica o una lista de mutaciones y sugiere un nivel de resistencia para las diferentes drogas ARVs (25, 195, 196).

Existen dos algoritmos para la interpretación de éstos ensayos: los algoritmos basados en reglas (del inglés, rules-bases) y los algoritmos de aprendizaje en máquina (del inglés, machine-learning). Los basados en reglas son desarrollados por expertos a partir de una gran cantidad de datos publicados sobre el impacto fenotípico de los ensayos de resistencia al VIH-1 y la significación clínica de las mutaciones detectadas, en los genes de estudios, relacionados con la resistencia (28, 196).

Los algoritmos de aprendizaje en máquina contienen reglas desarrolladas por un programa de computación que analiza los datos que relacionan genotipo con fenotipo o debut clínico (28, 29).

La mayoría de los algoritmos empleados en la clínica son los basados en reglas.

II.7.3.1. Algoritmos de interpretación basados en reglas

La base de datos de VIH de la Universidad de Stanford (196) está entre los algoritmos basados en reglas. Ella acepta igualmente que los usuarios envíen las secuencias de VIH o una lista de mutaciones e informa de los niveles de resistencia inferidos para las 23 drogas aprobadas por la FDA, inhibidoras de la TI y de la PR. El programa asigna una puntuación individual a cada mutación relacionada con resistencia a la droga y realiza una sumatoria de las puntuaciones de todas y cada una de las mutaciones relacionadas con cada fármaco, lo que representa la puntuación total para cada uno de los ARVs. Usando esta puntuación, el programa describe alguno de los siguientes niveles de resistencia a

droga inferido: susceptible, probable resistencia baja, resistencia baja, intermedia y alta (28, 29).

El algoritmo de la Agencia Nacional de Investigaciones para el sida (ANRS), empleado igualmente para interpretar las pruebas de resistencia, se actualiza con regularidad por un panel de expertos investigadores a partir de estudios básicos publicados y de ensayos clínicos realizados por ellos (28, 29).

Existe también un algoritmo creado por investigadores del Instituto Rega, en Leuven (Bélgica), a partir de un conjunto de datos provenientes un número de casos de personas infectadas con VIH-1 y que ha tenido un alto nivel de predicción a la respuesta virológica, tres meses después del comienzo del tratamiento con nuevos regímenes (28, 29).

Algunas de las bases de datos más importantes sobre predicción de los perfiles de resistencia al VIH-1 y sistemas de interpretación son: Stanford-Database, Los Alamos-Database, geno2pheno, HIV Genotypic Drug Resistance Interpretation, ANRS AC11 (106).

CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. Muestras clínicas

Todo el procedimiento experimental que se expone en el presente trabajo ha sido formulado en Proyectos de Investigación aprobados por el Comité de Ética del IPK, que actúa en conformidad con las leyes y reglamentos vigentes dictados por el MINSAP y el CITMA, y que contempla los principios enunciados en la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial para las investigaciones médicas en seres humanos (OMS, 2008). Cada una de las tareas de investigación que conforman la tesis, en las que participan individuos enfermos o sanos, ha sido precedida de una información adecuada acerca de los objetivos, métodos, afiliaciones institucionales de los investigadores, beneficios calculados, riesgos previsibles e incomodidades derivadas del experimento. De igual manera, las personas incluidas en los estudios fueron informadas del derecho de participar o no en la investigación y de retirar su consentimiento en cualquier momento, sin exponerse a represalias. Después de asegurar la comprensión de la información, se recogió por escrito, el consentimiento informado y voluntario de cada persona. Se respetó la confidencialidad de la información de los individuos estudiados, y las muestras obtenidas sólo se utilizaron en las investigaciones para las cuales fueron previstas originalmente (Anexo I).

En el estudio fueron incluidos un total de 585 pacientes infectados con el VIH-1, que asistieron a realizarse conteo de CD4 y/o carga viral en el laboratorio clínico del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", entre los meses de mayo y septiembre del año 2003. Se extrajeron 5 mililitros (mL) de sangre total en tubos con ácido etileno diamino tetra-acético en condiciones de esterilidad. La sangre se centrifugó a 1 000 gravedades (g) durante 15 minutos (min), para la obtención de 1 mL de plasma. Las muestras se almacenaron a -70°C hasta su transporte. En el mes de febrero del año

2004 se transportaron en contenedores cerrados con hielo seco, al laboratorio de Patogenia Viral del Instituto de Salud Carlos III, donde se completó el estudio.

De los 585 pacientes, recibían tratamiento antirretroviral 293 pacientes (50,1%) y 292 (49,9%) no lo recibían. Del total, 17,4% eran mujeres y el 82,5% eran hombres. En relación con la vía de transmisión, 85,1% eran hombres que tenían sexo con hombres y los 14,9% restantes habían sido infectados por vía HT.

Los datos epidemiológicos y clínicos de los pacientes seleccionados para el estudio provienen del Registro Nacional del VIH del MINSAP.

III.2. Extracción de ARN

El plasma extraído (1 mL) se suspendió en 9 mL de tampón de lisis incluido en el estuche NucliSENS® (BioMérieux, Boxtel, Holanda). Este tubo se invirtió y centrifugó durante 3 min a 1 500 g. Para la extracción del ARN se emplearon los reactivos del estuche de la Nuclisens (Biomérieux, Marcy l'Étoile, France). Posteriormente, se tomó un tubo de sílica gel y se agitó hasta formar una suspensión opaca, luego se añadieron 50 microlitros (μL) de ésta a cada tubo de tampón de lisis y se siguió la metodología descrita por Boom y cols. (197). Se incubó durante 10 min a temperatura ambiente (TA), se centrifugó durante 3 min a 1 500 g, se eliminó el sobrenadante y se añadió 1 mL de la solución de lavado. Se realizaron dos lavados con ésta solución, que se centrifugaron durante 1 min a 10 000 g y posteriormente dos lavados más con 1 mL de etanol al 70%, repitiendo la centrifugación en iguales condiciones. Se adicionó 1 mL de acetona y se repitió la centrifugación. El precipitado se desecó en un sistema calefactor (bloque térmico) a 56°C durante 10 min. Se suspendió el ARN en 50 μl de tampón de elución. Se incubó nuevamente a 56°C durante 10 min y a mitad de la incubación se agitó y se dejó nuevamente en el sistema calefactor. Se centrifugó 2 min a 10 000 g. El vial con el ARN extraído se almacenó a -70°C hasta su uso.

III.3. Transcripción inversa y amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa

El segmento del gen del *pol* que codifica para la PR y 0,9 kb del segmento de éste gen que codifica para la TI se amplificó mediante una retrotranscripción-reacción en cadena de la polimerasa (RT-RCP) seguida de RCP anidada. Para la RT-RCP se utilizaron entre 5-15 µL del ARN extraído, teniendo en cuenta, si se conocía la carga viral del paciente, y se añadieron a 45 µL de mezcla de reacción, constituida por 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCL, 2 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 0,4 M de cada cebador (Tabla 2), 10 U RNasin (Promega), 1 U de la enzima BioTaq DNA polymerase (BioLine, London, UK), y 10 U de la SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA). Para la segunda reacción o RCP anidada se tomaron 2 µL de la RT-RCP y se añadieron a 48 µL de una mezcla que contenía 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCL, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 0,4 M de cada cebador (Tabla 2) y 2 U de la enzima BioTaq DNA polymerase (BioLine, London, UK), siguiendo el protocolo descrito por Villahermosa y cols. (198).

Tabla 2. Secuencia nucleotídica de los cebadores empleados para la RT-RCP y la RCP anidada.

RT-RCP	
Positivo 1	Negativo 1
RP-1-S 5'-GAAAAAGGGCTGTTGGAAATGTGGAA-3'	RP-1-A 5'-AAATTTAGGAGTCTTTCCCATATACTATGC-3'
RCP anidada	
Positivo 2	Negativo 2
PR-O-S2 5'-GCTAATTTTTTAGGGAAGATCTGGCCT T-3'	RT-O-A 5'-TGCCTCTGTTAATTGTTTTACATCATTAGTGTG-3'

Las amplificaciones se efectuaron en un termociclador PTC-200 (MJ Research, EEUU). La RT-RCP se inició con un ciclo de transcripción inversa de 30 min a 50°C seguida de un ciclo de desnaturalización a 94°C durante 2 min (la RCP anidada comienza a partir de éste ciclo de desnaturalización). Los ciclos de amplificación siguientes consistieron en una desnaturalización a 94°C por 30 segundos (seg), hibridación a 55°C por 30 seg y extensión a 72°C por 90 seg. Se efectuaron 40 ciclos para la RT-RCP y 35 para RCP anidada. Luego de los ciclos de RCP se realizó una extensión a 72°C por 5 min.

En el momento del estudio no se disponía del dato de la carga viral de la mayoría de las muestras estudiadas porque no se contaba aún con este diagnóstico generalizado. Por ello, tomando en cuenta el protocolo empleado en el laboratorio (198), se añadieron 15 µL del ARN extraído a la primera reacción de amplificación (RT-RCP) de aquellas muestras de las que no se conocía el valor de la carga viral o estaba por debajo de las 2 000 copias. De las que se conocía el valor y en dependencia del mismo se adicionaron 5 o 10 µL del ARN extraído.

Para determinar la carga viral en el plasma de los pacientes se empleó el HIV-1 QT Nuclisens, suministrado por NASBA Diagnostics (BioMérieux, Boxtel, Holanda), siguiendo las instrucciones del fabricante. El límite de detección del ensayo es de 50 copias/mL.

Se obtuvo el valor de la carga viral de un total de 159 pacientes, de ellos 71 con cifras no detectables, 23 por debajo de 1 000 copias/mL, 10 entre 1 000 y 2 000 copias/mL y 55 con más de 2 000 copias/mL. De estas muestras no amplificaron 10 de las que tenían cargas virales por debajo de 1 000 copias/mL, tres que tenían entre 1 000 y 2 000 copias/mL, y ocho con más de 2 000 copias/mL.

Se utilizaron controles negativos de agua y positivos de ARN extraído a partir de muestras de plasmas inoculados con diferente número de copias de ARN de VIH-1 (50, 250 y 1 000 copias/mL). Para la determinación del número de copias del ARN utilizado

como control positivo se partió del plasma de un paciente al que previamente se le ha determinado su carga viral. Se seleccionaron los plasmas con una carga viral elevada, y se diluyeron con plasma de donante sano para dejarlo a las concentraciones de: 500 copias/ml ó 1 000 copias/ml.

III.4. Purificación y secuenciación

Se tomaron 5 µL del producto de la RCP anidada y se aplicaron en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio para realizar una electroforesis horizontal. El gel fue visualizado en un trans-iluminador de luz ultravioleta y empleando un patrón ADN de peso molecular 1 a 10 kb (Lonza Rockland, Inc, Rockland, ME) para chequear el tamaño de la banda esperada.

Los productos de RCP positivos por electroforesis fueron sometidos a una purificación enzimática con 2 U de fosfatasa alcalina (GE Healthcare Bio-Sciences Amersham), 1 U de exonucleasa I, (GE Healthcare Bio-Sciences), más 5 µL del producto de la RCP. El programa de purificación fue de 15 min a 37°C y 15 min a 80°C (199).

A partir de 1µL del producto purificado (10-40 ng para un fragmento de 1 000-2 000 pb) se realizó la reacción de secuenciación, añadiendo además 5,9 µL de agua, 1,5 µL de una mezcla contenida en el estuche comercial BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) y 20 µM de cada uno de los oligos (Tabla 3). Se colocaron en un termociclador a 94°C 2 min, seguido de 25 ciclos a 94°C 30 segundos; 50°C 15 segundos; 60°C 4 min. Para la visualización de la reacción de secuenciación se realizó una electroforesis capilar mediante un secuenciador automático ABI 3700 (Applied Biosystems, Foster City, CA), siguiendo el protocolo del productor.

Tabla 3. Secuencia nucleotídica de los cebadores empleados en la reacción de secuenciación.

Proteasa	
Positivo 1	Negativo 1
PR-T-S 5'-AGCCCCACCCAGAAGAGAGCTT-3'	PRsec 2A 5'-GATGYGGTATTCCTAATTGRACYTCCCA-3'
Transcriptasa Inversa	
Positivo 2	Negativo 2
RTsec 1S 5'-CAAAAATTGGGCCTGAAAATCCATA-3'	OUTER A 5'-TGGATGGGTTATGAACTCCATCCTGAT-3'

Las secuencias fueron corregidas utilizando el segmento de la secuencia de referencia del VIH-1 (HXB2) del subtipo B, correspondiente al fragmento del gen analizado. Esta cepa es la utilizada a nivel internacional como referencia para detectar mutaciones, polimorfismo e inferir la resistencia a los diferentes drogas antivirales.

La secuencia completa de la PR (aminoácidos del 1 al 99) más los 325 codones iniciales de la TI fueron enviados a la base de datos de la Universidad de Stanford (27) para detectar las mutaciones que confieren resistencia a los inhibidores de la TI y la PR del VIH-1.

III.5. Análisis filogenético

Las secuencias de referencias empleadas para el análisis de filogenia y los números de acceso a las secuencias depositadas en el GenBank se muestran en el Anexo II.

Las secuencias fueron alineadas manualmente con Bioedit (Tom Hall, (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>)). El análisis filogenético se realizó con árboles de unión por vecindad (NJ, del inglés neighbor-joining trees), utilizando el modelo de evaluación de dos parámetros de Kimura. El soporte estadístico de los nodos se evaluó mediante el remuestreo (bootstrapping) empleando 1 000 réplicas (200). Se definió como grupo filogenético aquel que estuviera apoyado por un valor de bootstrap $\geq 70\%$. Todos los análisis se realizaron con el programa MEGA 3 (201).

El análisis de recombinación se llevó a cabo mediante bootscanning (202), utilizando el programa Simplot V, versión 3.5.1 (203).

III.6. Análisis estadístico

Mediante la prueba exacta de Fisher se examinó la asociación entre las formas genéticas del VIH-1 más frecuentes y entre los subgrupos filogenéticos (en aquellos subtipos o CRF donde fueron identificados), por una parte, y la preferencia sexual y la región, por otra. Con el empleo de modelos de regresión logística se evaluó la asociación entre cada forma genética con preferencia sexual, región y sexo mediante la determinación, para cada una de estas variables, del cociente de probabilidades (OR, del inglés, odds ratio), con un intervalo de confianza del 95%. Para este análisis se compararon las regiones, debido al pequeño número de muestras por cada provincia, excepto Ciudad de la Habana. Las provincias incluidas en cada región fueron: (1) Ciudad de la Habana, (2) región occidental: Pinar del Río, La Habana, Matanzas e Isla de la Juventud, (3) región central: Villa Clara, Cienfuegos, Sancti Spíritus y Ciego de Ávila y (4) región oriental: Las Tunas, Camagüey, Holguín, Granma, Santiago de Cuba y Guantánamo. En todos los análisis se utilizó el paquete estadístico STATA, versión 8.2 para CP (STATA Corp., College Station TX).

El análisis estadístico para comparar la frecuencia de mutaciones entre las formas genéticas del VIH-1 más representativas se realizó mediante la prueba de McNemar del paquete estadístico Babel para computadora personal (RSIGMA).

Los datos generales recogidos a los pacientes se muestran en el Anexo III y la lista de aminoácidos y sus símbolos actuales en el Anexo IV.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1. Formas genéticas del VIH-1 en el gen de la polimerasa

De las 585 muestras analizadas amplificaron 425. Del grupo de muestras que no amplificaron (215) la mayoría correspondían a pacientes bajo tratamiento, por lo que suponemos que el tratamiento era efectivo en estos pacientes. La no amplificación además pudo deberse, en segundo lugar, y como ya ha sido descrito en materiales y métodos, al hecho de que carecíamos de la información del valor de la carga viral de la mayoría de los pacientes. En tercer lugar, las muestras se almacenaron por medio año a -70°C , como está recomendado, pero no descartamos la posibilidad de un fallo del fluido eléctrico y una posible descongelación. En cuarto lugar, el procedimiento descrito y estandarizado en este laboratorio se realiza a partir de 2 mL de plasma, sin embargo en nuestro caso sólo contábamos con 1 mL para la extracción del ARN.

La distribución de las muestras de acuerdo con la provincia de procedencia, sexo y preferencia sexual, junto con el número de infecciones por VIH-1 diagnosticada en cada provincia al cierre del 2003, se muestra en la Tabla 4.

Se llevó a cabo el análisis filogenético de las secuencias de VIH-1 obtenidas a partir de los ADNs amplificados ($n=425$) y se examinó la correlación entre los hallazgos filogenéticos y la epidemiología de las 425 muestras recolectadas.

Entre todos los donantes de muestras sólo 13 pacientes (3%) refirieron haber salido del país. Las muestras colectadas para este estudio representaban cerca del 12% de la cifra total de las personas infectadas por VIH-1 en Cuba desde su detección hasta fines del 2003, estimada en ese momento en 4 718 individuos infectados. De este total, 3 626 estaban vivos y 951 (26,2%) de ellos habían sido sometidos a tratamiento antiviral de alta eficacia.

Tabla 4. Distribución por provincia, sexo y conducta sexual de los pacientes cubanos estudiados infectados con el VIH-1.

Provincias	Sexo		Conducta sexual		Total	Total de casos VIH-1 diagnosticados por provincias hasta el cierre del 2003
	M	F	HSH	HT		
Ciudad de la Habana	268	35	247	56	303 (71,2%)	2030
Región Occidental						
La Habana	21	6	19	8	27 (6,3%)	161
Pinar del Río	4	3	4	3	7 (1,6%)	128
Matanzas	5	1	3	3	6 (1,4%)	110
Isla de la Juventud	4	1	4	1	5 (1,1%)	24
Región Central						
Villa Clara	13	8	11	10	21 (4,9%)	314
Sancti Spiritus	5	3	2	6	8 (1,8%)	107
Ciego de Ávila	5	3	5	3	8 (1,8%)	70
Cienfuegos	5	0	2	3	5 (1,1%)	68
Región Oriental						
Santiago de Cuba	7	5	7	5	12 (2,8%)	135
Holguín	6	2	3	5	8 (1,8%)	159
Guantánamo	3	3	2	4	6 (1,4%)	35
Camagüey	4	0	4	0	4 (0,9%)	105
Granma	1	2	1	2	3 (0,7%)	120
Las Tunas	1	1	0	2	2 (0,4%)	40
Total	352	73	314	111	425	3626

Abreviaturas: F: Femenino; M: Masculino; HSH: hombres que tienen sexo con hombres; HTs: Heterosexuales.

Fuente: Registro Nacional de VIH del MINSAP. Historias clínicas, IPK

Se confeccionó un árbol con las 425 secuencias mediante el método de NJ, basado en distancias de dos parámetros de Kimura, y una vez que se observó en este árbol con qué referencias agrupaba cada una, éstas se analizaron en árboles por separado para cada subtipo de acuerdo con sus agrupamientos en el árbol inicial.

La distribución de las muestras según su forma genética se ilustra en la Figura 3; donde se observa una alta diversidad de formas genéticas del VIH-1. El subtipo B fue el de mayor prevalencia, seguido por CRF19_cpx, recombinantes BG, CRF18_cpx, subtipo C y subtipo G. En análisis mediante bootscanning utilizando el programa Simplot, 75 secuencias (17,6%) se identificaron como recombinantes entre algunas de las formas genéticas circulantes en Cuba (BG, B/CRF18, B/CRF19, G/CRF18, CRF18/CRF19, B/CRF18/CRF19 y BC), probablemente originadas localmente. Se había esbozado, con anterioridad, la posible existencia de este recombinante único BG que ahora se halla en un alto número de las muestras estudiadas (33).

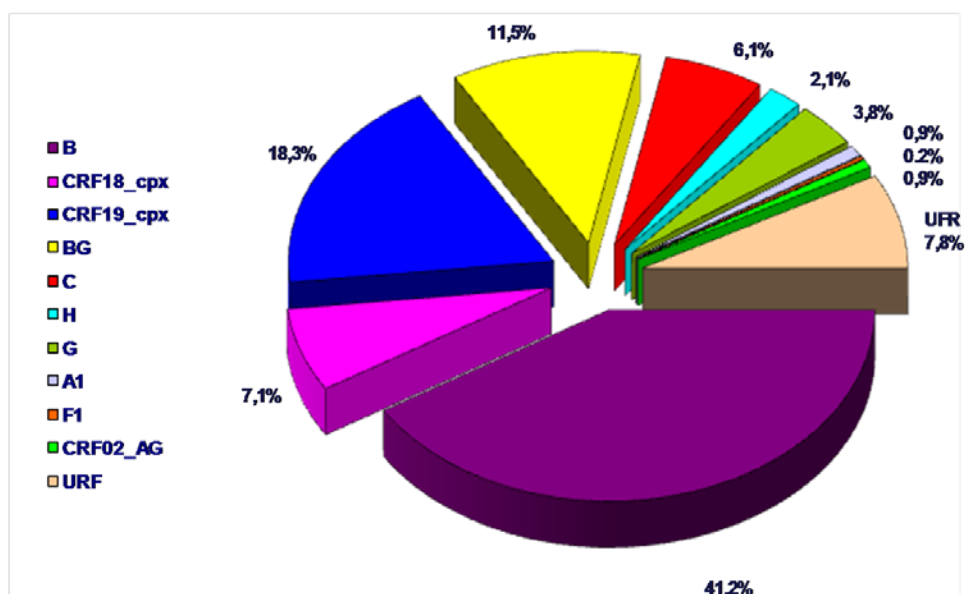


Figura 3 Subtipos, CRFs y URFs identificadas en el fragmento del gen *pol* del VIH-1 analizado.

Los resultados confirman los hallazgos previos, basados en secuencias parciales de *pol* y *env* de 105 muestras recolectadas en el año 1999, y permitieron examinar las

correlaciones epidemiológicas y la dinámica de la distribución de formas genéticas del VIH-1 (33, 35).

La epidemia cubana se ha caracterizado desde sus inicios porque más de un 50% de las personas infectadas habitan en la capital. Está además conformada por más de un 80% de hombres y de ellos más de un 80% son HSH; en la capital este último grupo es aproximadamente el 82% (30).

Como en estudios anteriores, el subtipo B continúa siendo predominante, representando el 41% de las muestras analizadas. Esta proporción es posiblemente mucho más alta que la real para este subtipo, tomando en cuenta que solo se amplificó y secuenció un segmento de 1,2 kb del genoma (fragmento del gen *pol*) y que los HSH están presentes con un 92,1% en la muestra porque se tomó una mayor cantidad de ellas en la Ciudad de la Habana (71,2%), y en ellos prevalece el subtipo B. Esto se debió a que las muestras de plasmas de los pacientes infectados con VIH-1 se tomaron en el Instituto "Pedro Kourí", ubicado en esta ciudad.

El estudio cubano de vigilancia epidemiológica a nivel molecular del período 1997-2002, reportó también al subtipo B en mayor proporción, seguido de los subtipos: A, C, G y las FRs CRF01_AE y CRF02_AG. Además encontraron un grupo de muestras no subtipables (44 de un total de 304). Blanco y cols. describen cinco recombinantes en los genes estudiados (*env/gag*) (A/D, A/G, A/AG, A/B, A/AB) (35, 78).

En el año 1988, que marca el comienzo de la epidemia cubana, fueron diagnosticados 99 pacientes, de ellos 56 infectados en el continente africano (Registro Nacional de VIH del MINSAP), en países como el Congo, Mozambique, Etiopía y Angola; en algunos de los cuales (Congo y Angola) se ha descrito la mayor variabilidad del VIH-1 (12), lo que permitiría explicar este panorama tan diverso de subtipos y FRs descrito en la epidemia cubana. Nájera y cols. describen que en áreas donde circulen más de dos formas

genéticas es posible mediante reinfecciones o infecciones dobles la generación de FRs (47).

Los 49 recombinantes BG forman un grupo monofilético, que se subdivide en tres subgrupos (Figura 4). La Figura 5 muestra el análisis por bootscanning de estos subgrupos, y en ella podemos apreciar cómo se distribuyen los subtipos B y G a lo largo del segmento del gen estudiado. Por el cambio en la distribución del subtipo a lo largo de fragmento del gen estudiado y por los diferentes puntos de recombinación observados (inflexiones de los gráficos), junto con el agrupamiento de los árboles filogenéticos, es por lo que inferimos que probablemente se trataba de tres nuevas CRFs. Sin embargo para poder afirmar que estos subgrupos se corresponden con tres nuevas CRF es necesario secuenciar los genomas completos de tres virus de cada subgrupo, provenientes de pacientes no relacionados epidemiológicamente. Los resultados obtenidos con posterioridad a este trabajo, en genoma completo, indican que ellos correspondían a 3 CRFs (CRF20_BG, CRF23_BG y CRF24_BG) relacionadas estrechamente, las cuales derivan de cepas del subtipo B y G que circulan en Cuba. La expansión reciente de recombinantes BG en Cuba se infiere por la corta distancia genética entre las muestras (Figura 4) y por los datos de diagnóstico reciente, hasta la fecha de realizado el estudio (Figura 6).

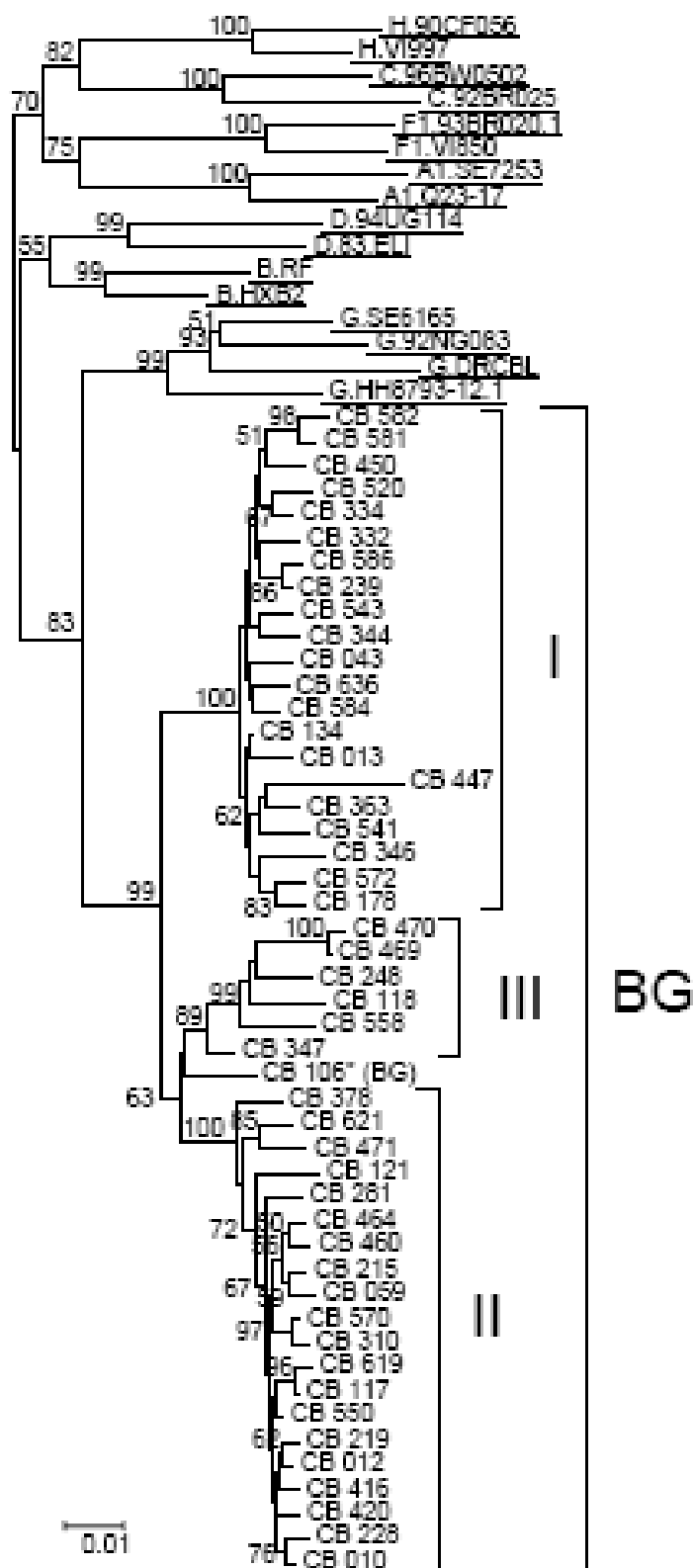


Figura 4 Árbol filogenético obtenido con el método de NJ (Kimura, 2 parámetros) para las 49 secuencias nucleotídicas de VIH-1 analizadas correspondientes a las formas recombinantes BG (I, II y III son subgrupos que forman estas formas recombinantes). Los virus correspondientes a los subtipos de referencia se muestran subrayados denotados por el nombre del subtipo correspondiente seguido por el nombre del aislado. Las muestras cubanas estudiadas están codificadas con el prefijo CB.

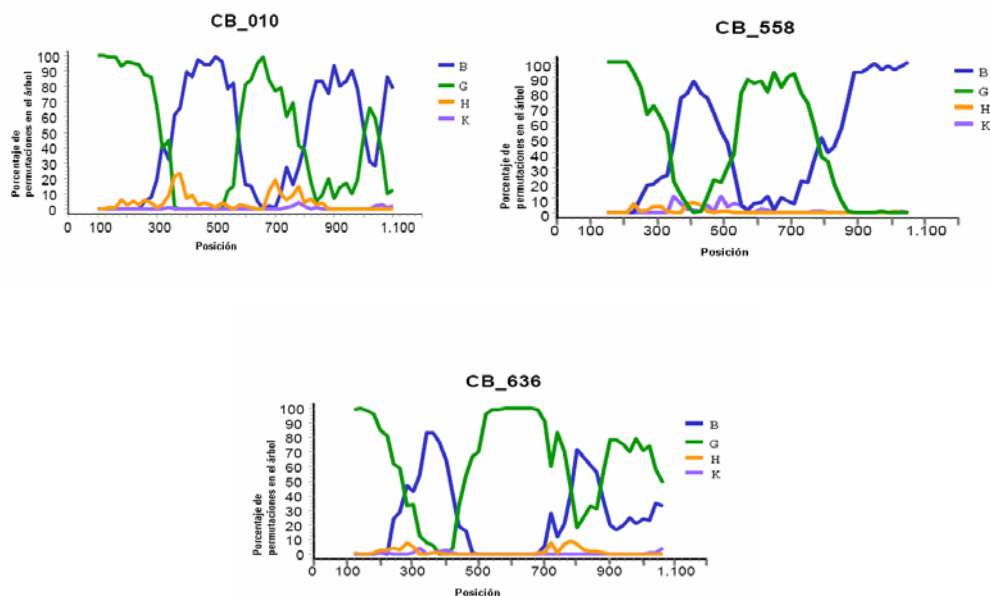


Figura 5 Análisis mediante bootscanning de las secuencias recombinantes en el segmento secuenciado. Se muestra el bootscan de 3 recombinantes BG representativos de los 3 subgrupos filogenéticos (Figura 4). El eje horizontal representa la posición del nucleótido del punto medio de la ventana desde el extremo 5' de la proteasa y el eje vertical representa el valor de bootstrap que apoya el agrupamiento con el subtipo correspondiente. Se utilizaron ventanas de 200-300 nucleótidos, con un incremento de 20 nucleótidos. Los árboles NJ fueron construidos usando distancias de dos parámetros de Kimura. El análisis inicial de bootscanning fue realizado con los consensos de los virus de referencia de todos los subtipos y los CRF18_cpx y CRF19_cpx. Un segundo análisis (el mostrado en la figura) se realizó sólo con las secuencias de referencia que agrupaban con el virus analizado $\geq 70\%$ en algún segmento del análisis inicial, además de los subtipos de referencia H y K utilizados como grupos externos. Los subtipos de referencia usados en el análisis fueron aquellos incluidos en los alineamientos de Los Álamos HIV Sequences Database.

Se llevó a cabo además un análisis del porcentaje de subtipos presentes en la muestra por años de diagnóstico (Figura 6). Del total de 28 individuos diagnosticados entre 1986 y 1990, 25 de ellos eran HT, con una alta diversidad de formas genéticas; solamente dos virus presentaban subtipo B. Las ocho infecciones probablemente adquiridas en África central (Angola o República Democrática del Congo) fueron diagnosticadas en este período. Entre las infecciones diagnosticadas posteriormente, los virus del subtipo B aumentaron al inicio, con un pico en 1997 del 58%, seguido de una disminución gradual, coincidiendo desde 1999, con una expansión de las infecciones por recombinantes BG. Ninguno de los recombinantes BG fue diagnosticado con la

infección por VIH-1 antes de 1996 y todos exceptuando tres fueron diagnosticados a partir del 2000 (Figura 6, izquierda).

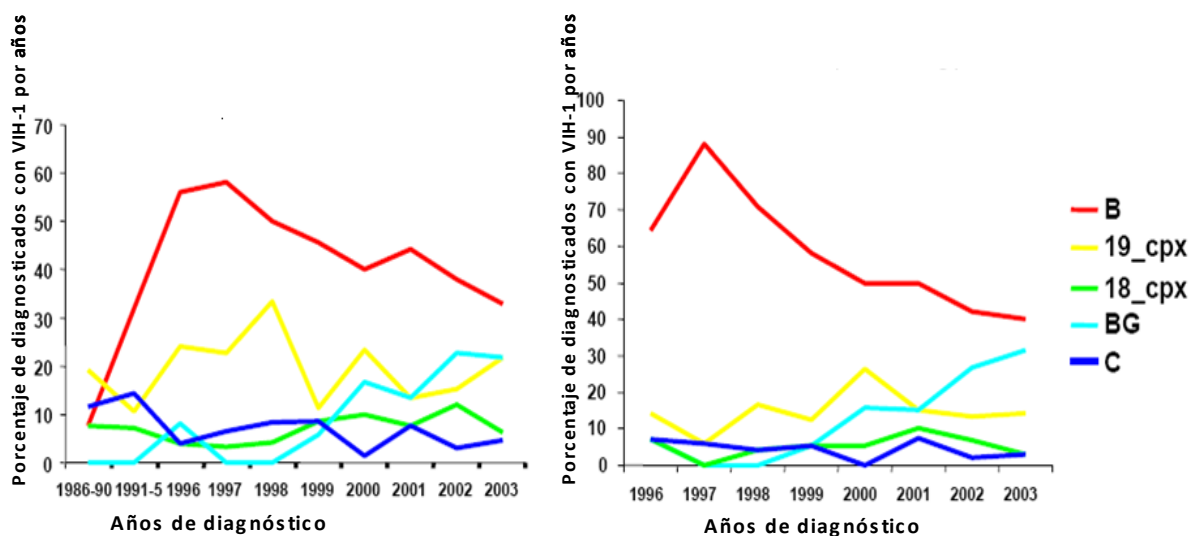


Figura 6 Porcentaje de subtipos de acuerdo al año de diagnóstico. La gráfica de la izquierda corresponde al porcentaje de subtipos por años de diagnóstico contra el total de pacientes en la muestra y la de la derecha al porcentaje de subtipos por años de diagnóstico contra los pacientes HSH de Ciudad de la Habana.

En Ciudad de la Habana este recombinante estuvo completamente ausente en las infecciones diagnosticadas antes de 1999 en el grupo de HSH y se incrementaron progresivamente hasta un 31,4% de las infecciones diagnosticadas en el 2003; unido a una marcada disminución en la proporción de infecciones por el subtipo B (Figura 6, derecha). Las otras formas genéticas más frecuentes en la muestra (CRF18_cpx, CRF19_cpx y subtipo C) fluctuaron a través de los años, sin exhibir una tendencia mantenida.

Si comparamos estos resultados con el estudio de 1999 de Cuevas y cols. la diferencia más marcada es el aumento en la proporción de recombinantes BG, de un 2% a un 11,6%. La mayoría de ellos (77,6%) son pacientes HSH de Ciudad de la Habana (37).

No conocemos con exactitud si la rápida expansión de recombinantes BG es debido a las características biológicas virales o al aumento de conductas sexuales promiscuas, o a ambas, pero tal diversidad refleja la naturaleza dinámica de la genética de la

epidemia del VIH-1; mediante la cual, las formas genéticas nuevas, introducidas o generadas por recombinación, pueden expandirse rápidamente en una epidemia establecida.

En otras partes del mundo se han observado cambios similares. Tovanabutra y cols. en Tailandia, describen diferentes formas genéticas del VIH en distintas poblaciones de riesgo. El subtipo B primó entre los usuarios de drogas intravenosas (UDIs) y la CRF01_AE entre HT. Sin embargo, en el año 2000 la CRF01_AE desplazó al subtipo B como forma predominante entre UDIs (204, 205).

El caso de los recombinantes BG en Cuba difiere del caso de Tailandia en que las CRFs cubanas se han generado localmente y expandido dentro del contexto de una epidemia establecida. Los cambios rápidos en la distribución de formas genéticas en epidemias de VIH-1 establecidas apoyan la necesidad de una vigilancia continua (33, 206).

Resultados similares a lo acontecido con las FRs BG muestra un estudio reciente realizado en China en población HSH, donde el subtipo B disminuye del 77,5% al 41,9%, mientras la CRF01_AE aumenta del 3,7% al 30,2% (207).

Otro de los subtipos detectados fue el C. El presente estudio reveló también la circulación del subtipo C en Cuba, por su hallazgo entre personas no infectadas en África y sin relación directa con aquellos que la adquirieron al inicio de la epidemia en ese continente. Esto se apoya en la observación de los dos subgrupos (I y II), que muestra la Figura 7, con altos valores de bootstrap (95% y 99%, respectivamente), los cuales no agrupan con las cepas de referencia africanas. Debido a la gran variabilidad del virus, aún dentro de un mismo paciente, y el tiempo transcurrido desde los inicios de la epidemia, este subtipo ha ido cambiando.

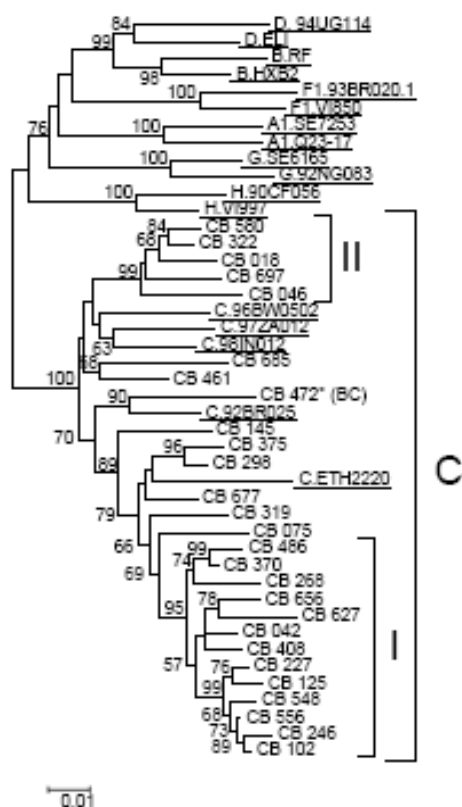


Figura 7 Árbol filogenético obtenido con el método de NJ para las 26 secuencias nucleotídicas del segmento del gen *pol* del VIH-1 analizadas que agrupan con el subtipo C (I y II son subgrupos de este subtipo). Los virus correspondientes a los subtipos de referencia se muestran subrayados designados con el nombre del subtipo correspondiente seguido del nombre del aislado. Las muestras cubanas estudiadas están codificadas con el prefijo CB.

Blanco y cols. describieron 12 pacientes cubanos infectados con virus de subtipo C, dos de los cuales adquirieron la infección en África, y con posterioridad describieron 23 pacientes infectados con este subtipo, cuya infección había sido adquirida en África o por contacto directo con estos pacientes (78). En este trabajo se comenta sobre una posible diferencia del subtipo C encontrado en Cuba y el virus de referencia; sin embargo esto no pudo ser confirmado pues la técnica empleada en el estudio no lo permitió. Cuevas y cols. hallaron dos pacientes infectados con este subtipo, uno de los cuales adquirió la infección en Etiopía y el otro en Zambia (33).

Ochenta y dos (19,3%) virus fueron recombinantes entre dos o más formas genéticas que circulan en Cuba (subtipo B, G y C, CRF19_cpx y CRF18_cpx) (Figura 8 y 9). La

Figuras 8 muestra el árbol correspondiente a estas formas en mosaico, identificadas mediante análisis de bootscanning, que se muestra en la Figura 9.

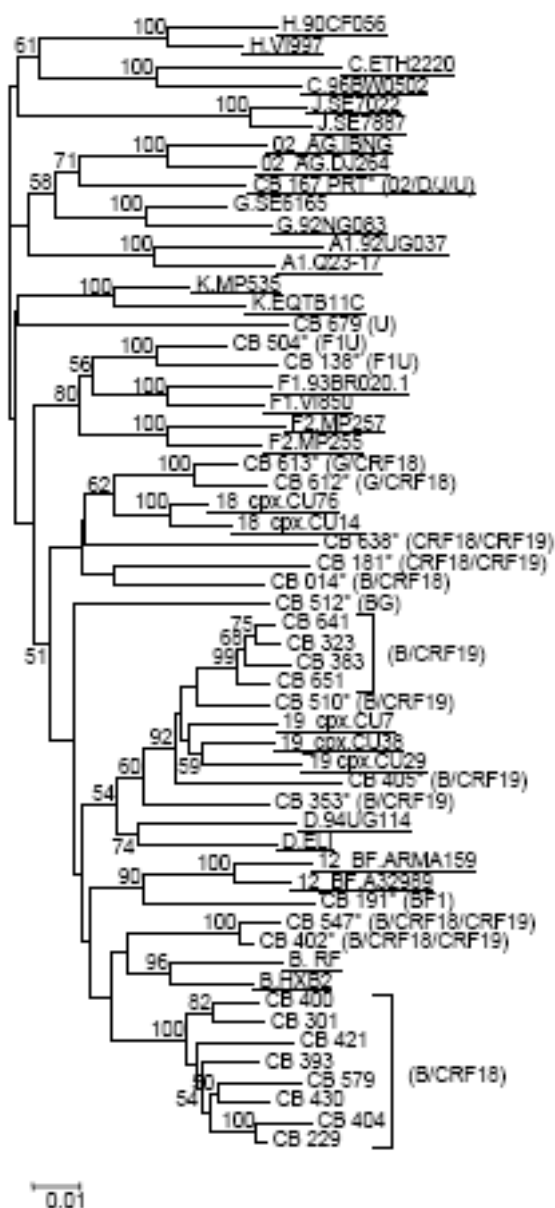


Figura 8 Árbol filogenético obtenido con el método de NJ para las secuencias nucleotídicas del segmento del gen *pol* del VIH-1 analizadas correspondientes a posibles recombinantes. Los virus correspondientes a los subtipos y CRF de referencia se muestran subrayados, designados con el nombre del subtipo o CRF correspondiente seguido del nombre del aislado. Las muestras cubanas estudiadas están codificadas con el prefijo CB.

Este incremento relativo de los recombinantes con relación a estudios anteriores puede ser el resultado de la expansión de los BGs. Otros recombinantes de esta clase que tienen una expansión limitada son los B/CRF18 (n=11), ocho de los cuales forman un

grupo monofilético pudiendo representar una nueva CRF o un recombinante derivado de una CRF.

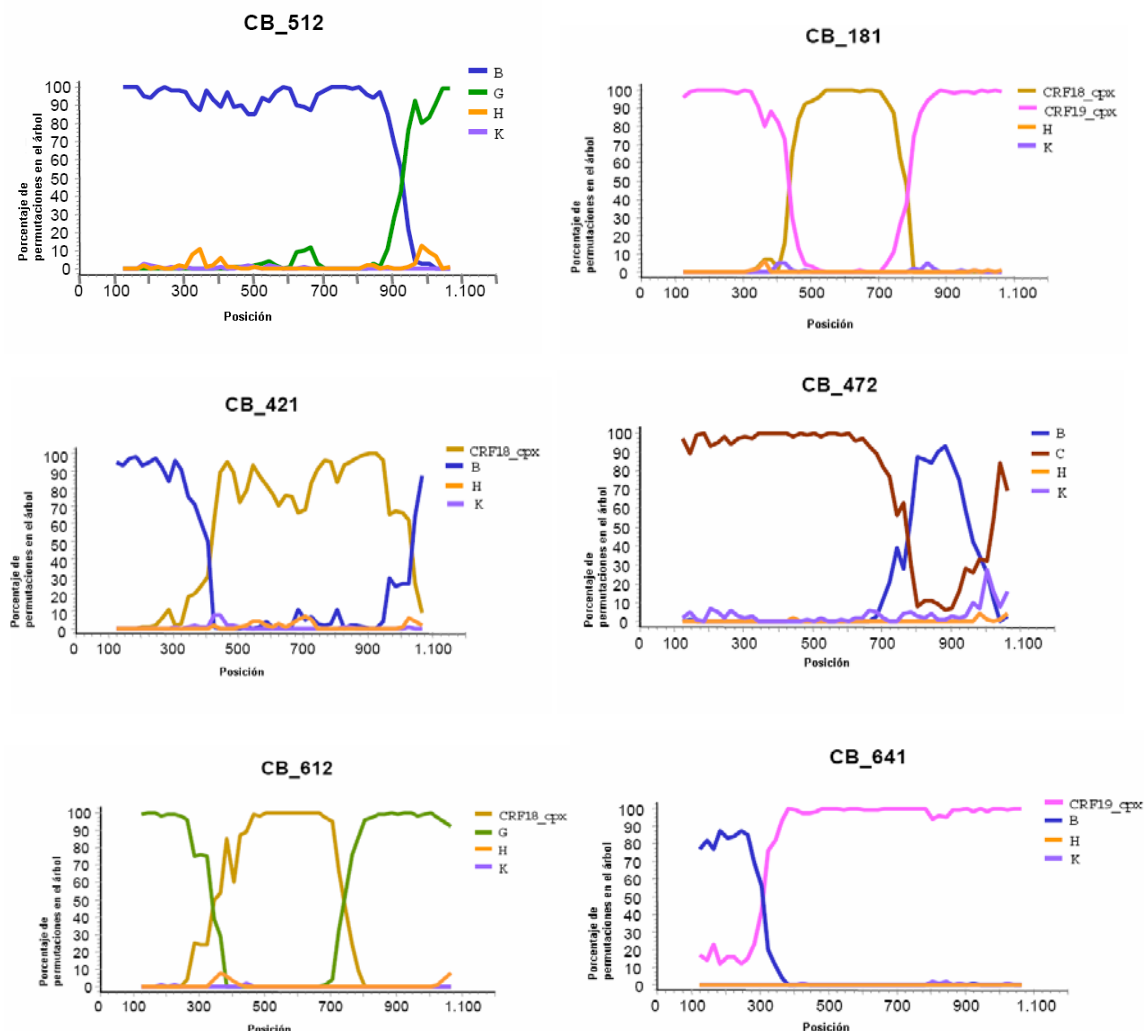


Figura 9. Análisis mediante bootscanning de secuencias recombinantes en el segmento del gen *pol* del VIH-1. Se muestra el bootscan de 6 recombinantes, un recombinante único BG y uno de cada recombinante B/CRF19, B/CRF18, G/CRF18, CRF18/CRF19 y B/C. El eje horizontal representa la posición del nucleótido del punto medio de la ventana desde el extremo 5' de la proteasa y el eje vertical representa el valor de bootstrap que apoya el agrupamiento con el subtipo o CRF correspondiente. Se utilizaron ventanas de 200-300 nucleótidos, con un incremento de 20 nucleótidos. Los árboles NJ fueron construidos usando distancias de dos parámetros de Kimura. El análisis inicial de bootscanning se realizó con consensos de virus de referencia de todos los subtipos y los CRF18_cpx y CRF19_cpx. Un segundo análisis (el mostrado en la figura) se realizó posteriormente sólo con las secuencias de referencia que agrupaban con un valor de bootstrap $\geq 70\%$ en algún segmento del análisis inicial, además de los subtipos de referencia H y K utilizados como grupos externos. Los subtipos de referencia usados en el análisis fueron aquellos incluidos en los alineamientos de Los Álamos HIV Sequences Database. Las referencias de CRF18_cpx fueron CU14 y CU76. Para CRF19_cpx fueron CU7, CU29 y CU38. Las muestras cubanas estudiadas están codificadas con el prefijo CB.

Teniendo en cuenta que estos resultados están basados en el análisis de 1,2 kb del genoma del VIH-1 (proteasa y 0,9 kb de la transcriptasa inversa), es muy probable que la proporción real de estos recombinantes sea mayor. Una gran prevalencia de recombinantes únicos también ha sido descrita en otras áreas geográficas como Myanmar central (208), sudeste de China (209), África oriental (210, 211), Argentina (212, 213), y Brasil (214).

IV.1.1. Asociación de las formas genéticas de VIH-1 con la región geográfica y la preferencia sexual

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas con una $p < 0,05$, al analizar la asociación de algunas formas genéticas con la preferencia sexual. Las formas genéticas asociadas con los HSH fueron, subtipo B, recombinantes BG, y recombinantes B/CRF18; mientras que las asociadas con los HT fueron los subtipos G y H (Tabla 5). El estudio de Cuevas y cols. describe resultados similares a los nuestros con un predominio del subtipo B entre los HSH, mientras que las formas genéticas no B predominaron entre los HT (33).

Tabla 5. Asociación de las formas genéticas de VIH-1 con la preferencia sexual.

Subtipos o formas recombinantes	Preferencia sexual			
	HSH (n=314)		HT (n=111)	
	n	%	n	%
B ^a	155	49,4	20	18
<u>CRF19_cpx</u>	55	17,5	23	20,7
BG ^a	42	13,4	7	6,3
<u>CRF18_cpx</u>	19	6,1	11	9,9
C	16	5,1	10	9
G ^a	5	1,6	11	9,9
B/ <u>CRF18</u> ^a	11	3,5	0	0
H ^a	2	0,6	7	6,3
B/ <u>CRF19</u>	5	1,6	2	1,8

Abreviaturas: HSH: hombres que tienen sexo con hombres; HTs: Heterosexuales

^a Diferencia estadísticamente significativa por grupo de riesgo ($p < 0.05$) de acuerdo a la prueba exacta de Fisher.

En las Tablas 5 y 6 se aprecian, como la diferencia más notable, que el subtipo B está presente en el 49,4% de HSH, pero solamente en el 18% de HT (OR 5,0, 95% IC 2,0-12,3).

Tabla 6. Análisis multivariado entre las formas genéticas de VIH-1, la región geográfica y la preferencia sexual.

Subtipos y formas recombinantes	Variables incluidas en el modelo ^a			
	Preferencia sexual ^b		Región ^c	
	Cociente de probabilidades (OR)	95% IC	Cociente de probabilidades (OR)	95% IC
B	5	(2,0-12,3) ^d	0,4	(0,2-1,1) ^e
CRF19_cpx	1,3	(0,5-3,6)	0,5	(0,2-1,5)
BG	1,7	(0,5-5,9)	0,5	(0,1-2,4)
CRF18_cpx	1,3	(0,3-5,9)	2,8	(1,0-7,6) ^d
C	0,5	(0,2-1,6)	2,6	(0,9-7,6) ^e
G^f	0,1	(0,0-0,5) ^d	-	-
B/CRF18^g	-	-	4,5	(1,1-17,7) ^d
H	0,5	(0,0-6,3)	81,8	(9,5-701,0) ^d
B/CRF19^h	0,9	(0,2-4,6)	-	-

Abreviaturas: HSH: hombres que tienen sexo con hombres; HTs: Heterosexuales

^a Todos los modelos ajustados por sexo.

^b Categoría de referencia: HT.

^c Categoría de referencia: todas las regiones excepto la región oriental.

^d Diferencias estadísticamente significativas con una $p < 0,05$.

^e Diferencias estadísticamente significativas con una $0,05 \leq p < 0,10$.

^f En este modelo todos los individuos de la región oriental tienen formas genéticas de subtipos no G, por tanto la variable "región" está excluida del modelo.

^g En este modelo todos los individuos tenían la misma categoría de riesgo y sexo, por lo tanto el modelo sólo incluye la variable "región".

^h En este modelo todos los individuos eran de la misma región y sexo, por lo tanto el modelo sólo incluye la variable "preferencia sexual".

Fuente: Historias clínicas, IPK; Laboratorio de Patogenia Viral, Instituto de Salud Carlos III.

Desde los inicios de la pandemia del sida, el subtipo B se ha asociado con la población HSH. Montano y cols. estudiaron la prevalencia, genotipos y factores de riesgo de la infección por VIH-1 en cinco países de América del Sur, encontrando una alta prevalencia de la infección entre HSH asociada a múltiples parejas sexuales y a enfermedades de transmisión sexual; sin embargo no se encontró asociación con el grupo de UDI. El subtipo B predominaba entre los HSH en toda la región, mientras que

el subtipo F predominaba entre las mujeres trabajadoras del sexo en Argentina y los hombres de ese mismo ramo en Uruguay (38). Los primeros estudios realizados de la epidemia en Argentina revelaron la presencia de dos epidemias independientes: una entre los HSH en la que predomina el subtipo B y una segunda en HT (hombre y mujer) en la que es mayoría el subtipo F (215).

En otras partes se ha descrito una distribución desigual de formas genéticas entre grupos con diferente preferencia sexual, como es el caso de Tailandia (216, 217), Sudáfrica (218), Argentina (212, 215) y Rusia (72, 219, 220). En Cuba, diversas formas genéticas de origen africano parecen haber sido introducidas tempranamente entre HTs, como se sugiere en el análisis de las muestras de individuos diagnosticados al inicio de la epidemia (30, 35, 78). Entre HSH el subtipo B ha sido la forma genética más común, al menos hasta 1996, aunque otras formas genéticas, también halladas en la población HT, han estado presentes en este grupo.

Los resultados preliminares del análisis multivariado indicaron que las asociaciones con la región oriental fueron solamente significativas en unos casos. Por esta razón se usó la variable región en dos categorías: la región oriental y el resto de Cuba.

El modelo multivariado mostró que los virus obtenidos de los pacientes que viven en la región oriental de Cuba se asociaban con las FRs CRF18_cpx, B/CRF18 y el subtipo H (Tabla 6), mientras que los pacientes de la región central del país (datos no mostrados en la Tabla 6) se asociaron con la variante viral CRF19_cpx, cuando se comparó con el resto de Cuba (OR 3,2, 95% IC 1,6-6,6). La CRF19_cpx, fue descrita en el año 2005 (221), siendo las formas genéticas parentales probablemente de origen africano.

En el caso del subtipo H, el intervalo de confianza del modelo multivariado es muy grande, como se puede observar en la Tabla 6, porque el número de muestras analizadas es pequeño. El subtipo H, encontrado solamente en una muestra en el estudio anterior y adquirido en África, se detecta ahora en nueve virus. Solamente dos

infecciones se comprobaron que fueron adquiridas en África. La prevalencia de este subtipo es marcada en Santiago de Cuba (Región Oriental) con la presencia en seis (50%) de las 12 infecciones (total de infecciones detectadas en esta provincia). Cuatro de estos virus forman un grupo monofilético (Figura 10), lo que sugiere que el subtipo H puede estar circulando en esta provincia. El subtipo H, parece haberse propagado a partir de un paciente infectado en África, que habita en esa zona del país.

En el presente estudio se describen resultados similares a lo observado en la epidemia de Brasil, con distribuciones de subtipos entre diferentes regiones (222).

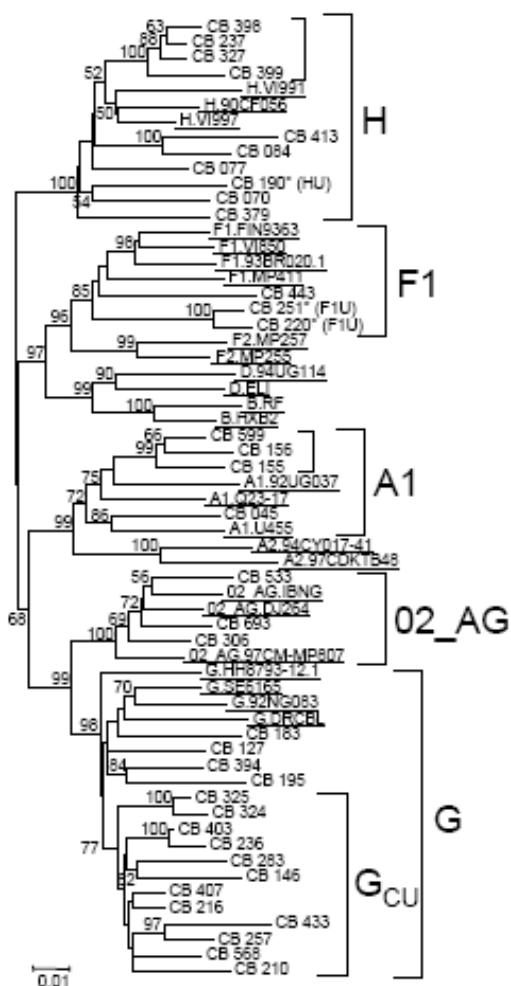


Figura 10 Árbol filogenético obtenido con el método de NJ para las secuencias nucleotídicas segmento del gen *pol* del VIH-1 analizadas correspondientes a los subtipos A1, F1, G, H y la CRF02_AG (Gcu es un subgrupo del subtipo G en el que agrupan los G cubanos). Los virus correspondientes a los subtipos y CRF de referencia se muestran subrayados designados por el nombre del subtipo o CRF correspondiente seguido por nombre del aislado. Las muestras cubanas estudiadas están codificadas con el prefijo CB.

IV.1.1.1. Asociación de los subgrupos del VIH-1 con las regiones geográficas de Cuba y la preferencia sexual

Dentro de las formas genéticas más representativas (recombinantes BGs, subtipos C, G, subtipo B, CRF19_cpx y CRF18_cpx) se identificaron subgrupos filogenéticos apoyados por los valores de bootstrap, que se pueden observar en los árboles correspondientes (Figuras 4, 7, 10, 11, 12 y 13). El número de individuos y la distribución según la preferencia sexual en cada subgrupo se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7 Asociación de los subgrupos del VIH-1 con la preferencia sexual.

Subtipo y forma recombinante	Subgrupo	Total n	HSH		HT	
			n	%	n	%
B		175	155	88,6	20	11,4
	B-I ^a	97	91	93,8	6	6,2
	B-II	13	13	100	0	0
<u>CRF19_cpx</u>		78	55	70,5	23	29,5
	<u>CRF19-I</u> ^a	18	16	88,9	2	11,1
	<u>CRF19-II</u> ^a	13	4	30,8	9	69,2
	<u>CRF19-III</u> ^a	11	11	100	0	0
	<u>CRF19-IV</u>	6	5	83,3	1	16,7
BG		49	42	85,7	7	14,3
	BG-I	21	17	81	4	19
	BG-II	20	18	90	2	10
	BG-III	6	5	83,3	1	16,7
<u>CRF18_cpx</u>		30	19	63,3	11	36,7
	<u>CRF18-I</u>	14	8	57,1	6	42,9
	<u>CRF18-II</u>	8	5	62,5	3	37,5
C		26	16	61,5	10	38,5
	C-I ^a	13	13	100	0	0
	C-II ^a	5	0	0	5	100
G		16	5	31,2	11	68,8
	Gcu	12	5	41,7	7	58,3

Abreviaturas: HSH: hombres que tienen sexo con hombres; HTs: Heterosexuales

^a Diferencias estadísticamente significativas por grupo de riesgo ($p \leq 0.05$) de acuerdo a la prueba exacta de Fisher.
Fuente: Historias clínicas, IPK; Laboratorio de Patogenia Viral, Instituto de Salud Carlos III.

Mediante un análisis univariado se examinaron las asociaciones de los virus pertenecientes a subgrupos con las categorías de preferencia sexual y región. Se encontró que los subgrupos B-I, CRF19-I, CRF19-III y C-I estaban asociados a HSH; mientras que CRF19-II y C-II se asociaban con los HT (Tabla 7) y CRF19-IV se asociaban con la región central (OR 3,2, 95% IC 1,6-6,6).

El subgrupo más grande (B-I) abarca 97 virus del subtipo B, la mayoría de los cuales son HSH de Ciudad de La Habana (Figura 11). Este subgrupo también había sido identificado en un estudio anterior con resultados concordantes entre el gen *pol* y la región V3 de *env* (33).

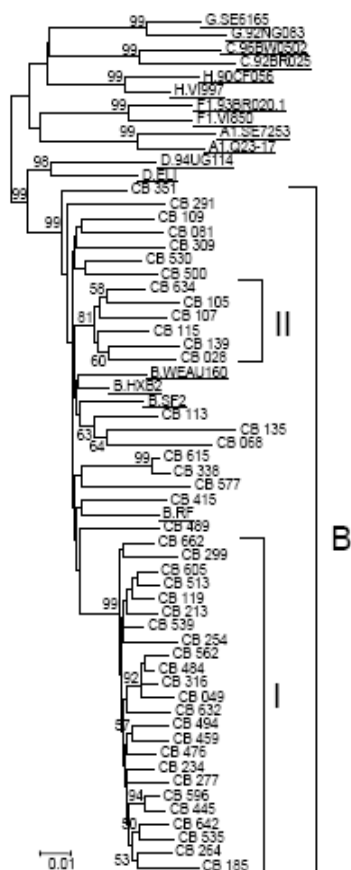


Figura 11. Árbol filogenético obtenido con el método de NJ para las 175 secuencias nucleotídicas del segmento del gen *pol* del VIH-1 analizadas correspondientes al subtipo B (I y II son subgrupos de este subtipo). Debido al gran número de muestras de secuencias, el árbol incluye solamente una fracción de los virus del subtipo B estudiados. Los virus correspondientes a los subtipos de referencia se muestran subrayados denotado por el nombre del subtipo correspondiente seguido del nombre del aislado. Las muestras cubanas estudiadas están codificadas con el prefijo CB.

De los 14 subgrupos, siete se asociaron con preferencia sexual y dos con la región central. Algunos tienen una corta distancia inter-muestra (Figura 4) y datos de diagnóstico reciente (Figura 6), lo que sugiere la existencia de grupos de transmisión activa del VIH-1, en Cuba.

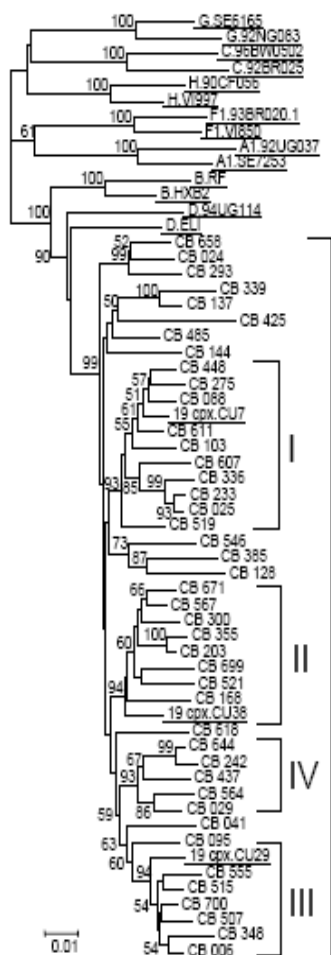


Figura 12 Árbol filogenético obtenido con el método de NJ para las 30 secuencias nucleotídicas del segmento del gen *pol* del VIH-1 analizadas correspondientes a la forma recombinante circulante compleja 18 (I, II, III y IV son subgrupos de esta forma recombinante). Los virus correspondientes a los subtipos y CRF de referencia se muestran subrayados, designados con el nombre del subtipo o CRF correspondiente seguido del nombre del aislado. Las muestras cubanas estudiadas están codificadas con el prefijo CB.

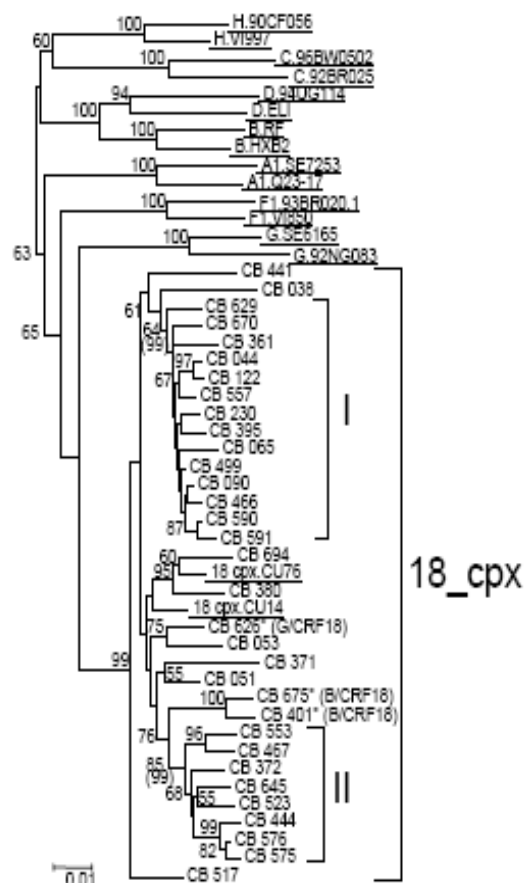


Figura 13 Árbol filogenético obtenido con el método de NJ para las 78 secuencias nucleotídicas del segmento del gen *pol* del VIH-1 analizadas correspondientes a la forma recombinante circulante compleja 19 (I, II, III y IV son subgrupos de esta forma recombinante). Debido al gran número de muestras de secuencias el árbol incluye solamente una fracción de las CRF19_cpx. Los virus correspondientes a los subtipos y CRF de referencia se muestran subrayados, designados con el nombre del subtipo o CRF correspondiente seguido del nombre del aislado. Las muestras cubanas estudiadas están codificadas con el prefijo CB.

El reconocimiento de subgrupos filogenéticos dentro de los subtipos y CRFs permite la identificación de recombinaciones intra-subtipo y superinfecciones (12), lo que pudiera ser relevante para examinar la correlación entre la variación genética del VIH-1 y la respuesta inmune protectora en re-infecciones.

IV.2. Mutaciones en el gen *pol* del VIH-1 y resistencia a los antirretrovirales

IV.2.1. Pacientes tratados

Los ARVs son producidos por las grandes transnacionales farmacéuticas y se emplearon en los países desarrollados desde su salida al mercado, hecho que estuvo restringido para los países en vías de desarrollo por el alto costo de los mismos. Sin embargo, países como la India (2004) (223), Brasil (1996) (224) y Cuba (2001) (30) fueron pioneros en la producción de genéricos y su implementación en el tratamiento de pacientes infectados con este virus. Las autoridades sanitarias en Cuba decidieron su producción desde el año 2001 y en la actualidad son tratados todos los pacientes que lo requieren.

La primera herramienta empleada para el seguimiento del paciente VIH fue la cuantificación de las células CD4+. Luego se introduce la cuantificación de la carga viral, parámetro que predice la afectación del sistema inmune antes de las variaciones del conteo de células CD4+. Con el empleo de la terapia antirretroviral se comienza a utilizar una técnica más novedosa, la secuenciación del ácido nucleico viral. Ella permite detectar precozmente mutaciones en el virus que pueden inducir una mala respuesta a la terapia en el paciente tratado y por tanto la evolución del paciente. Esta técnica detecta poblaciones virales mayoritarias presentes en el individuo (en más del 20% de la población). Hoy en día se emplean métodos más sensibles aún, que permiten encontrar mutaciones presentes en poblaciones minoritarias y predicen una respuesta inadecuada en los pacientes no tratados.

A pesar del éxito del tratamiento, algunos pacientes presentan virus con resistencia a los regímenes ARVs. Como resultado de ello se hace difícil elegir otro régimen de tratamiento, debido a que en la mayoría de los casos los fallos pueden deberse a la emergencia de mutaciones en el VIH-1 que confieren resistencia, y algunas de estas mutaciones causan resistencia cruzada entre los medicamentos ARVs (225). En el mundo se han realizado estudios para corroborar la utilidad de los ensayos genotípicos, como herramientas factibles para la adecuada selección de terapias de rescate (226). Estos estudios han mostrado que en los pacientes con fallo terapéutico, el uso de estos ensayos permitió realizar un cambio adecuado de medicamento y disminuir los costos al elegir temprana y correctamente el tratamiento y además posibilitó un correcto uso de los IPRs (227-229).

La distribución de las formas genéticas del VIH entre los pacientes tratados y no tratados por subtipos se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8 Distribución de las formas genéticas del VIH-1 con relación al tratamiento antirretroviral por subtipos y formas genéticas.

Formas genéticas del VIH-1	Pacientes no-tratados n=250 (58, 8%)	Pacientes tratados n=175 (41, 2%)	Total de pacientes n=425
B	109 (43, 6%)	66 (37, 7%)	175 (41, 2%)
C	10 (4%)	16 (9, 1%)	26 (6, 1%)
G	7 (2, 8%)	9 (5, 1%)	16 (3, 8%)
H	3 (1, 2%)	6 (3, 4%)	9 (2, 1%)
A1		4 (2, 3%)	4 (0, 9%)
F1		1 (0, 6%)	1 (0, 2%)
CRF19_cpx	44 (17, 6%)	34 (19, 4%)	78 (18, 3%)
CRF18_cpx	21 (8, 4%)	9 (5, 1%)	30 (7, 1%)
CRF02_AG	2 (0, 8%)	2 (1, 1%)	4 (0, 9%)
Formas Recombinantes Únicas	54 (21, 6%)	28 (16, 6%)	82 (19, 3%)

Fuente: Registro Nacional de VIH del MINSAP. Historias clínicas, IPK.

De los 425 pacientes cuyos virus fueron amplificados, 175 (41,2%) se encontraban recibiendo tratamiento antirretroviral y 250 (58,8%) no recibían tratamiento.

Las mutaciones del VIH-1 detectadas en el gen de la polimerasa asociadas a resistencias a los ITI se detectaron en 92 de 175 virus amplificados (52,5%) en el grupo de pacientes tratados (Tabla 9).

El primer estudio publicado sobre resistencia a los antivirales empleados en el tratamiento de los pacientes infectados con VIH-1 en Cuba, data del año 2001, y las 103 muestras analizadas se recogieron durante el año 1999 (34). Ruibal y cols. hallaron una prevalencia de mutaciones en la TI del VIH-1 asociadas a resistencia a los ITIANs en pacientes tratados, del 27,6% y del 5,3% a los ITINANs. Esta muestra estaba formada por 27 pacientes sin tratar y el resto bajo tratamiento. Los pacientes tratados se dividieron, luego, según tipo de tratamiento, que recibieron como mono, bi y tri-terapia por un período de tiempo no mayor de 3 años (34). Los datos publicados corresponden a un período durante el cual Cuba trataba a un número muy reducido de pacientes con ARVs importados, empleados en mono y bi-terapia, mayoritariamente. Los valores más elevados obtenidos en nuestro trabajo (52,5%) corresponden a la extensión de la terapia en la isla y al hecho de que se ha considerado el porcentaje global a los ITI, sin separar el correspondiente a resistencias a ITIANs de las resistencias a ITINANs. Hay que destacar que la terapia de primera línea en Cuba está formada por la combinación de ITI, de donde se espera que también las mutaciones más frecuentes y los valores de resistencia más altos sean a estos grupos (30). Sin embargo, los valores por nosotros encontrados son menores que los referidos en países europeos (230) y en EEUU, probablemente debido al uso más temprano y extenso de las drogas ARVs en estos últimos.

Un gran número de los pacientes estudiados por Ruibal y cols. también lo fueron por nosotros, de donde la resistencia descrita por ellos, pudiera estar subyacente en

nuestra muestra, provocando valores mayores a los reales si solo hubiéramos tenido en cuenta aquellos pacientes que comenzaron triterapia después del 2001.

Las sustituciones encontradas en el segmento que codifica para la TI del VIH-1 se muestran en la Tabla 9. Las más frecuentes fueron:

- M184V en 68 de 92 (74,0%)
- T215Y en 36 de 92 (39,1%).
- K103N en 20 de 92 (21,7%).
- Y181C en 16 de 92 (17,4%).
- Las sustituciones Q151M y la T69S, con la inserción de dos aminoácidos (SS) entre las posiciones 69 y 70 relacionados con resistencia múltiple a los ITIANs, fue detectada en 1 de 92 (1,1%).

Como se ha destacado en la literatura, el codón 184 se encuentra localizado en un dominio altamente conservado de la TI formado por la secuencia de aminoácidos YMDD donde se localiza el centro activo de la enzima. La mutación M184V, que se detecta en virus de pacientes infectados con VIH-1 tratados con 3TC, confiere resistencia cruzada al FTC, y compromete la efectividad del ABC y el DDC por conferir resistencia media y baja respectivamente. Esta mutación también puede ser observada en virus de pacientes infectados con VIH-1, tratados con DDI y DDC. Los experimentos *in vitro* indican que esta mutación puede disminuir ligeramente *in vivo* la susceptibilidad del virus a DDI, DDC y ABC (231).

Si bien las mutaciones M184V y K103N fueron frecuentes, la literatura destaca la pérdida de la sensibilidad a la NVP y al 3TC antes de concluido el primer mes de tratamiento, por la aparición de estas mutaciones (232, 233).

Resistencia a las drogas antirretrovirales y diversidad genética del VIH-1 en Cuba

Tabla 9: Mutaciones en el VIH-1 asociadas con niveles de resistencia a los inhibidores de la transcriptasa inversa en el grupo de pacientes tratados.

Formas genéticas			Mutaciones en el segmento del gen que codifica para la TI del VIH-1															
			Mutaciones															
	Total	Resistencia	M41L	T69_SS	L74V/I	V75AV/I/M	V75T	L100I	K103N	V106M/A	Q151M	Y181C	M184V/T	Y188L	G190A	L210W	T215Y	M230L
B	66	34 (51, 5%)	13 (38%)		3 (8%)	3 (8%)	1 (3%)		7 (20%)	1 (3%)	1 (3%)	6 (17%)	22 (64%)		2 (5%)	5 (14%)	16 (47%)	1 (3%)
CRF19_cpx	34	17 (50%)	3 (17%)			1 (6%)			3 (18%)			3 (18%)	17 (100%)	1 (6%)	1 (6%)	2 (11%)	5 (29%)	
C	16	7 (43, 7%)	2 (28%)		1 (14%)			1 (14%)	3 (43%)			1 (14%)	4 (57%)		1 (14%)	1 (14%)	2 (28%)	
B/G	13	4 (30, 7%)	2 (50%)		1 (25%)					1 (25%)			3 (75%)				24 (50%)	
CRF18_cpx	9	3											3					
G	9	7	4						3			1	4			1	4	
H	6	6				1			3			1	6					
A1	4	3											2		1		1	
B/CRF18_cpx	4	2	1									1	2			2	1	
B/CRF19_cpx	3	1		1									1			1	1	
CRF02/U	2	1											1					
CRF18/CRF19	2	2	2										2				1	
G/CRF18_cpx	2	1											1					
F1/U	1	1	1														1	
U	1	1										1						
B/F1	1	1							1			1					1	
F1	1	1										1			1		1	
H/U	1	0																
TOTAL 175		92/175 (52, 5%)	28/92 (30, 4%)	1 (1, 1%)	5/92 (5, 4%)	5/92 (5, 4%)	1 (1, 1%)	1 (1, 1%)	20/92 (21, 7%)	2/92 (2, 2%)	1 (1, 1%)	16/92 (17, 4%)	68/92 (74%)	1 (1, 1%)	6/92 (6, 5%)	12/92 (13%)	36/92 (39, 1%)	1 (1, 1%)

Fuente: Base de datos de Stanford

En nuestro estudio la mutación M184 se vio frecuentemente acompañada de la mutación T215Y. Sin embargo, se plantea que la introducción de la primera en el gen *pol* del VIH-1 restablece la susceptibilidad al AZT en aquellos virus que contienen las mutaciones M41L y T215Y (234). Además, la co-administración del AZT y el 3TC retrasa la emergencia de resistencia al AZT (162). En presencia de la M184V se requieren múltiples sustituciones o mutaciones en la TI del VIH-1 para alcanzar el mismo nivel de resistencia al AZT que mutaciones puntuales (como las TAMs) causarían en ausencia de la mutación seleccionada frente al 3TC. La mutación M184V se ha asociado con una reducción de la capacidad replicativa viral en células primarias, una disminución de la capacidad de procesamiento y un incremento en la fidelidad de la TI (235).

Las mutaciones en el gen que codifica para la TI asociadas con la resistencia al AZT, son bien conocidas, entre ellas aparecen aquellas que se dan en los codones 67 y 70 que incrementan la tasa de pirofosfolisis (236). Esta reacción es esencialmente una reversión de la síntesis de ADN que puede producir la eliminación del AZT, liberando, por tanto, el bloqueo que la incorporación de dicha molécula produce durante la retrotranscripción. A pesar de que un incremento en la pirofosfolisis sería ventajoso, también resultaría en una reducción global de la tasa de retrotranscripción. Las mutaciones en las posiciones 215 y 219 del gen *pol*, también relacionadas con resistencia al AZT, parecen compensar dicho efecto mediante un incremento en la tasa de polimerización de la TI. Estas dos propiedades complementarias pueden contribuir a explicar por qué pacientes con virus resistentes al AZT son también menos susceptibles a responder a tratamientos con otros ITIANs (237).

A pesar de que entre las mutaciones más frecuentemente detectadas por nosotros están la M184V y la T215Y, estos resultados no tuvieron implicaciones a corto plazo,

debido al hecho de que las muestras se tomaron 6 meses antes de su procesamiento. Los resultados demoraron en llegar porque este estudio se realizó fuera del país.

Las TAMs también conocidas como mutaciones asociadas a nucleósidos (del inglés, NAMs), que se dan en las posiciones 41, 67, 70, 210, 215 y 219 se seleccionan mayoritariamente en los virus de los pacientes que reciben regímenes que contienen AZT y D4T. Fueron descritas en sus inicios por su papel en la resistencia a AZT (237). De estas descritas nosotros detectamos en un número de virus la T215Y, que se corresponde con el uso del AZT en la terapia cubana y con el hecho de este antiviral es considerado de baja barrera genética.

Resultados similares a los encontrados por nosotros, son los estudios llevados a cabo en Brasil por Sucupira y cols. en el 2001 (238), Munerato y cols. (239), Rodríguez y cols. (240) y Couto-Fernández y cols. en el 2005 (241), que encuentran la mutación en el codón 184 (66%) con mayor frecuencia. Además, estos autores detectaron una alta frecuencia de las TAMs en los codones 41, 67, 70, 210, 215 y 219 de la secuencia del gen que codifica para la TI del VIH-1. Estas mutaciones variaron en cuanto a su grado de resistencia cruzada entre los ITIANs y son un obstáculo a la hora de elegir terapias de rescate capaces de controlar de forma efectiva la carga viral (225).

Los virus de pacientes con un prolongado uso de ITIANs acumulan a menudo mutaciones que confieren resistencia específica a los diferentes fármacos usados. Sin embargo, ocasionalmente el tratamiento con uno o dos ITIANs puede desembocar en la selección de virus con mutaciones de resistencia a prácticamente todos los inhibidores de esta familia actualmente disponibles. Entre las rutas descritas hasta ahora relacionadas con virus multiresistentes están: el complejo Q151M y la inserción 69 (237).

La primera (Q151M) implica la aparición de la mutación en esta posición seguida de la acumulación secuencial de mutaciones en otras cuatro posiciones (A62V, V75I, F77L,

F116Y), lo que deriva de virus multirresistentes a los ITIANs (242, 243). Estas mutaciones no aparecen en virus que contienen las mutaciones “clásicas” de resistencia al AZT (244, 245).

La segunda ruta (inserción 69) incluye una familia de inserciones de 6 nucleótidos extra, los cuales codifican dos nuevos residuos entre las posiciones 69 y 70. La capacidad replicativa de los virus que contienen la inserción 69 parece estar disminuida, pues esta mutación desaparece al cesar el tratamiento con los inhibidores de esta familia, para reaparecer de inmediato si el tratamiento es reinstaurado (246, 247).

Estas dos mutaciones que son de suma importancia por la implicación que tienen para el paciente, fueron detectadas en el 1.1% de los virus estudiados y se correspondía con pacientes que habían recibido terapias desde mucho antes del 2000, como ha sido descrito por la literatura (237).

Los ITINANs (NVP, EFV y DLV) son químicamente diferentes, a pesar de ello todas se unen al mismo sitio específico de la TI; por tanto no es sorprendente que mutaciones que confieran resistencia a una droga de esta clase confieran resistencias cruzadas al resto de los no análogos. (93, 248). La etravirina, un nuevo compuesto de esta clase, se produce actualmente a partir del conocimiento que se tiene de los antivirales de esta familia. Ella es capaz de actuar aún en presencia de mutaciones en el gen que codifica para la TI y que se seleccionan frente a los demás integrantes de esta familia (249). Es actualmente una alternativa cuando se presentan mutaciones que confieren resistencia al resto de los fármacos de esta familia de compuestos.

En el caso particular de la K103N su aparición está relacionada con la pérdida de la sensibilidad a los tres antivirales empleados en la terapia hasta el momento del estudio (91).

La monoterapia con NVP, selecciona con mayor frecuencia la mutación Y181C, que bloquea totalmente la unión del inhibidor a la enzima y está relacionada con la pérdida de la sensibilidad a la NVP y la DLV y en menor medida al EFV (250). Blanca y cols. en el 2003 mostraron que la Y181 puede además contribuir a aumentar la resistencia al D4T por dos mecanismos diferentes: incrementa la capacidad de la TI de discriminar entre el dTTP y el d4TTP e incrementa la eficiencia de la TI para eliminar los residuos d4TMP terminales (251).

Los valores encontrados en el presente trabajo están por debajo de los reportados por los países de área, posiblemente por el corto tiempo que llevaba implantada nuestra terapia en el momento del estudio. Rangel y cols. en el 2009, realizaron un estudio de prevalencia de resistencia en Venezuela en pacientes tratados (116) y observaron valores del 65% y el 38% de resistencia a los ITIANs y ITINANs respectivamente (252). Igualmente ocurre con la prevalencia descrita en Río de Janeiro, Brasil (79% para ITIANs, 55% para ITINANs y 45% para IPRs) (253, 254).

De la misma manera nuestros valores son menores que los publicados por Afani y cols. en un estudio realizado en Chile pero coincide en que los mayores valores de resistencia son a los ITIANs (70,7%). Seguidamente encontraron el grupo de los ITINANs con un 62,5% y de ellos la NVP alcanzó los valores más altos (62,3%) (255).

Europa, Estados Unidos, Canadá y otros países desarrollados comenzaron la terapia mucho antes que los países en vías de desarrollo, es por ello que los estudios que se han publicado en estos países han referidos valores más altos de mutaciones que confieren resistencia (230).

Al analizar la Figura 14 que muestra el total de pacientes a los que se les detectó virus resistentes a los ITI; observamos resistencias altas e intermedias a todos ITIANs e ITNAN, aprobados en el momento del estudio. Como muestra la gráfica el 3TC es el antiviral con mayores valores de resistencia, como era de esperar, ya que él está

presente en la combinación más empleada por la terapia cubana y es el más combinado de todos los ITIs que produce Cuba. La resistencia observada al FTC se debe a una resistencia cruzada conferida por la mutación M184V y debida a la similitud estructural entre ambos compuestos (256).

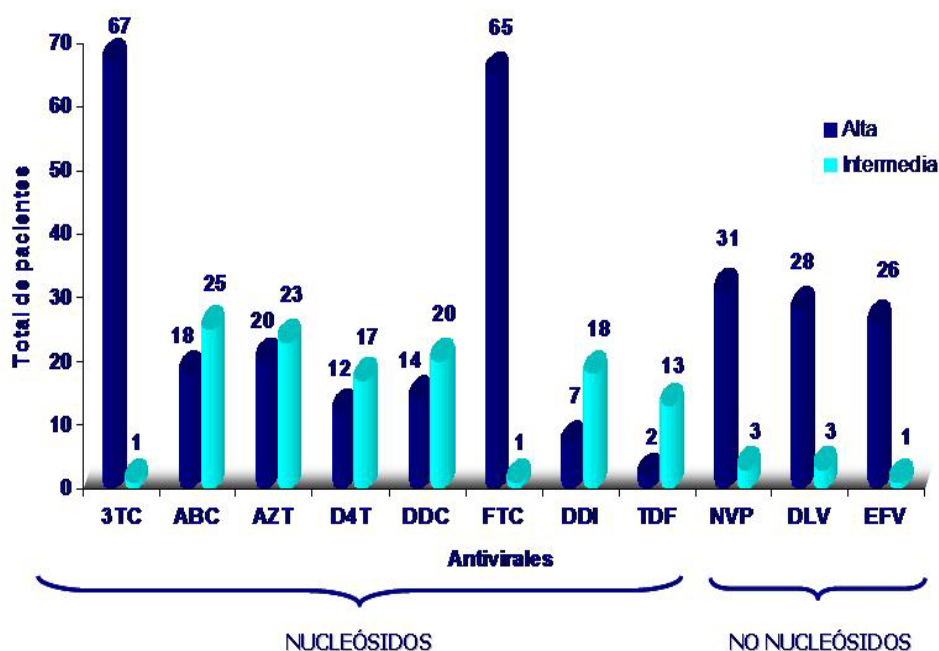


Figura 14 Total de pacientes que portan virus resistentes a los inhibidores de la transcriptasa inversa viral (análogos y no análogos de nucleósidos).

3TC-Lamivudina, ABC-Abacavir, AZT-Zidovudina, D4T-Estavudina, DDC-Zalcitabina, DDI-Didanosina, FTC-Emtricitabina, TDF-Tenofovir, NVP-Nevirapina, DLV-Delavirdina, EFV-Efavirenz.

Fuente: Historias clínicas, IPK

A continuación, los ITINANs muestran cifras muy similares de resistencia, lo que corresponde con el hallazgo de la mutación K103N y Y181C. Luego observamos valores muy bajos de resistencia al AZT, ABC, DDC y D4T, que en el caso del ABC, DDC y DDI pueden estar relacionados con la mutación M184V que también está implicada en la disminución de la susceptibilidad frente a ellos. La pérdida de la sensibilidad al AZT y D4T está relacionada con la mutación T215Y, frecuente en la muestra.

Similar a lo que acontece en el programa cubano (30), ocurre en la India. La primera línea de terapia de este programa está compuesta por dos ITIANs (AZT+3TC ó D4T+3TC) asociados con un ITINAN (EFV ó NVP). El 3TC es la droga más empleada,

seguida por el AZT, D4T, NVP, EFV y DDI. Los estudios realizados por Deshpande y col. muestran, al igual que el nuestro, como mutación más frecuente la M184V, en correspondencia con el mayor empleo del 3TC, seguida por las TAMs, relacionadas con el empleo del AZT y el D4T (257).

La Figura 15 muestra el total de pacientes que portan virus resistentes a los ARVs que produce Cuba y que se emplean en el tratamiento de los pacientes. Ellos fueron: NVP, 71,8%, 3TC 62,5%, AZT 32,3%, D4T 26,0%, DDI 17,8% e IDV 24,0%.

Los niveles de resistencia a las drogas correlacionan con el mayor empleo de la NVP y el 3TC en la terapéutica ARVs cubana. Las mutaciones en el gen que codifica para la TI descritas con anterioridad (M184v y K103N), se corresponden con las drogas empleadas, así como los niveles de resistencia con el uso de los mismos en el tratamiento de nuestros pacientes. Ambos antivirales, además, son considerados de baja barrera genética. Contrariamente a ello ocurre con la AZT, denominado de alta barrera genética (256).



Figura 15. Total de pacientes que portan virus resistentes a los antirretrovirales cubanos. 3TC-Lamivudina, AZT-Zidovudina, D4T-Estavudina, DDI-Didanosina, NVP-Nevirapina, IDV-Indinavir. Fuente: Historias clínicas, IPK

El IDV es el único de los IPRs producido por Cuba y utilizado en el momento del estudio. La resistencia alta e intermedia detectada en los virus amplificados fue del 24% a este inhibidor, lo que se corresponden con su uso limitado por la terapia cubana (Figura 15).

El D4T es de los fármacos producidos y empleados en la terapia cubana. Sin embargo la mutación K65R, que se ha descrito en pacientes tratados con este antiviral, no fue encontrada en nuestro estudio. Se le señala como responsable de la pérdida de la sensibilidad a la mayoría de los fármacos de la familia (258).

Panos y cols. en Grecia analizaron un total de 234 de pacientes infectados con VIH entre los años 1987-2004, y detectaron, igualmente, un alto porcentaje de las mutaciones anteriormente señaladas (259). Como podemos observar, y ha sido publicado por otros autores, estas mutaciones en el VIH-1 se seleccionan muy frecuentemente e implican la pérdida de la sensibilidad a algunos de los ITI (260, 261). Las mutaciones asociadas a resistencia a los IPRs se detectaron en 40 de 133 (30%) virus en pacientes tratados con IPRs.

Las sustituciones encontradas en el segmento del gen que codifica para la PR del VIH-1 se muestran en la Tabla 10. Las más frecuentes fueron:

- M46I in 22 de 40 (55,0%)
- V82A/T/F en 22 de 40 (55,0%)
- I54V/A/L en 14 de 40 (35,0%)
- L90M en 9 de 40 (22,5%)

A pesar de su pequeño tamaño la PR del VIH-1 puede tolerar una gran cantidad de mutaciones. Se han descrito al menos 42 mutaciones asociadas con resistencia a los IPRs en un total de 27 codones (262). Muchas de éstas mutaciones se localizan en el centro de unión al sustrato de la PR e interfieren directamente con la unión de los IPRs.

Otras se sitúan en regiones de la PR del VIH-1 diferentes al centro activo, modulando la actividad de la PR mutante sin afectar la unión del inhibidor (mutaciones primarias). Las primeras sustituciones se producen en aminoácidos específicos y originan sólo ligeras reducciones en la susceptibilidad a la droga. Sin embargo, luego se acumulan mutaciones adicionales que pueden generar variantes virales altamente resistentes. Estas mutaciones, también llamadas secundarias, suelen ser comunes para casi todos los IPRs y algunas de ellas coinciden con polimorfismos naturales observados en la PR del virus de inmunodeficiencia humana de pacientes que no han recibido tratamiento (196).

Las mutaciones en las posiciones 10, 20, 24, **46**, **54**, 63, 64, 71, **82**, 84 y **90** del gen que codifica para la PR están relacionadas con la disminución de la susceptibilidad viral a la droga (263, 264). De estas mutaciones descritas, las señaladas en negro en el texto fueron las más frecuentes en el estudio.

Se dice que no existe una secuencia preferencial de acumulación de mutaciones, ni una mutación característica que aparezca invariablemente en los aislamientos virales resistentes al IDV. La presencia de sustituciones en las posiciones 46 y 82 predice el desarrollo de resistencia, aunque no es suficiente. Parecen necesitar de un mínimo de cuatro mutaciones para observar niveles de resistencia respecto al virus salvaje (182).

Rangel y cols. encuentran una prevalencia de mutaciones de resistencia a los IPRs del 47% (252), así como una alta frecuencia de mutaciones secundarias en la PR del VIH-1, las que facilitan la emergencia de resistencia a los IPRs (225, 265). Coincidiendo con los resultados de este estudio, ellos observaron entre los codones más frecuentes, asociados con mutaciones primarias el 90 (25,5%), 46 (23,7%) y el 82 (21,1%). Aunque los porcentajes de Rangel y col. son mayores, la terapia tenía mayor tiempo de empleada y utilizan medicamentos de esta familia de forma más extensa.

Resistencia a las drogas antirretrovirales y diversidad genética del VIH-1 en Cuba

Tabla 10 Mutaciones en el VIH-1 asociadas con niveles de resistencia a los inhibidores de la proteasa en pacientes tratados.

Formas genéticas			Mutaciones en el segmento del gen que codifica para la PR del VIH-1									
			Mutaciones									
	Total	Resistencia	V32I	M46I/M/L	I47V	G48V	I50V	F53L	I54V/A/L	V82A/T/F	I84V	L90M
B	50	14 (28%)	1 (7%)	8 (57%)	1 (7%)	1 (7%)	1 (7%)		5 (36%)	7 (50%)	3 (21%)	5 (36%)
<u>CRF19_cpx</u>	23	5 (21, 8%)		2 (40%)						3 (60%)		1 (20%)
C	15	4 (26, 6%)		1 (24%)					2 (50%)	2 (50%)		1 (25%)
<u>CRF18_cpx</u>	9	1								1		
G	7	5		4			1		3	2	1	1
H	6	1		1		1		1	1	1		
B/G	5	2								2		
A1	3	2		2					1	2		
<u>CRF18/CRF19</u>	2	2		2					1	1		
F1/U	1	1		1								
U	1	1						1	1		1	
B/F1	1	1									1	1
F1	1	1					1					
H/U	1	1		1						1		
<u>B/CRF18_cpx</u>	4	0										
<u>B/CRF19_cpx</u>	2	0										
<u>CRF02/U</u>	1	0										
<u>G/CRF18_cpx</u>	1	0										
TOTAL 133		40/133 (30%)	1/40 (2, 5%)	22/40 (55%)	1/40 (2, 5%)	2/40 (5%)	3/40 (7%)	2/40 (5%)	14/40 (35%)	22/40 (55%)	6/40 (15%)	9/40 (22.5%)

Fuente: Base de datos de Stanford

La mutación en el codón 90 se desarrolla en aquellos virus de pacientes infectados con VIH-1, tratados con NFV y SQV, y causa resistencia a la mayoría de los IPRs. Las que se dan en la posición 46 de la PR, se observan cuando la terapia con cualquiera de los IPRs no es eficaz, y por tanto incrementa gradualmente los niveles de resistencia; mientras que aquellas que ocurren en la posición 82 se desarrollan desde el inicio en los virus de pacientes con una respuesta inadecuada al tratamiento con IDV y RTV (265).

Como se muestra en la Figura 16, se detectó resistencia (alta e intermedia) a todos los IPRs aunque ellos no se empleaban en la terapia en Cuba. La resistencia cruzada entre los diferentes IPRs es un tema complejo y la variedad de genotipos mutacionales seleccionados por los mismos hace difícil establecer con certeza posibles patrones de resistencia cruzada. Si observamos la Figura 16 veremos que el IPR al que más resistencia se desarrolló fue al NFV. Suponemos que además la resistencia cruzada, que se puede dar comúnmente cuando se trata a un paciente con un IPR, es posible que estemos detectando resistencia a este ARV derivada de tratamientos recibidos antes del 2001. Aquellos pacientes que recibían tratamiento antes de esta fecha utilizaron este medicamento.

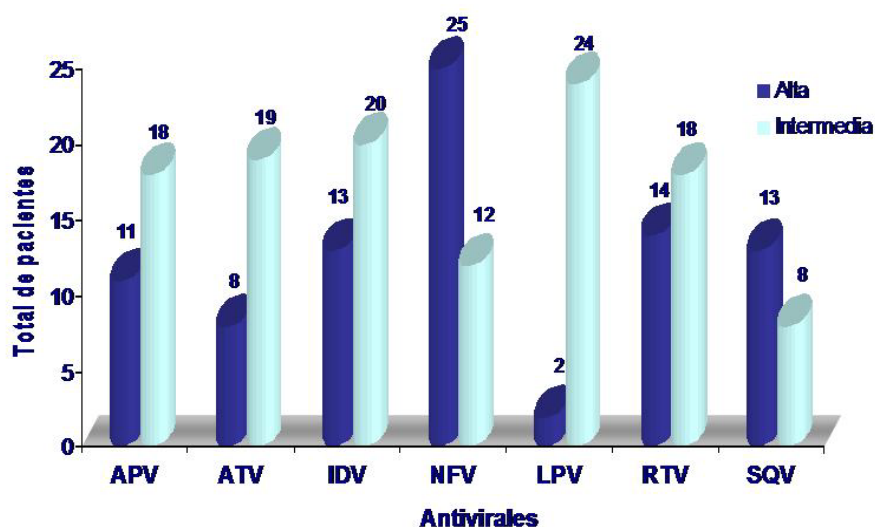


Figura 16 Total de pacientes que portan virus resistentes a los inhibidores de la proteasa viral. APV-Amprenavir, ATV-Atazanavir, IDV-Indinavir, NFV-Nelfinavir, LPV-Lopinavir, RTV-Ritonavir, SQV-Saquinavir. Fuente: Historias clínicas, IPK

Aun así, la literatura destaca que los residuos aminoacídicos en las posiciones 82, 84 y 90 de la PR (involucrados en la unión al sustrato) parecen ser importantes para la unión al SQV, RTV, IDV y APV. Los codones 82 (V82A/T/F) y 84 (I84V) están implicados en la unión al RTV y al IDV. Sin embargo, como las mutaciones en estas posiciones están descritas para los cuatro IPRs, se describe cierto grado de resistencia cruzada debido a las mismas (196).

Los resultados obtenidos hasta ahora indican que la terapia inicial con un IPRs puede comprometer la utilidad de tratamientos posteriores con otros IPRs. Es por ello muy importante conseguir un completo grado de adhesión a regímenes que supriman la viremia plasmática mediante la combinación IPR e ITI (266).

IV.2.2. Pacientes no tratados

El acceso universal a la terapia requiere además de un esfuerzo continuado por mantener una correcta adherencia, de una vigilancia continua de la prevalencia de cepas resistentes. El amplio uso de los agentes antivirales para el tratamiento de los pacientes infectados con el VIH-1 en países desarrollados ha ido acompañado de la emergencia de cepas resistentes, que ha dado como resultado una amplia población de ellas que se encuentran “disponibles” para establecer nuevas infecciones. En la última década ha sido implantada y expandida la terapia antiviral en países en vías de desarrollo donde los laboratorios para monitorear la misma no existen o son escasos. Ello crea una fuente potencial para la emergencia y transmisión de virus resistentes con una implicación directa en la efectividad de las opciones terapéuticas disponibles. El empleo de la terapéutica antiviral en países en vías de desarrollo requiere también de vigilar la emergencia y expansión de estas variantes resistentes (267).

La transmisión de variantes o cepas del VIH-1 resistentes a drogas a partir de personas sometidas a ARVs ha sido ampliamente discutida y ocurre por múltiples rutas, como: relaciones sexuales, UDIs y transmisión vertical de madre a hijo. Las personas con

diagnóstico reciente infectadas con cepas resistentes actúan como fuentes de transmisión de estas variantes (268-271).

La caracterización de la población VIH positiva de nuevo diagnóstico puede representar una herramienta útil para la vigilancia de resistencia primaria que es de crucial importancia para la salud pública tanto en países ricos como en aquellos con recursos limitados.

En el presente estudio se detectaron mutaciones asociadas a resistencia a los ITIs en 13 de 250 (5,2%) virus amplificados obtenidos de pacientes no tratados. Las sustituciones más frecuentemente detectadas en el segmento del gen que codifica para la TI del VIH-1 fueron: M41L, T215E/D/N/S y V179D (Tabla 11).

En el estudio realizado por Ruibal y cols. la prevalencia de mutaciones asociadas a resistencia a los ITIs fue del 7,4%, ligeramente superior a la nuestra, debido posiblemente al empleo en población tratada de una terapia no supresora (34). En este estudio la mayoría de los pacientes tratados usaban monoterapia, que no logra una disminución completa de la replicación viral, lo que provoca la aparición de mutaciones más rápidamente.

Es interesante destacar que encontramos en nuestro estudio altos niveles de resistencia, en un caso, a 3TC y FTC y niveles intermedios de resistencia, en otros cinco casos, a AZT, DDC, DLV y NVP (Tabla 11). La carencia de información en algunos casos de este estudio, no hizo posible un análisis objetivo para demostrar la posible transmisión de cepas resistentes. Este único paciente con resistencia alta, fue diagnosticado en el año 2003 y aunque los datos epidemiológicos no permiten confirmar el hecho, es posible que esta cepa resistente la haya adquirido de su contacto.

Otros países del área describen porcentaje de mutaciones similares a los nuestros, como el estudio de Lloyd y cols. llevado a cabo en Honduras. Ellos encuentran una

prevalencia de mutaciones de resistencia al VIH-1 a los ITIANs del 7,7%, en población no tratada, debido a la presencia de las mutaciones M184V y T215F/Y (6% y 3% respectivamente); mientras que a los ITINANs fue del 7,1% debido a la presencia de la mutación K103N (272).

Tuboi y cols. describen bajos niveles de resistencia (3%), incluso más bajos que los nuestros, pero en un tamaño poblacional menor. Entre las mutaciones por ellos detectadas en el gen *pol* estuvieron: 2 casos con la mutación K103N, 1 con la M41L, L210W y T215Y (273).

Las mutaciones en el gen *pol* asociadas a resistencia a los IPRs en el presente estudio se detectaron en 8 de 250 (3,2%) virus de pacientes que no habían recibido tratamiento antirretroviral; siendo las más frecuentes la L10I/O, K20I, M36I y V82I, que implicaban bajos niveles de resistencia al NFV (Tabla 11).

La Tabla 11 muestra que estas mutaciones se observan con mayor frecuencia en las URFs, lo que acentúa la necesidad de conocer el impacto que estas u otras sustituciones en las FRs pudieran tener, en la respuesta al tratamiento. Todos estos pacientes fueron diagnosticados con fechas entre 2000 y 2003, la mayoría de este último año (5/8), lo que se corresponde con lo descrito en la literatura sobre encontrar un mayor porcentaje de mutaciones en pacientes recientemente infectados que en aquellos crónicamente infectados (274, 275).

Tabla 11 Mutaciones en el gen *pol* del VIH-1 y resistencias a los inhibidores de la transcriptasa inversa y la proteasa viral en pacientes no-tratados.

Mutaciones (TI)					
Muestra	Formas genéticas del VIH-1	Mutación	Niveles de resistencia		
			Alta	Media	Baja
CB- 081	B	M41L+T215N		ZDV	ABC,D4T,TDF
CB- 329	B	V118I		ZDV	ABC,D4T, TDF
CB- 446	B	K238T		DLV, NVP	
CB- 526	B	M41L			ZDV
CB- 577	B	M41L+ V179D			ZDV
CB- 593	B	M41L+ V179D			ZDV
CB- 634	B	T215S			ZDV
CB- 091	<u>CRF19_cpx</u>	T215S			ZDV
CB- 485	<u>CRF19_cpx</u>	T69N		DDC	DDI
CB- 567	<u>CRF19_cpx</u>	T69S			DDC
CB- 618	<u>CRF19_cpx</u>	K70R+ T215D		ZDV	
CB- 229	<u>URF</u> (B/CRF18_cpx)	M184V	3TC,FTC		ABC, DDC
CB- 363	<u>URF</u> (BG)	T215E			ZDV
Mutaciones (PR)					
Muestra	Formas genéticas del VIH-1	Mutación	Niveles de resistencia		
			Alta	Media	Baja
CB- 127	G	V82I+K20I+M36I+L63P			NFV
CB- 348	<u>CRF19-cpx</u>	V82I+K20R+M36I+L63P			NFV
CB- 334	<u>URF</u> (BG)	V82I+L10I+K20I+M36I			NFV
CB- 520	<u>URF</u> (BG)	V82I+L10I+K20I+M36I			NFV
CB- 581	<u>URF</u> (BG)	V82I+L10I+K20I+M36I			NFV
CB- 582	<u>URF</u> (BG)	V82I+K20I+M36I+I93L			NFV
CB- 347	<u>URF</u> (BG)	K20I+M36I+D60E+L63P			NFV
CB- 460	<u>URF</u> (BG)	V82I+K20I+M36I+I93L			NFV

Fuente: Base de datos de Stanford.

La interpretación de las mutaciones en el VIH-1 asociadas a resistencias a IPRs ha ido cambiando en el tiempo lo que puede en parte explicar diferencias en los criterios definitorios de resistencias aún con los mismos patrones de mutaciones. En el momento en que se realizó y analizaron los resultados que estamos discutiendo, la acumulación de mutaciones secundarias en el gen que codifica para PR del VIH eran predictivas de una resistencia baja a los IPRs; sin embargo en la actualidad esta definición se basa en la presencia de mutaciones primarias en este gen. Este cambio en la literatura guarda más relación con lo acontecido con nuestros resultados.

En Cuba el inhibidor empleado en la terapia es el IDV y no habría una explicación clara para encontrar una resistencia baja al NFV, con excepción de que algunas de las mutaciones encontradas en los virus confirieran resistencia a ambos antivirales. También pudiera deberse al hecho de que algunos de estos pacientes fueran contactos de pacientes que recibieron terapia antes del 2001, momento en el que el NFV si fue empleado en la terapéutica.

En Europa y Estados Unidos donde la TAAE ha sido ampliamente usada por más de 15 años, la prevalencia de resistencia está en el rango del 10 al 27% (267, 276). En los países en vías de desarrollo, donde la terapia ha sido introducida recientemente, los estudios de prevalencia de resistencia son incompletos y se limitan a pocos, pequeños y aislados estudios (267). Se ha descrito una prevalencia que fluctúa del 0 al 6%.

Los estudios realizados en África y Asia muestran frecuentemente valores menores, justificados por el hecho de que los pacientes de estas regiones han sido expuestos a las drogas ARVs por períodos de tiempo relativamente más cortos (277-279).

Con el uso de las diferentes drogas ARVs en pacientes infectados con VIH-1, las variantes resistentes han aumentado a nivel mundial. En Europa y Estados Unidos alrededor del 10% de las infecciones recientes portan virus resistentes (280). En Canadá, en pacientes recientemente infectados, ésta prevalencia se incrementó del

5,5% entre 1995-1998 a 18,5% entre 1999-2000 y fue del 27,1% en el 2001. Entre los años 2003-2006 era alta en muchos países. En Suiza es del 5-11%, 10-17% en Francia, 13% en Alemania, 14% en Inglaterra, del 23-26% en España y del 15,4% en Argentina (274, 281, 282). Con la transmisión de cepas resistentes se están produciendo más variantes multirresistentes, siendo ésta una de las causas del fracaso a la terapia (226, 283) y es un gran reto a nivel mundial en el tratamiento de los pacientes VIH.

La prevalencia de la resistencia, detectable por los métodos habituales de secuenciación es normalmente mayor en pacientes no tratados con infección aguda (seroconversión) que en aquellos con infección establecida (crónica), debido en parte a una gradual disminución de las poblaciones resistentes, transmitida por la *cuasispecie* dominante, en el tiempo (267). Las poblaciones virales resistentes, transmitidas, pueden persistir años como *cuasispecies* dominantes en los ARNs presente en el plasma de pacientes y como resistencias archivadas en el ADN proviral de células mononucleares de sangre periférica (284, 285), lo que indica que pueden tener un impacto en la respuesta a la terapia antiviral a largo plazo (280).

Los estudios comentados con anterioridad, y nuestros resultados refuerzan la utilidad de los ensayos de resistencia y tienen una importante implicación en la selección de los regímenes de primera línea.

En la mayoría de los países europeos los ensayos para determinar resistencia a los ARVs en pacientes infectados con VIH-1 representan una herramienta importante en la práctica clínica. El panel europeo para el manejo de la resistencia a droga en pacientes infectados con VIH-1, ha hecho recomendaciones para el uso clínico de estos ensayos (286), sugiriendo su empleo en:

- Pacientes sin tratamiento con infección reciente o aguda.
- Mujeres embarazadas infectadas con VIH-1 y pacientes pediátricos con carga viral detectable cuando inician el tratamiento o se está considerando un cambio.
- Pacientes con mala respuesta a la terapia, incluyendo respuesta sub-óptima al tratamiento cuando se está considerando un cambio de tratamiento.
- Después de una exposición de riesgo cuando se considera emplear profilaxis.

Además este panel sugiere en población sin tratar con infección crónica, si se está considerando el comenzar el tratamiento, el empleo de los ensayos usando la primera muestra que se tenga si se supone que la resistencia es alta o la prevalencia de resistencia en la población está por encima del 10% (286).

IV.3. Mutaciones en el gen *pol* de las formas genéticas del VIH-1 más representativas y resistencia a los antirretrovirales

IV.3.1. Pacientes tratados

Los fármacos ARVs usados en el tratamiento de la infección por el VIH-1 se han venido desarrollando a partir de estudios biofísicos y bioquímicos llevados a cabo en virus del subtipo B (subtipo predominante en América del Norte y en el Oeste Europa). La mayoría de los datos de los mecanismos genéticos de la resistencia a droga provienen de observaciones realizadas en este subtipo; que representa el 12% de la pandemia del VIH. Sin embargo el subtipo C representa el 50% de la prevalencia de la infección y el 47% de las nuevas infecciones a nivel mundial (287). Desde hace unos años la terapia antirretroviral se introdujo en países en vías de desarrollo y por ende el número de personas con infecciones por virus no-B con acceso a la terapia se incrementó ampliamente. Este hecho ha motivado el análisis de las mutaciones en el VIH-1 que causan resistencia a los ARVs y se ha detectado, que estos cambios en los virus de pacientes con subtipo B, son los mismos que causan resistencia a los ARVs en los

virus de pacientes con otros subtipos (288). Se conoce que el VIH-2 y algunos VIH-1 del grupo O poseen resistencia intrínseca a los ITINANs (289, 290).

Teniendo en cuenta esto y la variedad de subtipos encontrados en la muestra se decidió hacer un estudio comparativo en cuanto al porcentaje de mutaciones que confieren resistencia entre los subtipos no-B más representativos (CRF19_cpx, CRF18_cpx, URF BG, subtipo C) y el subtipo B.

En el presente estudio se detectaron mutaciones asociadas a resistencias a los ITIs en 92 de 175 virus (52,5 %) en pacientes tratados, correspondiendo 34 de 66 (51,5 %) al subtipo B y 58 de 109 (53,2 %) a formas genéticas no B (Figura 17 y Tabla 9).

No se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) en el porcentaje de mutaciones que confieren resistencia a los ITIs entre las formas B y no-B más frecuentemente encontradas (Figura 17). Resultados similares reportó Ruibal y cols. (34), así como otros investigadores (41, 291-293) que muestran sustituciones similares en subtipo B y no-B, lo que sugiere que los diferentes subtipos y formas genéticas raramente afectan los patrones de mutaciones asociados con resistencia a drogas.

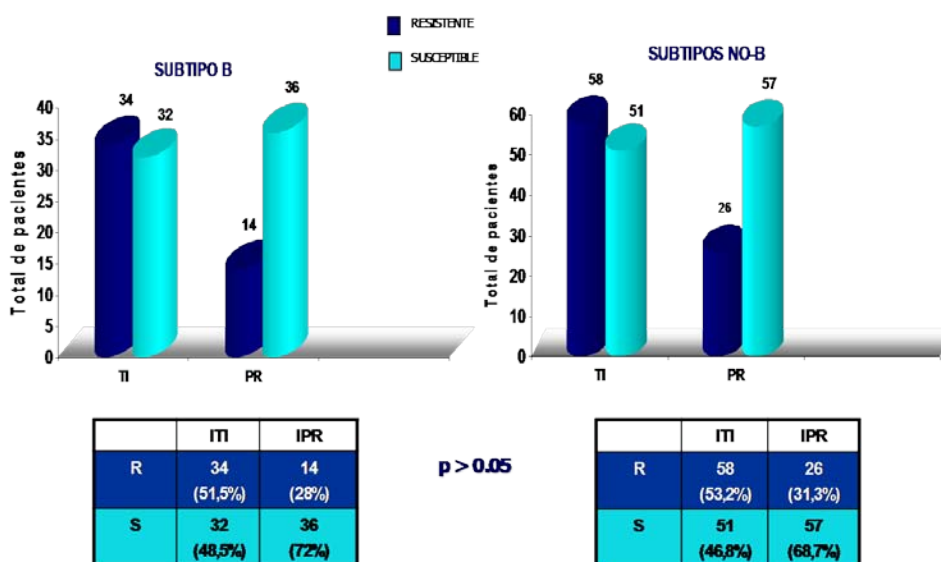


Figura 17 Porcentaje de mutaciones en el VIH-1 que confieren resistencia a los ITI (AN y NAN) y a los IPR en las formas genéticas virales más representativas. A la izquierda los porcentajes calculados para pacientes con subtipo B y a la derecha para subtipos No-B.
p calculada según la Prueba de McNemar

En el año 2005, Kantor y cols. estudiaron el impacto a nivel mundial de los diferentes subtipos de VIH en la terapia antirretroviral. Estos autores demostraron que la mayoría de las sustituciones en las posiciones asociadas con resistencia a drogas en virus del subtipo B se detectaron también en uno o más subtipos no-B (40, 41).

Además estos autores refieren algunas sustituciones características de subtipos o que se desarrollan frente a determinados antivirales. Entre ellas podemos citar la V106M, que comúnmente confiere resistencia a los ITINANs en los virus de pacientes con subtipo C tratados con EFV, mientras que la V106A se detecta en los virus de aquellos infectados con subtipo B. Mientras tanto, Taylor y cols. en el año 2008 comentaron el desarrollo de resistencia a los ITINANs a través de la K103N y V106M en el subtipo C, sin embargo el subtipo B desarrolló raramente la V106M. En el presente estudio la mutación en la posición 106, no se observó en ninguno de los virus estudiados; debido probablemente a que el EFV no se empleaba en la terapia cubana. Sin embargo, presentaban a la valina como codón polimórfico (GTG), lo que facilita la transición a V106M (40, 294, 295).

A pesar de que Cuba emplea el D4T dentro de los regímenes de primera línea, no encontramos en el actual estudio la mutación K65R, la cual se selecciona más rápidamente en los virus de pacientes infectados con subtipo C que con subtipo B (8).

Pérez-Álvarez y cols. en el año 2001 publicaron el primer estudio de detección de subtipo no-B en España, observando también una frecuencia similar de mutaciones primarias en la PR y la TI entre subtipo B y subtipos no-B, pero observaron algunas mutaciones secundarias en no-B más frecuentes que en B (230).

Es conocido que en Brasil circulan diferentes subtipos del VIH-1, de forma diferencial entre el norte (subtipos B y F) y el sur (subtipos B y C) del país. Lacerda y cols. en el año 2007, compararon la presencia de mutaciones de resistencia entre los subtipos B y

F (76,2% versus 23,8%), encontrando igual frecuencia de mutaciones en el que codifica para la TI y la PR entre ambos (296).

Si bien en nuestro estudio la frecuencia de mutaciones asociadas a resistencia en las CRF19-cpx y CRF-18_cpx fue similar a las encontradas en el subtipo B, se hallaron algunos polimorfismos característicos como, L122P y Q174K/E en CRF18_cpx y la E169D en CRF19_cpx. Kantor y cols. refieren otros polimorfismos característicos de subtipo en el gen de la TI, aunque ninguno de ellos coincidió con los señalados anteriormente (40). Hay que destacar sin embargo que las CRF 18 y 19 han sido originadas en nuestro país, y fueron descritas en el año 2005 (221, 297). El hallazgo de algunas FRs en Cuba, plantea la necesidad de profundizar en el conocimiento de las mismas.

Turner y cols. describieron algunos polimorfismos característicos de subtipos, pero expusieron que a pesar de las diferencias existentes entre los subtipos sólo algunos afectaron el patrón de mutaciones asociadas a resistencia (298).

En el actual estudio se detectaron mutaciones asociadas a resistencia a los IPRs en 40 de 133 virus (30%) en pacientes tratados con estos medicamentos, 14 de 50 (28%) correspondientes subtipo B y 26 de 83 (31,3%) a formas genéticas no-B (Figura 17 y Tabla 10).

Al igual que para los ITI, no se observaron diferencias significativas en la porcentaje de mutaciones asociadas a resistencia a los IPRs entre las formas B y no-B más frecuentes ($p>0.05$) (Figura 17).

En este estudio la frecuencia de algunas mutaciones secundarias asociadas con resistencia en el gen que codifica para la PR viral fue más alta en formas genéticas no-B que en el subtipo B. Ninguna de las muestras de la CRF18_cpx tenía mutaciones secundarias en las posiciones 63, 71, 77 y 93.

Se ha descrito que las mutaciones en la posición 63 y 77 son más frecuentes en subtipo B, mientras que las sustituciones en la 71 se presentan de un 5-10% de personas no tratadas infectadas con virus del subtipo B. Sin embargo, los cambios en la 93 son usuales en algunos subtipos no-B (196).

Las mutaciones secundarias de resistencia a los IPRs en el presente estudio, se encontraron con mayor frecuencia en las formas genéticas no-B que en las del subtipo B, y en particular la sustituciones K14R, K20I, M36I y L89M, se observaron en todos los CRF18_cpx, la L63P en CRF19_cpx y la I93L en 13 de 15 (86%) muestras del subtipo C. Estos cambios fueron frecuentes en las secuencias del subtipo C encontradas en la base de datos de la Universidad de Stanford. Sería necesario estudiar si tales sustituciones pueden reducir la actividad de algunos IPRs o pudieran ser básicas para la selección de otras mutaciones primarias de resistencia a los IPRs, algo aún pendiente de aclaración (299-302).

Los polimorfismos más frecuentes en la muestra estudiada fueron: L63P en subtipo B (64%), I93L en subtipo C (81%), M36I y L63P en CRF19-pcx (76 y 81 % respectivamente) y K20I y M36I en CRF18-cpx (100%).

Wu y cols. en el 2003 describieron la presencia de mutaciones en las posiciones 10, 20, 36 y 71, que ocurren entre un 5-10% en la secuencia de la PR de personas no tratadas del subtipo B, mientras que en la de los tratados se incrementan velozmente. Las mutaciones en la posiciones 10 y 71 aumentaron del 60 al 80%, mientras que en las posiciones 10 y 20 su frecuencia es del 30 al 40% en las secuencias al comparar ambos grupos. La posición 63, considerada una de las más polimórficas en la PR, presenta el aa L en los virus obtenidos de las personas no tratadas en un 54%, el aa P en otro 45% y otros residuos aminoacídicos en un 10% aproximadamente. Sin embargo, en los virus estudiados de pacientes tratados es frecuente encontrar en un

90% cualquier residuo, menos el L. Igualmente se describe el incremento de 25%, en los no tratados, a un 40% en tratados, en las posiciones 77 y 93 (303).

En algunos subtipos del VIH-1 las mutaciones en los codones (sitios polimórficos) 20, 36 y 93 ocurren con más frecuencia que en el subtipo B. Por el contrario las mutaciones en las posiciones 63 y 77 son más frecuentes en el subtipo B que en no-B (304, 305).

IV.3.2. Pacientes no tratados

En pacientes no tratados infectados con diferentes formas genéticas, la frecuencia de mutaciones asociadas a resistencia a los ITIs fue de 5,2%, de ellas 7 de 109 virus (6,4%) en el subtipo B y 6 de 141 (4,2%) en formas no-B (Tabla 11).

En un estudio internacional realizado entre los años 1996-2002, en 19 países europeos, que incluyó 2 208 pacientes de diagnóstico reciente y crónicamente infectados, se encontraron más variantes virales resistentes en los pacientes recientemente infectados que en los crónicamente infectados (13,5% contra 8,7%). Los virus con subtipos no-B presentaban una menor frecuencia de mutaciones de resistencia que los del subtipo B (4,8% contra 12,9%), probablemente por la larga exposición de los virus B a las drogas en los países europeos estudiados (274, 275).

En el presente estudio los pacientes con mutaciones de resistencia correspondieron en su mayoría a pacientes diagnosticados entre los años 2000 al 2003 (10/13), no encontrando diferencias entre las diversas formas y el tiempo de infección. Teniendo en cuenta que Cuba exhibe una variedad de subtipos, presentes en la epidemia desde sus inicios, este comportamiento es el esperado. Igualmente el hecho de detectar la mayoría de las mutaciones en pacientes con menos de 3 años de diagnóstico.

Las mutaciones asociadas a resistencia a los IPRs fueron detectadas en 8 de 250 (3,2%) virus en pacientes que no habían recibido tratamiento antirretroviral, todos los casos en formas genéticas no-B (8 de 141 (5,6%)); la mayoría de ellos (6 de 8) en

URFs BG. En todos los casos estos pacientes tenían menos de dos años de diagnosticados (Tabla 11).

Entre las mutaciones secundarias en las diferentes formas genéticas observadas en este estudio, destacan: V82I, K20I, M36I, L63P, K20R, L10I, I93L y D60E. Todas, menos la V82I, son sitios polimórficos en la PR del VIH-1 que contribuyen a la resistencia pero solamente en combinación con mutaciones relacionadas con resistencia en posiciones no polimórficas (196).

La V82I ocurre en el 1% de los virus de los pacientes no tratados con subtipo B y entre un 5-10% de aquellos con subtipos no-B. Raramente emerge durante las terapias con IPRs y confiere resistencia baja (196).

La detección de mutaciones en el VIH-1 asociadas a resistencia a los ITIs y los IPRs, en pacientes no tratados, incluyendo la presencia de algunas mutaciones secundarias de resistencia a los IPRs, sugiere la utilidad de los estudios de resistencia antes del comienzo de la terapia en aquellos países con una prevalencia de mutaciones por encima del 10%. Además se plantea que estos estudios pueden ser implementados para llevar a cabo una vigilancia epidemiológica que permitan conocer la frecuencia de transmisión de cepas resistentes y su evolución en el tiempo (196).

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES

- El subtipo B es la forma genética del VIH-1 que presenta la mayor prevalencia en la población estudiada, sin embargo los subtipos no B y las formas recombinantes del VIH-1 en su conjunto son mayoría.
- Los recombinantes BG se han expandido recientemente en Cuba mayoritariamente entre hombres que tienen sexo con hombres, y se esboza la existencia de tres nuevas formas recombinantes BG.
- Se encuentra asociación de algunas formas recombinantes únicas y subgrupos del VIH-1 que circulan diferencialmente entre hombres que tienen sexo con hombres y en heterosexuales. Además se identifican formas recombinantes circulantes que se distribuyen preferencialmente en la región central y oriental de Cuba.
- Los niveles de resistencia a las drogas ARVs están en correspondencia con los medicamentos más frecuentemente empleados en la terapia cubana.
- El porcentaje de mutaciones que confieren resistencia a los antirretrovirales empleados en Cuba no está relacionado con las variantes virales.

CAPÍTULO VI. RECOMENDACIONES

- Implementar en Cuba las pruebas genotípicas de resistencia antirretroviral, lo que ayudaría a los clínicos a la elección de una mejor opción terapéutica en cada momento.
- Mantener una vigilancia epidemiológica estrecha en la población VIH-1 no tratada, con el objetivo de conocer la circulación de cepas resistentes.
- Realizar estudios de genoma completo del VIH, para profundizar en el conocimiento de los subtipos y recombinantes que circulan y su repercusión en el desarrollo de resistencias, terapéutica, virulencia, transmisión y ensayos de vacuna.

CAPÍTULO VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Freed EO, Martin MA. HIVs and Their Replication. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. 5th ed: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 2108-85.
2. Domingo E. Quasispecies and the implications for virus persistence and escape. *Clin Diagn Virol*. 1998 Jul 15;10(2-3):97-101.
3. Domingo E, Baranowski E, Ruiz-Jarabo CM, Martin-Hernandez AM, Saiz JC, Escarmis C. Quasispecies structure and persistence of RNA viruses. *Emerg Infect Dis*. 1998 Oct-Dec;4(4):521-7.
4. Clavel F, Hoggan MD, Willey RL, Strebel K, Martin MA, Repaske R. Genetic recombination of human immunodeficiency virus. *J Virol*. 1989 Mar;63(3):1455-9.
5. Hu WS, Temin HM. Retroviral recombination and reverse transcription. *Science*. 1990 Nov 30;250(4985):1227-33.
6. Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA, Carr JK, Foley B, Funkhouser RK, et al. HIV-1 nomenclature proposal. *Science*. 2000 Apr 7;288(5463):55-6.
7. Plantier JC, Leoz M, Dickerson JE, De Oliveira F, Cordonnier F, Lemee V, et al. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat Med*. 2009 Aug;15(8):871-2.
8. Taylor BS, Sobieszczyk ME, McCutchan FE, Hammer SM. The challenge of HIV-1 subtype diversity. *N Engl J Med*. 2008 Apr 10;358(15):1590-602.
9. Barroso H, Taveira N. Evidence for negative selective pressure in HIV-2 evolution in vivo. *Infect Genet Evol*. 2005 Apr;5(3):239-46.
10. HIV Sequence Database. Los Alamos, NM: Los Alamos National Laboratory [database on the Internet]. 2009 [cited October 9, 2009]. Available from: <http://www.hiv.lanl.gov/content/hiv-db/mainpage.html>.
11. Buckheit RW, Jr., Fliakas-Boltz V, Decker WD, Roberson JL, Stup TL, Pyle CA, et al. Comparative anti-HIV evaluation of diverse HIV-1-specific reverse transcriptase inhibitor-resistant virus isolates demonstrates the existence of distinct phenotypic subgroups. *Antiviral Res*. 1995 Mar;26(2):117-32.
12. Thomson MM, Najera R. Molecular epidemiology of HIV-1 variants in the global AIDS pandemic: an update. *AIDS Rev*. 2005 Oct-Dec;7(4):210-24.
13. UNAIDS. 2010 [updated 2010; cited January 6, 2010]; Available from: <http://www.unaids.org>.
14. Friedland G. FDA approves d4T as alternative to AZT, ddI, or ddC. Food and Drug Administration. *AIDS Clin Care*. 1995 Jan;7(1):4, 10.
15. Hoffman C. HIV Medicine 2005. 2005 [cited. Available from: www.HIVMedicine.com].
16. Clotet B, Menendez-Arias L, Schapiro JM, Kuritzkes D, Burger D, Telenti A, et al. *Guide to Management of HIV Drug Resistance, Antiretrovirals Pharmacokinetics and Viral Hepatitis Infected Subjects*. Badalona, Catalonia, España; 2008.
17. Clotet B, Gatell JM. Introducción de los test de resistencia al VIH en la práctica clínica. In: Entheos GE, editor. *Guía práctica para el manejo clínico de las resistencias al VIH*. 1ra ed. Madrid: Meck Sharp & Dohme de España, S.A.; 1999. p. 15-29.
18. Van Laethem K, Witvrouw M, Pannecouque C, Van Remoortel B, Schmit JC, Esnouf R, et al. Mutations in the non-nucleoside binding-pocket interfere with the multi-nucleoside resistance phenotype. *Aids*. 2001 Mar 30;15(5):553-61.

19. Ross LL, Parkin N, Gerondelis P, Chappey C, Underwood MR, St Clair MH, et al. Differential impact of thymidine analogue mutations on emtricitabine and lamivudine susceptibility. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2006 Dec 15;43(5):567-70.
20. Wilson JW. Update on antiretroviral drug resistance testing: combining laboratory technology with patient care. *AIDS Read*. 2003 Jan;13(1):25-30, 5-8.
21. Soriano V, Briones C. [Incorporation of the test of resistance to antiretroviral drugs in clinical practice]. *Med Clin (Barc)*. 1999 Mar 27;112(11):412-5.
22. Soriano V, Briones C, Gomez-Cano M, Perez-Olmeda M, de Mendoza C. Resistencia a los farmacos antirretroviricos. In: IDEPSA, editor. *Manual del SIDA*. Barcelona; 1999. p. 739-52.
23. Taylor S, Jayasuriya A, Smit E. Using HIV resistance tests in clinical practice. *J Antimicrob Chemother*. 2009 Aug;64(2):218-22.
24. Badri SM, Adeyemi OM, Max BE, Zagorski BM, Barker DE. How does expert advice impact genotypic resistance testing in clinical practice? *Clin Infect Dis*. 2003 Sep 1;37(5):708-13.
25. Betts BJ, Shafer RW. Algorithm specification interface for human immunodeficiency virus type 1 genotypic interpretation. *J Clin Microbiol*. 2003 Jun;41(6):2792-4.
26. Shafer RW, Schapiro JM. Drug resistance and antiretroviral drug development. *J Antimicrob Chemother*. 2005 Jun;55(6):817-20.
27. Stanford Database [database on the Internet]. 2004 [cited. Available from: <http://hivdb.stanford.edu/>].
28. Brun-Vezinet F, Costagliola D, Khaled MA, Calvez V, Clavel F, Clotet B, et al. Clinically validated genotype analysis: guiding principles and statistical concerns. *Antivir Ther*. 2004 Aug;9(4):465-78.
29. Shafer R. Genotypic Testing for HIV-1 Drug Resistance. 2004 [cited. Available from: <http://hivinsite.ucsf.edu>].
30. Perez J, Perez D, Gonzalez I, Diaz Jidy M, Orta M, Aragonés C, et al. Approaches to the management of HIV-AIDS in Cuba. 2004.
31. Rolo FM, Miranda L, Wainberg MA, Gu Z, Lobaina L, Noa E, et al. Envelope V3 region sequences of Cuban HIV-1 isolates. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*. 1995 Jun 1;9(2):123-5.
32. Gomez CE, Iglesias E, Perdomo W, Rolo F, Blanco M, Lobaina L, et al. Isolates from four different HIV type 1 clades circulating in Cuba identified by DNA sequence of the C2-V3 region. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2001 Jan 1;17(1):55-8.
33. Cuevas MT, Ruibal I, Villahermosa ML, Diaz H, Delgado E, Parga EV, et al. High HIV-1 genetic diversity in Cuba. *Aids*. 2002 Aug 16;16(12):1643-53.
34. Ruibal-Brunet IJ, Cuevas MT, Diaz-Torres H, Villahermosa ML, Noa-Romero E, Vazquez de Parga E, et al. Genotypic resistance mutations to antiretroviral drugs in HIV-1 B and non-B subtypes from Cuba. *Rev Panam Salud Publica*. 2001 Sep;10(3):174-80.
35. Blanco M, Rolo F, Martínez N, Gessa A, Díaz HM, Lubian AL. Aplicación del ensayo de Movilidad del Heteroduplex en los estudios de epidemiología molecular del VIH-1 en Cuba. *Biotecnología Aplicada* 2001;18:149-53.
36. Cerqueira DM, Amorim RM, Silva RR, Camara GN, Brigido MM, Martins CR. Antiretroviral resistance and genetic diversity of human immunodeficiency virus type 1 isolates from the Federal District, Central Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004 Dec;99(8):877-82.
37. Yirell DL, Shaw L, Burns SM, Cameron SO, Quigg M, Campbell E, et al. HIV-1 subtype in Scotland: the establishment of a national surveillance system. *Epidemiol Infect*. 2004 Aug;132(4):693-8.

38. Montano SM, Sanchez JL, Laguna-Torres A, Cuchi P, Avila MM, Weissenbacher M, et al. Prevalences, genotypes, and risk factors for HIV transmission in South America. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2005 Sep 1;40(1):57-64.
39. Segura M, Sosa Estani S, Marone R, Bautista CT, Pando MA, Eyzaguirre L, et al. Buenos Aires cohort of men who have sex with men: prevalence, incidence, risk factors, and molecular genotyping of HIV type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2007 Nov;23(11):1322-9.
40. Kantor R, Shafer RW, Katzenstein D. The HIV-1 Non-subtype B Workgroup: an international collaboration for the collection and analysis of HIV-1 non-subtype B data. *MedGenMed*. 2005;7(1):71.
41. Kantor R, Katzenstein DA, Efron B, Carvalho AP, Wynhoven B, Cane P, et al. Impact of HIV-1 subtype and antiretroviral therapy on protease and reverse transcriptase genotype: results of a global collaboration. *PLoS Med*. 2005 Apr;2(4):e112.
42. Bernhard W. The detection and study of tumor viruses with the electron microscope. *Cancer Res*. 1960 Jun;20:712-27.
43. Vogt G, Woell S, Argos P. Protein thermal stability, hydrogen bonds, and ion pairs. *J Mol Biol*. 1997 Jun 20;269(4):631-43.
44. Maddon PJ, Dalgleish AG, McDougal JS, Clapham PR, Weiss RA, Axel R. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell*. 1986 Nov 7;47(3):333-48.
45. Vogt PK, Li J, Freyaldenhoven BS. Revelations of a captive: retroviral Qin and the oncogenicity of winged helix proteins. *Virology*. 1997 Nov 10;238(1):1-7.
46. Himathongkham S, Luciw PA. Restriction of HIV-1 (subtype B) replication at the entry step in rhesus macaque cells. *Virology*. 1996 May 15;219(2):485-8.
47. Najera R, Delgado E, Perez-Alvarez L, Thomson MM. Genetic recombination and its role in the development of the HIV-1 pandemic. *AIDS*. 2002;16 Suppl 4:S3-16.
48. Valsamakis A, Zeichner S, Carswell S, Alwine JC. The human immunodeficiency virus type 1 polyadenylation signal: a 3' long terminal repeat element upstream of the AAUAAA necessary for efficient polyadenylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Mar 15;88(6):2108-12.
49. Haseltine WA, Wong-Staal F. The molecular biology of the AIDS virus. *Sci Am*. 1988 Oct;259(4):52-62.
50. Haseltine WA. Replication and pathogenesis of the AIDS virus. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 1988;1(3):217-40.
51. Dalgleish AG, Beverley PC, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature*. 1984 Dec 20-1985 Jan 2;312(5996):763-7.
52. Moore JP. Coreceptors: implications for HIV pathogenesis and therapy. *Science*. 1997 Apr 4;276(5309):51-2.
53. Moore JP, Trkola A, Dragic T. Co-receptors for HIV-1 entry. *Curr Opin Immunol*. 1997 Aug;9(4):551-62.
54. Chan DC, Chutkowski CT, Kim PS. Evidence that a prominent cavity in the coiled coil of HIV type 1 gp41 is an attractive drug target. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Dec 22;95(26):15613-7.
55. Chan DC, Kim PS. HIV entry and its inhibition. *Cell*. 1998 May 29;93(5):681-4.
56. Bowerman B, Brown PO, Bishop JM, Varmus HE. A nucleoprotein complex mediates the integration of retroviral DNA. *Genes Dev*. 1989 Apr;3(4):469-78.
57. Heinzinger NK, Bukinsky MI, Haggerty SA, Ragland AM, Kewalramani V, Lee MA, et al. The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear

- localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Jul 19;91(15):7311-5.
58. Pantaleo G, Graziosi C, Demarest JF, Butini L, Montroni M, Fox CH, et al. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature*. 1993 Mar 25;362(6418):355-8.
59. Skolnik PR, Kosloff BR, Hirsch MS. Bidirectional interactions between human immunodeficiency virus type 1 and cytomegalovirus. *J Infect Dis*. 1988 Mar;157(3):508-14.
60. Tong-Starksen SE, Welsh TM, Peterlin BM. Differences in transcriptional enhancers of HIV-1 and HIV-2. Response to T cell activation signals. *J Immunol*. 1990 Dec 15;145(12):4348-54.
61. Greene WC. The molecular biology of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med*. 1991 Jan 31;324(5):308-17.
62. Cullen BR. The HIV-1 Tat protein: an RNA sequence-specific processivity factor? *Cell*. 1990 Nov 16;63(4):655-7.
63. Cullen BR. Does HIV-1 Tat induce a change in viral initiation rights? *Cell*. 1993 May 7;73(3):417-20.
64. Cullen BR. HIV-1 auxiliary proteins: making connections in a dying cell. *Cell*. 1998 May 29;93(5):685-92.
65. Freed EO, Martin A. HIVs and Their Replication. In: Knipe D, Howley P, editors. *Fields Virology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 2108-87.
66. Ferrari G, Ottinger J, Place C, Nigida SM, Jr., Arthur LO, Weinhold KJ. The impact of HIV-1 infection on phenotypic and functional parameters of cellular immunity in chimpanzees. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1993 Jul;9(7):647-56.
67. Domingo E, Escarmis C, Sevilla N, Baranowski E. Population dynamics in the evolution of RNA viruses. *Adv Exp Med Biol*. 1998;440:721-7.
68. Holland JJ, De La Torre JC, Steinhauer DA. RNA virus populations as quasispecies. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1992;176:1-20.
69. Domingo E. Rapid evolution of viral RNA genomes. *J Nutr*. 1997 May;127(5 Suppl):958S-61S.
70. Domingo E, Holland JJ. RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu Rev Microbiol*. 1997;51:151-78.
71. Soriano V, Briones C, Gomez-Cano M, Perez-Olmeda M, de Medndoza C. Resistencia a los farmacos antirretroviricos. In: Soriano V, Gonzalez-Lahoz J, editors. *Manual del SIDA: IDEPSA*; 1999. p. 739-52.
72. Osmanov S, Pattou C, Walker N, Schwardlander B, Esparza J. Estimated global distribution and regional spread of HIV-1 genetic subtypes in the year 2000. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2002 Feb 1;29(2):184-90.
73. Kellam P, Larder BA. Retroviral recombination can lead to linkage of reverse transcriptase mutations that confer increased zidovudine resistance. *J Virol*. 1995 Feb;69(2):669-74.
74. Moutouh L, Corbeil J, Richman DD. Recombination leads to the rapid emergence of HIV-1 dually resistant mutants under selective drug pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Jun 11;93(12):6106-11.
75. Domingo E, Menendez-Arias L, Holland JJ. RNA virus fitness. *Rev Med Virol*. 1997 Jul;7(2):87-96.
76. Peeters M, Sharp PM. Genetic diversity of HIV-1: the moving target. *AIDS*. 2000;14 Suppl 3:S129-40.
77. McCutchan FE. Global epidemiology of HIV. *J Med Virol*. 2006;78 Suppl 1:S7-S12.

78. Blanco M, Martínez N, Díaz HM, Lubián AL, Romay D, Regalado L. Detección de nuevos subtipos y formas recombinantes del VIH-1 en Cuba mediante el ensayo de movilidad del heteroduplex env / gag. *Rev Latinoamericana de Microbiología*. 2002;44(4):0034-9771.
79. Volberding PA, Lagakos SW, Koch MA, Pettinelli C, Myers MW, Booth DK, et al. Zidovudine in asymptomatic human immunodeficiency virus infection. A controlled trial in persons with fewer than 500 CD4-positive cells per cubic millimeter. The AIDS Clinical Trials Group of the National Institute of Allergy and Infectious Diseases. *N Engl J Med*. 1990 Apr 5;322(14):941-9.
80. Fischl MA, Richman DD, Hansen N, Collier AC, Carey JT, Para MF, et al. The safety and efficacy of zidovudine (AZT) in the treatment of subjects with mildly symptomatic human immunodeficiency virus type 1 (HIV) infection. A double-blind, placebo-controlled trial. The AIDS Clinical Trials Group. *Ann Intern Med*. 1990 May 15;112(10):727-37.
81. Hammer SM, Kessler HA, Saag MS. Issues in combination antiretroviral therapy: a review. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 1994;7 Suppl 2:S24-35; discussion S-7.
82. Hammer SM, Yeni P. Antiretroviral therapy: where are we? *Aids*. 1998;12 Suppl A:S181-8.
83. Hammer SM. Advances in antiretroviral therapy and viral load monitoring. *AIDS*. 1996 Dec;10 Suppl 3:S1-11.
84. Hammer SM, Katzenstein DA, Hughes MD, Gundacker H, Schooley RT, Haubrich RH, et al. A trial comparing nucleoside monotherapy with combination therapy in HIV-infected adults with CD4 cell counts from 200 to 500 per cubic millimeter. AIDS Clinical Trials Group Study 175 Study Team. *N Engl J Med*. 1996 Oct 10;335(15):1081-90.
85. Cameron DW, Heath-Chiozzi M, Danner S, Cohen C, Kravcik S, Maurath C, et al. Randomised placebo-controlled trial of ritonavir in advanced HIV-1 disease. The Advanced HIV Disease Ritonavir Study Group. *Lancet*. 1998 Feb 21;351(9102):543-9.
86. Carpenter CC, Cooper DA, Fischl MA, Gatell JM, Gazzard BG, Hammer SM, et al. Antiretroviral therapy in adults: updated recommendations of the International AIDS Society-USA Panel. *Jama*. 2000 Jan 19;283(3):381-90.
87. Sarafianos SG, Das K, Ding J, Boyer PL, Hughes SH, Arnold E. Touching the heart of HIV-1 drug resistance: the fingers close down on the dNTP at the polymerase active site. *Chem Biol*. 1999 May;6(5):R137-46.
88. Larder BA, Stammers DK. Closing in on HIV drug resistance. *Nat Struct Biol*. 1999 Feb;6(2):103-6.
89. Lavie A, Schlichting I, Vetter IR, Konrad M, Reinstein J, Goody RS. The bottleneck in AZT activation. *Nat Med*. 1997 Aug;3(8):922-4.
90. Robbins BL, Srinivas RV, Kim C, Bischofberger N, Fridland A. 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*. 1998 Mar;42(3):612-7.
91. Hsiou Y, Ding J, Das K, Clark AD, Jr., Boyer PL, Lewi P, et al. The Lys103Asn mutation of HIV-1 RT: a novel mechanism of drug resistance. *J Mol Biol*. 2001 Jun 1;309(2):437-45.
92. Spence RA, Anderson KS, Johnson KA. HIV-1 reverse transcriptase resistance to nonnucleoside inhibitors. *Biochemistry*. 1996 Jan 23;35(3):1054-63.
93. Esnouf RM, Ren J, Hopkins AL, Ross CK, Jones EY, Stammers DK, et al. Unique features in the structure of the complex between HIV-1 reverse transcriptase

- and the bis(heteroaryl)piperazine (BHAP) U-90152 explain resistance mutations for this nonnucleoside inhibitor. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Apr 15;94(8):3984-9.
94. Smerdon SJ, Jager J, Wang J, Kohlstaedt LA, Chirino AJ, Friedman JM, et al. Structure of the binding site for nonnucleoside inhibitors of the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Apr 26;91(9):3911-5.
95. Kohlstaedt LA, Wang J, Friedman JM, Rice PA, Steitz TA. Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. Science. 1992 Jun 26;256(5065):1783-90.
96. Esnouf R, Ren J, Ross C, Jones Y, Stammers D, Stuart D. Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by non-nucleoside inhibitors. Nat Struct Biol. 1995 Apr;2(4):303-8.
97. Milinkovic A, Martinez E. Nevirapine in the treatment of HIV. Expert Rev Anti Infect Ther. 2004 Jun;2(3):367-73.
98. Tozzi V, Zaccarelli M, Narciso P, Trotta MP, Ceccherini-Silberstein F, De Longis P, et al. Mutations in HIV-1 reverse transcriptase potentially associated with hypersusceptibility to nonnucleoside reverse-transcriptase inhibitors: effect on response to efavirenz-based therapy in an urban observational cohort. J Infect Dis. 2004 May 1;189(9):1688-95.
99. Johnson LB, Saravolatz LD. Etravirine, a next-generation nonnucleoside reverse-transcriptase inhibitor. Clin Infect Dis. 2009 Apr 15;48(8):1123-8.
100. Gulnik SV, Suvorov LI, Liu B, Yu B, Anderson B, Mitsuya H, et al. Kinetic characterization and cross-resistance patterns of HIV-1 protease mutants selected under drug pressure. Biochemistry. 1995 Jul 25;34(29):9282-7.
101. Debouck C. The HIV-1 protease as a therapeutic target for AIDS. AIDS Res Hum Retroviruses. 1992 Feb;8(2):153-64.
102. Navia MA, Fitzgerald PM, McKeever BM, Leu CT, Heimbach JC, Herber WK, et al. Three-dimensional structure of aspartyl protease from human immunodeficiency virus HIV-1. Nature. 1989 Feb 16;337(6208):615-20.
103. Zennou V, Mammano F, Paulous S, Mathez D, Clavel F. Loss of viral fitness associated with multiple Gag and Gag-Pol processing defects in human immunodeficiency virus type 1 variants selected for resistance to protease inhibitors in vivo. J Virol. 1998 Apr;72(4):3300-6.
104. Leonard JT, Roy K. The HIV entry inhibitors revisited. Curr Med Chem. 2006;13(8):911-34.
105. Starr-Spires LD, Collman RG. HIV-1 entry and entry inhibitors as therapeutic agents. Clin Lab Med. 2002 Sep;22(3):681-701.
106. Wolf E. HIV Medicine 2005. 2005 [cited. Available from: www.HIVMedicine.com].
107. Eckert DM, Malashkevich VN, Hong LH, Carr PA, Kim PS. Inhibiting HIV-1 entry: discovery of D-peptide inhibitors that target the gp41 coiled-coil pocket. Cell. 1999 Oct 1;99(1):103-15.
108. Lu J, Sista P, Giguel F, Greenberg M, Kuritzkes DR. Relative replicative fitness of human immunodeficiency virus type 1 mutants resistant to enfuvirtide (T-20). J Virol. 2004 May;78(9):4628-37.
109. Wheeler DA, Lalezari JP, Kilby JM, Wheat J, Delehanty J, DeMasi R, et al. Safety, tolerability, and plasma pharmacokinetics of high-strength formulations of enfuvirtide (T-20) in treatment-experienced HIV-1-infected patients. J Clin Virol. 2004 Jun;30(2):183-90.
110. Schooley RT, Merigan TC, Gaut P, Hirsch MS, Holodniy M, Flynn T, et al. Recombinant soluble CD4 therapy in patients with the acquired immunodeficiency

syndrome (AIDS) and AIDS-related complex. A phase I-II escalating dosage trial. *Ann Intern Med.* 1990 Feb 15;112(4):247-53.

111. Daar ES, Li XL, Moudgil T, Ho DD. High concentrations of recombinant soluble CD4 are required to neutralize primary human immunodeficiency virus type 1 isolates. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Sep;87(17):6574-8.

112. Jacobson JM, Lowy I, Fletcher CV, O'Neill TJ, Tran DN, Ketas TJ, et al. Single-dose safety, pharmacology, and antiviral activity of the human immunodeficiency virus (HIV) type 1 entry inhibitor PRO 542 in HIV-infected adults. *J Infect Dis.* 2000 Jul;182(1):326-9.

113. Shearer MH, Dalgleish AG, Chanh TC, Kennedy RC. Idiotypic cascades associated with the CD4-HIV glycoprotein 120 interaction: immunization with anti-idiotypic antibodies induces anti-anti-idiotypic responses with anti-CD4 specificity and in vitro neutralizing activity. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2000 Jan 1;16(1):77-86.

114. Hanna SL, Yang C, Owen SM, Lal RB. Variability of critical epitopes within HIV-1 heptad repeat domains for selected entry inhibitors in HIV-infected populations worldwide [corrected]. *Aids.* 2002 Aug 16;16(12):1603-8.

115. Jacobson JM. Immune-based therapies: an adjunct to antiretroviral treatment. *Curr HIV/AIDS Rep.* 2005 Jun;2(2):90-7.

116. Kuritzkes DR, Jacobson J, Powderly WG, Godofsky E, DeJesus E, Haas F, et al. Antiretroviral activity of the anti-CD4 monoclonal antibody TNX-355 in patients infected with HIV type 1. *J Infect Dis.* 2004 Jan 15;189(2):286-91.

117. Schlecht HP, Schellhorn S, Dezube BJ, Jacobson JM. New approaches in the treatment of HIV/AIDS - focus on maraviroc and other CCR5 antagonists. *Ther Clin Risk Manag.* 2008 Apr;4(2):473-85.

118. Lieberman-Blum SS, Fung HB, Bandres JC. Maraviroc: a CCR5-receptor antagonist for the treatment of HIV-1 infection. *Clin Ther.* 2008 Jul;30(7):1228-50.

119. Alkhatib G. The biology of CCR5 and CXCR4. *Curr Opin HIV AIDS.* 2009 Mar;4(2):96-103.

120. Delgado R. [Mechanisms of resistance and failure of treatment with maraviroc]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2008 Oct;26 Suppl 11:28-33.

121. Verhofstede C, Vandekerckhove L, Eygen VV, Demecheleer E, Vandembroucke I, Winters B, et al. CXCR4-using HIV type 1 variants are more commonly found in peripheral blood mononuclear cell DNA than in plasma RNA. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2009 Feb 1;50(2):126-36.

122. Kummerle T, Lehmann C, Hartmann P, Wyen C, Fatkenheuer G. Vicriviroc: a CCR5 antagonist for treatment-experienced patients with HIV-1 infection. *Expert Opin Investig Drugs.* 2009 Nov;18(11):1773-85.

123. Pozniak A. HIV fusion inhibitors. *J HIV Ther.* 2001 Nov;6(4):91-4.

124. Gulick RM, Lalezari J, Goodrich J, Clumeck N, DeJesus E, Horban A, et al. Maraviroc for previously treated patients with R5 HIV-1 infection. *N Engl J Med.* 2008 Oct 2;359(14):1429-41.

125. Alcami J. [Conclusions and perspectives. Maraviroc]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2008 Oct;26 Suppl 11:49-54.

126. Demarest JF, Amrine-Madsen H, Irlbeck DM, Kitrinis KM. Virologic failure in first-line human immunodeficiency virus therapy with a CCR5 entry inhibitor, aplaviroc, plus a fixed-dose combination of lamivudine-zidovudine: nucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance regardless of envelope tropism. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 Mar;53(3):1116-23.

127. Moyle G, DeJesus E, Boffito M, Wong RS, Gibney C, Badel K, et al. Proof of activity with AMD11070, an orally bioavailable inhibitor of CXCR4-tropic HIV type 1. *Clin Infect Dis.* 2009 Mar 15;48(6):798-805.

128. Witvrouw M, Debyser Z. The integrase of the human immunodeficiency virus as a novel target for the antiviral therapy of AIDS. *Verh K Acad Geneeskd Belg.* 2003;65(5):325-34.
129. Levy-Mintz P, Duan L, Zhang H, Hu B, Dornadula G, Zhu M, et al. Intracellular expression of single-chain variable fragments to inhibit early stages of the viral life cycle by targeting human immunodeficiency virus type 1 integrase. *J Virol.* 1996 Dec;70(12):8821-32.
130. Tarrago-Litvak L, Andreola ML, Fournier M, Nevinsky GA, Parissi V, de Soultrait VR, et al. Inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase and integrase: classical and emerging therapeutical approaches. *Curr Pharm Des.* 2002;8(8):595-614.
131. Serrao E, Odde S, Ramkumar K, Neamati N. Raltegravir, elvitegravir, and metoogravir: the birth of "me-too" HIV-1 integrase inhibitors. *Retrovirology.* 2009;6:25.
132. Paris D, Ledergerber B, Weber R, Jost J, Flepp M, Opravil M, et al. Incidence and predictors of virologic failure of antiretroviral triple-drug therapy in a community-based cohort. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1999 Dec 10;15(18):1631-8.
133. Ledergerber B, Egger M, Opravil M, Telenti A, Hirschel B, Battegay M, et al. Clinical progression and virological failure on highly active antiretroviral therapy in HIV-1 patients: a prospective cohort study. *Swiss HIV Cohort Study. Lancet.* 1999 Mar 13;353(9156):863-8.
134. Grabar S, Pradier C, Le Corfec E, Lancar R, Allavena C, Bentata M, et al. Factors associated with clinical and virological failure in patients receiving a triple therapy including a protease inhibitor. *AIDS.* 2000 Jan 28;14(2):141-9.
135. Rodriguez-Rosado R, Jimenez-Nacher I, Soriano V, Anton P, Gonzalez-Lahoz J. Virological failure and adherence to antiretroviral therapy in HIV-infected patients. *AIDS.* 1998 Jun 18;12(9):1112-3.
136. Rodriguez-Rosado R, Garcia-Samaniego J, Soriano V. Hepatotoxicity after introduction of highly active antiretroviral therapy. *AIDS.* 1998 Jul 9;12(10):1256.
137. Jimenez-Nacher I, Garcia-Diaz B, Soriano Vazquez V. [Drug interactions in patients infected with the human immunodeficiency virus]. *Rev Clin Esp.* 1998 Nov;198(11):765-8.
138. Pialoux G, Fournier S, Moulignier A, Poveda JD, Clavel F, Dupont B. Central nervous system as a sanctuary for HIV-1 infection despite treatment with zidovudine, lamivudine and indinavir. *AIDS.* 1997 Aug;11(10):1302-3.
139. Lew J, Reichelderfer P, Fowler M, Bremer J, Carrol R, Cassol S, et al. Determinations of levels of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma: reassessment of parameters affecting assay outcome. TUBE Meeting Workshop Attendees. *Technology Utilization for HIV-1 Blood Evaluation and Standardization in Pediatrics. J Clin Microbiol.* 1998 Jun;36(6):1471-9.
140. Schragar LK, D'Souza MP. Cellular and anatomical reservoirs of HIV-1 in patients receiving potent antiretroviral combination therapy. *JAMA.* 1998 Jul 1;280(1):67-71.
141. Drake S, Skidmore S, White D. New clinics for HIV testing. Upgrade existing services. *BMJ.* 1993 May 1;306(6886):1197.
142. Durant J, Clevenbergh P, Halfon P, Delgiudice P, Porsin S, Simonet P, et al. Drug-resistance genotyping in HIV-1 therapy: the VIRADAPT randomised controlled trial. *Lancet.* 1999 Jun 26;353(9171):2195-9.
143. Baxter JD, Mayers DL, Wentworth DN, Neaton JD, Hoover ML, Winters MA, et al. A randomized study of antiretroviral management based on plasma genotypic antiretroviral resistance testing in patients failing therapy. CPCRA 046 Study Team for the Terry Bein Community Programs for Clinical Research on AIDS. *Aids.* 2000 Jun 16;14(9):F83-93.

144. Kunkel TA, Loeb LA. Fidelity of mammalian DNA polymerases. *Science*. 1981 Aug 14;213(4509):765-7.
145. Steinhauer DA, Domingo E, Holland JJ. Lack of evidence for proofreading mechanisms associated with an RNA virus polymerase. *Gene*. 1992 Dec 15;122(2):281-8.
146. Domingo E, Mas A, Yuste E, Pariente N, Sierra S, Gutierrez-Riva M, et al. Virus population dynamics, fitness variations and the control of viral disease: an update. *Prog Drug Res*. 2001;57:77-115.
147. Domingo E, Menendez-Arias L, Quinones-Mateu ME, Holguin A, Gutierrez-Rivas M, Martinez MA, et al. Viral quasispecies and the problem of vaccine-escape and drug-resistant mutants. *Prog Drug Res*. 1997;48:99-128.
148. Najera I, Richman DD, Olivares I, Rojas JM, Peinado MA, Perucho M, et al. Natural occurrence of drug resistance mutations in the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1 isolates. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1994 Nov;10(11):1479-88.
149. Rooke R, Tremblay M, Soudeyans H, DeStephano L, Yao XJ, Fanning M, et al. Isolation of drug-resistant variants of HIV-1 from patients on long-term zidovudine therapy. Canadian Zidovudine Multi-Centre Study Group. *AIDS*. 1989 Jul;3(7):411-5.
150. Albert J, Wahlberg J, Lundeberg J, Cox S, Sandstrom E, Wahren B, et al. Persistence of azidothymidine-resistant human immunodeficiency virus type 1 RNA genotypes in posttreatment sera. *J Virol*. 1992 Sep;66(9):5627-30.
151. Soriano V, Briones C, Gomez-Cano M, Perez-Olmeda M, de Mendoza C. Resistencia a los fármacos antirretrovíricos. In: IDEPSA, editor. *Manual del SIDA*. 3ra. ed. Barcelona; 1999. p. 739-52.
152. Domingo E, Mas A, Menendez AL. Variabilidad Genética del VIH-1. In: IDEPSA, editor. *Manual del SIDA*. 3ra ed: Soriano Vazquez, V. Gonzalez-Lahoz, J.; 1999. p. 41-58.
153. Lee CG, Gottesman MM, Cardarelli CO, Ramachandra M, Jeang KT, Ambudkar SV, et al. HIV-1 protease inhibitors are substrates for the MDR1 multidrug transporter. *Biochemistry*. 1998 Mar 17;37(11):3594-601.
154. Friedland G, Dunkle LW, Cross AP. Stavudine (d4T, Zerit). *Adv Exp Med Biol*. 1996;394:271-7.
155. Lin Y, Lin X, Hong L, Foundling S, Henrikson RL, Thaisrivongs S, et al. Effect of point mutations on the kinetics and the inhibition of human immunodeficiency virus type 1 protease: relationship to drug resistance. *Biochemistry*. 1995 Jan 31;34(4):1143-52.
156. Pham PA. Antiretroviral adherence and pharmacokinetics: review of their roles in sustained virologic suppression. *AIDS Patient Care STDS*. 2009 Oct;23(10):803-7.
157. Bangsberg DR, Acosta EP, Gupta R, Guzman D, Riley ED, Harrigan PR, et al. Adherence-resistance relationships for protease and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors explained by virological fitness. *Aids*. 2006 Jan 9;20(2):223-31.
158. Duggan JM, Locher A, Fink B, Okonta C, Chakraborty J. Adherence to antiretroviral therapy: a survey of factors associated with medication usage. *AIDS Care*. 2009 Sep;21(9):1141-7.
159. Turner D, Brenner B, Wainberg MA. Multiple effects of the M184V resistance mutation in the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2003 Nov;10(6):979-81.
160. de Mendoza C, Soriano V, Briones C, Gallego O, Barreiro P, Alvarez A, et al. Emergence of zidovudine resistance in HIV-infected patients receiving stavudine. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2000 Mar 1;23(3):279-81.
161. Hirsch MS, Conway B, D'Aquila RT, Johnson VA, Brun-Vezinet F, Clotet B, et al. Antiretroviral drug resistance testing in adults with HIV infection: implications for clinical

- management. International AIDS Society--USA Panel. *Jama*. 1998 Jun 24;279(24):1984-91.
162. Larder BA, Kemp SD, Harrigan PR. Potential mechanism for sustained antiretroviral efficacy of AZT-3TC combination therapy. *Science*. 1995 Aug 4;269(5224):696-9.
163. Larder BA. Viral resistance and the selection of antiretroviral combinations. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*. 1995;10 Suppl 1:S28-33.
164. Briones C, Soriano V, Gonzalez-Lahoz J. Prevalence of drug-resistant HIV-1 genotypes in heavily pre-treated patients on current virological failure. *Aids*. 2000 Jul 28;14(11):1659-60.
165. de Mendoza C, Gallego O, Soriano V. Mechanisms of resistance to antiretroviral drugs--clinical implications. *AIDS Rev*. 2002 Apr-Jun;4(2):64-82.
166. Naeger LK, Margot NA, Miller MD. Increased drug susceptibility of HIV-1 reverse transcriptase mutants containing M184V and zidovudine-associated mutations: analysis of enzyme processivity, chain-terminator removal and viral replication. *Antivir Ther*. 2001 Jun;6(2):115-26.
167. Naeger LK, Miller MD. Mechanisms of HIV-1 nucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance: is it all figured out? *Curr Opin Investig Drugs*. 2001 Mar;2(3):335-9.
168. Meyer PR, Matsuura SE, Mian AM, So AG, Scott WA. A mechanism of AZT resistance: an increase in nucleotide-dependent primer unblocking by mutant HIV-1 reverse transcriptase. *Mol Cell*. 1999 Jul;4(1):35-43.
169. Meyer PR, Matsuura SE, Schinazi RF, So AG, Scott WA. Differential removal of thymidine nucleotide analogues from blocked DNA chains by human immunodeficiency virus reverse transcriptase in the presence of physiological concentrations of 2'-deoxynucleoside triphosphates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000 Dec;44(12):3465-72.
170. Bossi P, Calvez V, Bricaire F. [Resistance to antiretroviral agents: mechanism and study methods]. *Presse Med*. 1998 Dec;27 Suppl 5:18-9.
171. Gomez-Cano M, Rubio A, Puig T, Perez-Olmeda M, Ruiz L, Soriano V, et al. Prevalence of genotypic resistance to nucleoside analogues in antiretroviral-naive and antiretroviral-experienced HIV-infected patients in Spain. *Aids*. 1998 Jun 18;12(9):1015-20.
172. Winters MA, Coolley KL, Girard YA, Levee DJ, Hamdan H, Shafer RW, et al. A 6-basepair insert in the reverse transcriptase gene of human immunodeficiency virus type 1 confers resistance to multiple nucleoside inhibitors. *J Clin Invest*. 1998 Nov 15;102(10):1769-75.
173. Larder BA, Bloor S, Kemp SD, Hertogs K, Desmet RL, Miller V, et al. A family of insertion mutations between codons 67 and 70 of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase confer multinucleoside analog resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999 Aug;43(8):1961-7.
174. Parikh UM, Zelina S, Sluis-Cremer N, Mellors JW. Molecular mechanisms of bidirectional antagonism between K65R and thymidine analog mutations in HIV-1 reverse transcriptase. *Aids*. 2007 Jul 11;21(11):1405-14.
175. Ross L, Johnson M, Graham N, Shaefer M, St Clair M. The reverse transcriptase codon 69 insertion is observed in nucleoside reverse transcriptase inhibitor-experienced HIV-1-infected individuals, including those without prior or concurrent zidovudine therapy. *J Hum Virol*. 1999 Sep-Oct;2(5):290-5.
176. Van Vaerenbergh K, Van Laethem K, Albert J, Boucher CA, Clotet B, Florida M, et al. Prevalence and characteristics of multinucleoside-resistant human immunodeficiency virus type 1 among European patients receiving combinations of nucleoside analogues. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000 Aug;44(8):2109-17.

177. Selmi B, Boretto J, Sarfati SR, Guerreiro C, Canard B. Mechanism-based suppression of dideoxynucleotide resistance by K65R human immunodeficiency virus reverse transcriptase using an alpha-boranophosphate nucleoside analogue. *J Biol Chem.* 2001 Dec 21;276(51):48466-72.
178. Kleim JP, Bender R, Kirsch R, Meichsner C, Paessens A, Riess G. Mutational analysis of residue 190 of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Virology.* 1994 May 1;200(2):696-701.
179. Ren J, Nichols CE, Chamberlain PP, Weaver KL, Short SA, Stammers DK. Crystal structures of HIV-1 reverse transcriptases mutated at codons 100, 106 and 108 and mechanisms of resistance to non-nucleoside inhibitors. *J Mol Biol.* 2004 Feb 20;336(3):569-78.
180. Torti C, Pozniak A, Nelson M, Hertogs K, Gazzard BG. Distribution of K103N and/or Y181C HIV-1 mutations by exposure to zidovudine and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *J Antimicrob Chemother.* 2001 Jul;48(1):113-6.
181. Kozal MJ, Shah N, Shen N, Yang R, Fucini R, Merigan TC, et al. Extensive polymorphisms observed in HIV-1 clade B protease gene using high-density oligonucleotide arrays. *Nat Med.* 1996 Jul;2(7):753-9.
182. Condra JH, Schleif WA, Blahy OM, Gabryelski LJ, Graham DJ, Quintero JC, et al. In vivo emergence of HIV-1 variants resistant to multiple protease inhibitors. *Nature.* 1995 Apr 6;374(6522):569-71.
183. Walmsley S. Individualized therapy for the treatment-experienced patient. *AIDS Read.* 2003 Jun;13(6 Suppl):S11-5.
184. Manfredi R, Sabbatani S. A novel antiretroviral class (fusion inhibitors) in the management of HIV infection. Present features and future perspectives of enfuvirtide (T-20). *Curr Med Chem.* 2006;13(20):2369-84.
185. Soriano Vazquez V, Rodriguez-Rosado y Martinez-Echevarria R, Martinez E. [Tests to detect resistance to antiretroviral agents in clinical practice]. *Rev Clin Esp.* 1999 Mar;199(3):179-83.
186. Rodriguez-Rosado R, Briones C, Soriano V. Introduction of HIV drug-resistance testing in clinical practice. *Aids.* 1999 Jun 18;13(9):1007-14.
187. Clotet B. Efavirenz: resistance and cross-resistance. *Int J Clin Pract Suppl.* 1999 Jun;103:21-5.
188. Clotet B, Raffi F, Cooper D, Delfraissy JF, Lazzarin A, Moyle G, et al. Clinical management of treatment-experienced, HIV-infected patients with the fusion inhibitor enfuvirtide: consensus recommendations. *Aids.* 2004 May 21;18(8):1137-46.
189. Holodniy M. Phenotypic and genotypic testing in clinical practice. *AIDS Patient Care STDS.* 1998 Jul;12(7):527-31.
190. Paul SM, Jordan VS. HIV resistance testing. A clinical tool. *N J Med.* 2003 Sep;100(9 Suppl):44-9; quiz 75-6.
191. Ruiz L, Clotet B. Test de resistencia y sus limitaciones técnicas. In: Entheos GE, editor. *Guía práctica para el manejo clínico de las resistencias al VIH.* Madrid: Meck Sharp & Dohme de España, S.A.; 1999. p. 29-57.
192. Ruiz L, Clotet B. Test de resistencia y sus limitaciones técnicas. In: España MSDd, editor. *Guía práctica para el manejo clínico de las resistencias al VIH.* Barcelona; 1999. p. 29-57.
193. Beerwinkel N, Daumer M, Oette M, Korn K, Hoffmann D, Kaiser R, et al. Geno2pheno: Estimating phenotypic drug resistance from HIV-1 genotypes. *Nucleic Acids Res.* 2003 Jul 1;31(13):3850-5.
194. Rhee SY, Liu T, Ravela J, Gonzales MJ, Shafer RW. Distribution of human immunodeficiency virus type 1 protease and reverse transcriptase mutation patterns in

- 4,183 persons undergoing genotypic resistance testing. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Aug;48(8):3122-6.
195. Shafer RW. Genotypic testing for human immunodeficiency virus type 1 drug resistance. *Clin Microbiol Rev.* 2002 Apr;15(2):247-77.
196. Shafer RW. Genotypic Testing for HIV-1 Drug Resistance. 2004.
197. Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol.* 1990 Mar;28(3):495-503.
198. Villahermosa ML, Thomson M, Vazquez de Parga E, Cuevas MT, Contreras G, Perez-Alvarez L, et al. Improved conditions for extraction and amplification of human immunodeficiency virus type 1 RNA from plasma samples with low viral load. *J Hum Virol.* 2000 Jan-Feb;3(1):27-34.
199. Werle E, Schneider C, Renner M, Volker M, Fiehn W. Convenient single-step, one tube purification of PCR products for direct sequencing. *Nucleic Acids Res.* 1994 Oct 11;22(20):4354-5.
200. Hillis DM, Allard MW, Miyamoto MM. Analysis of DNA sequence data: phylogenetic inference. *Methods Enzymol.* 1993;224:456-87.
201. Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform.* 2004 Jun;5(2):150-63.
202. Salminen MO, Carr JK, Burke DS, McCutchan FE. Identification of breakpoints in intergenotypic recombinants of HIV type 1 by bootscanning. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1995 Nov;11(11):1423-5.
203. Lole KS, Bollinger RC, Paranjape RS, Gadkari D, Kulkarni SS, Novak NG, et al. Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *J Virol.* 1999 Jan;73(1):152-60.
204. Subbarao S, Vanichseni S, Hu DJ, Kitayaporn D, Choopanya K, Raktham S, et al. Genetic characterization of incident HIV type 1 subtype E and B strains from a prospective cohort of injecting drug users in Bangkok, Thailand. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2000 May 20;16(8):699-707.
205. Tovnanabutra S, Beyrer C, Sakkhachornphop S, Razak MH, Ramos GL, Vongchak T, et al. The changing molecular epidemiology of HIV type 1 among northern Thai drug users, 1999 to 2002. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2004 May;20(5):465-75.
206. Perez L, Thomson MM, Bleda MJ, Aragones C, Gonzalez Z, Perez J, et al. HIV Type 1 molecular epidemiology in cuba: high genetic diversity, frequent mosaicism, and recent expansion of BG intersubtype recombinant forms. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2006 Aug;22(8):724-33.
207. Wang W, Jiang S, Li S, Yang K, Ma L, Zhang F, et al. Identification of subtype B, multiple circulating recombinant forms and unique recombinants of HIV type 1 in an MSM cohort in China. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2008 Oct;24(10):1245-54.
208. Takebe Y, Motomura K, Tatsumi M, Lwin HH, Zaw M, Kusagawa S. High prevalence of diverse forms of HIV-1 intersubtype recombinants in Central Myanmar: geographical hot spot of extensive recombination. *Aids.* 2003 Sep 26;17(14):2077-87.
209. Yang R, Xia X, Kusagawa S, Zhang C, Ben K, Takebe Y. On-going generation of multiple forms of HIV-1 intersubtype recombinants in the Yunnan Province of China. *Aids.* 2002 Jul 5;16(10):1401-7.
210. Dowling WE, Kim B, Mason CJ, Wasunna KM, Alam U, Elson L, et al. Forty-one near full-length HIV-1 sequences from Kenya reveal an epidemic of subtype A and A-containing recombinants. *Aids.* 2002 Sep 6;16(13):1809-20.

211. Harris ME, Serwadda D, Sewankambo N, Kim B, Kigozi G, Kiwanuka N, et al. Among 46 near full length HIV type 1 genome sequences from Rakai District, Uganda, subtype D and AD recombinants predominate. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2002 Nov 20;18(17):1281-90.
212. Thomson MM, Delgado E, Herrero I, Villahermosa ML, Vazquez-de Parga E, Cuevas MT, et al. Diversity of mosaic structures and common ancestry of human immunodeficiency virus type 1 BF intersubtype recombinant viruses from Argentina revealed by analysis of near full-length genome sequences. *J Gen Virol*. 2002 Jan;83(Pt 1):107-19.
213. Sierra M, Thomson MM, Rios M, Casado G, Castro RO, Delgado E, et al. The analysis of near full-length genome sequences of human immunodeficiency virus type 1 BF intersubtype recombinant viruses from Chile, Venezuela and Spain reveals their relationship to diverse lineages of recombinant viruses related to CRF12_BF. *Infect Genet Evol*. 2005 Apr;5(3):209-17.
214. Thomson MM, Sierra M, Tanuri A, May S, Casado G, Manjon N, et al. Analysis of near full-length genome sequences of HIV type 1 BF intersubtype recombinant viruses from Brazil reveals their independent origins and their lack of relationship to CRF12_BF. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2004 Oct;20(10):1126-33.
215. Avila MM, Pando MA, Carrion G, Peralta LM, Salomon H, Carrillo MG, et al. Two HIV-1 epidemics in Argentina: different genetic subtypes associated with different risk groups. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2002 Apr 1;29(4):422-6.
216. McCutchan FE, Hegerich PA, Brennan TP, Phanuphak P, Singharaj P, Jugsudee A, et al. Genetic variants of HIV-1 in Thailand. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1992 Nov;8(11):1887-95.
217. Ou CY, Takebe Y, Weniger BG, Luo CC, Kalish ML, Auwanit W, et al. Independent introduction of two major HIV-1 genotypes into distinct high-risk populations in Thailand. *Lancet*. 1993 May 8;341(8854):1171-4.
218. Van Harmelen JH, Van der Ryst E, Loubser AS, York D, Madurai S, Lyons S, et al. A predominantly HIV type 1 subtype C-restricted epidemic in South African urban populations. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1999 Mar 1;15(4):395-8.
219. Bobkov AF, Pokrovskii VV, Selimova LM, Ladnaia NN, Kazennova EV, Bobkova MR, et al. [Genetic characteristics of variants of human immunodeficiency virus type 1, causing an epidemic among substance abusers in Commonwealth of Independent States countries]. *Vopr Virusol*. 1998 Nov-Dec;43(6):253-6.
220. Liitsola K, Holm K, Bobkov A, Pokrovsky V, Smolskaya T, Leinikki P, et al. An AB recombinant and its parental HIV type 1 strains in the area of the former Soviet Union: low requirements for sequence identity in recombination. *UNAIDS Virus Isolation Network. AIDS Res Hum Retroviruses*. 2000 Jul 20;16(11):1047-53.
221. Casado G, Thomson MM, Sierra M, Najera R. Identification of a novel HIV-1 circulating ADG intersubtype recombinant form (CRF19_cpx) in Cuba. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2005 Dec 15;40(5):532-7.
222. Rodrigues R, Scherer LC, Oliveira CM, Franco HM, Sperhacke RD, Ferreira JL, et al. Low prevalence of primary antiretroviral resistance mutations and predominance of HIV-1 clade C at polymerase gene in newly diagnosed individuals from south Brazil. *Virus Res*. 2006 Mar;116(1-2):201-7.
223. Lakhashe S, Thakar M, Godbole S, Tripathy S, Paranjape R. HIV infection in India: epidemiology, molecular epidemiology and pathogenesis. *J Biosci*. 2008 Nov;33(4):515-25.
224. Cavalcanti AM, Lacerda HR, Brito AM, Pereira S, Medeiros D, Oliveira S. Antiretroviral resistance in individuals presenting therapeutic failure and subtypes of the

human immunodeficiency virus type 1 in the Northeast Region of Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007 Nov;102(7):785-92.

225. Clavel F, Hance AJ. HIV drug resistance. N Engl J Med. 2004 Mar 4;350(10):1023-35.

226. Haubrich R, Demeter L. International perspectives on antiretroviral resistance. Clinical utility of resistance testing: retrospective and prospective data supporting use and current recommendations. J Acquir Immune Defic Syndr. 2001 Mar 1;26 Suppl 1:S51-9.

227. Chaix-Couturier C, Holtzer C, Phillips KA, Durand-Zaleski I, Stansell J. HIV-1 drug resistance genotyping. A review of clinical and economic issues. Pharmacoeconomics. 2000 Nov;18(5):425-33.

228. Chaix C, Grenier-Sennelier C, Clevenbergh P, Durant J, Schapiro JM, Dellamonica P, et al. Economic evaluation of drug resistance genotyping for the adaptation of treatment in HIV-infected patients in the VIRADAPT study. J Acquir Immune Defic Syndr. 2000 Jul 1;24(3):227-31.

229. Diaz T, Loth G, Whitworth J, Sutherland D. Surveillance methods to monitor the impact of HIV therapy programmes in resource-constrained countries. Aids. 2005 May;19 Suppl 2:S31-7.

230. Perez-Alvarez L, Cuevas MT, Villahermosa ML, Pedreira JD, Manjon N, Herrero I, et al. Prevalence of drug resistance mutations in B, non-B subtypes, and recombinant forms of human immunodeficiency virus type 1 in infected individuals in Spain (Galicia). J Hum Virol. 2001 Jan-Feb;4(1):35-8.

231. Sproat M, Pozniak AL, Peeters M, Winters B, Hoetelmans R, Graham NM, et al. The influence of the M184V mutation in HIV-1 reverse transcriptase on the virological outcome of highly active antiretroviral therapy regimens with or without didanosine. Antivir Ther. 2005;10(2):357-61.

232. de Jong MD, Vella S, Carr A, Boucher CA, Imrie A, French M, et al. High-dose nevirapine in previously untreated human immunodeficiency virus type 1-infected persons does not result in sustained suppression of viral replication. J Infect Dis. 1997 Apr;175(4):966-70.

233. Schuurman R, Nijhuis M, van Leeuwen R, Schipper P, de Jong D, Collis P, et al. Rapid changes in human immunodeficiency virus type 1 RNA load and appearance of drug-resistant virus populations in persons treated with lamivudine (3TC). J Infect Dis. 1995 Jun;171(6):1411-9.

234. Tisdale M, Kemp SD, Parry NR, Larder BA. Rapid in vitro selection of human immunodeficiency virus type 1 resistant to 3'-thiacytidine inhibitors due to a mutation in the YMDD region of reverse transcriptase. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 Jun 15;90(12):5653-6.

235. Back NK, Nijhuis M, Keulen W, Boucher CA, Oude Essink BO, van Kuilenburg AB, et al. Reduced replication of 3TC-resistant HIV-1 variants in primary cells due to a processivity defect of the reverse transcriptase enzyme. Embo J. 1996 Aug 1;15(15):4040-9.

236. Arion D, Kaushik N, McCormick S, Borkow G, Parniak MA. Phenotypic mechanism of HIV-1 resistance to 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT): increased polymerization processivity and enhanced sensitivity to pyrophosphate of the mutant viral reverse transcriptase. Biochemistry. 1998 Nov 10;37(45):15908-17.

237. Martinez-Picado J, Clotet B. Mutaciones de resistencia seleccionadas durante el tratamiento antirretroviral. In: España MSDd, editor. Guía práctica para el manejo clínico de las resistencias al VIH. Barcelona; 1999. p. 57-135.

238. Sucupira MC, Souza IE, Costa LJ, Scheinberg MA, Diaz RS. Antiretroviral treatment failure and HIV-1 genotypic resistance in Sao Paulo, Brazil. *Antivir Ther.* 2001 Dec;6(4):263-4.
239. Munerato P, Andreo SM, Sucupira M, Mamede S, Mota G, SaFilho D, et al. Patterns of HIV-1 genotypic antiretroviral resistance in clinical practice: a survey of the Brazilian network for genotypic resistance. 3rd IAS Conference of HIV pathogenesis and treatment; 2005; Rio de Janeiro, Brasil. International AIDS Society; 2005. p. 36.
240. Rodrigues R, Custodio RM, Bueno SM, Eira M, Ferreira JL, Jamal L, et al. Prevalence of ARV resistance mutations and impact of genotyping test in HIV patients with advance disease in Sao Paulo, Brazil. *J Clin Virol.* 2005 Apr;32(4):336-7.
241. Couto-Fernandez JC, Silva-de-Jesus C, Veloso VG, Rachid M, Gracie RS, Chequer-Fernandez SL, et al. 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.* 2005 Feb;100(1):73-8.
242. Shafer RW, Kozal MJ, Winters MA, Iversen AK, Katzenstein DA, Ragni MV, et al. Combination therapy with zidovudine and didanosine selects for drug-resistant human immunodeficiency virus type 1 strains with unique patterns of pol gene mutations. *J Infect Dis.* 1994 Apr;169(4):722-9.
243. Shirasaka T, Kavlick MF, Ueno T, Gao WY, Kojima E, Alcaide ML, et al. Emergence of human immunodeficiency virus type 1 variants with resistance to multiple dideoxynucleosides in patients receiving therapy with dideoxynucleosides. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Mar 14;92(6):2398-402.
244. Iversen AK, Shafer RW, Wehrly K, Winters MA, Mullins JI, Chesebro B, et al. Multidrug-resistant human immunodeficiency virus type 1 strains resulting from combination antiretroviral therapy. *J Virol.* 1996 Feb;70(2):1086-90.
245. Kavlick MF, Wyvill K, Yarchoan R, Mitsuya H. Emergence of multi-dideoxynucleoside-resistant human immunodeficiency virus type 1 variants, viral sequence variation, and disease progression in patients receiving antiretroviral chemotherapy. *J Infect Dis.* 1998 Jun;177(6):1506-13.
246. de Jong JJ, Goudsmit J, Lukashov VV, Hillebrand ME, Baan E, Huismans R, et al. Insertion of two amino acids combined with changes in reverse transcriptase containing tyrosine-215 of HIV-1 resistant to multiple nucleoside analogs. *Aids.* 1999 Jan 14;13(1):75-80.
247. Lukashov VV, Huismans R, Jebbink MF, Danner SA, de Boer RJ, Goudsmit J. Selection by AZT and rapid replacement in the absence of drugs of HIV type 1 resistant to multiple nucleoside analogs. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2001 Jun 10;17(9):807-18.
248. Esnouf RM, Stuart DI, De Clercq E, Schwartz E, Balzarini J. Models which explain the inhibition of reverse transcriptase by HIV-1-specific (thio)carboxanilide derivatives. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997 May 19;234(2):458-64.
249. Deeks ED, Keating GM. Etravirine. *Drugs.* 2008;68(16):2357-72.
250. Richman DD. HIV drug resistance. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1992 Jun;8(6):1065-71.
251. Blanca G, Baldanti F, Paolucci S, Skoblov AY, Victorova L, Hubscher U, et al. Nevirapine resistance mutation at codon 181 of the HIV-1 reverse transcriptase confers stavudine resistance by increasing nucleotide substrate discrimination and phosphorolytic activity. *J Biol Chem.* 2003 May 2;278(18):15469-72.
252. Rangel HR, Garzaro DJ, Torres JR, Castro J, Suarez JA, Naranjo L, et al. Prevalence of antiretroviral drug resistance among treatment-naive and treated HIV-infected patients in Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009 May;104(3):522-5.

253. Bongertz V, Ouverney EP, Fernandez SC, Grinsztejn B, Veloso V, Couto-Fernandez JC, et al. Anti-human immunodeficiency virus type 1 humoral immune response and highly active antiretroviral treatment. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007 Nov;102(7):817-25.
254. Rios M, Delgado E, Perez-Alvarez L, Fernandez J, Galvez P, de Parga EV, et al. Antiretroviral drug resistance and phylogenetic diversity of HIV-1 in Chile. *J Med Virol*. 2007 Jun;79(6):647-56.
255. Afani A, Ayala M, Meyer A, Cabrera R, Acevedo W. [Primary resistance to antiretroviral therapy in patients with HIV/AIDS in Chile]. *Rev Med Chil*. 2005 Mar;133(3):295-301.
256. Ruiz L, Clotet B. Test de resistencia y sus limitaciones tecnicas. In: España MSDd, editor. *Guía práctica para el manejo clínico de las resistencias al VIH*. Barcelona; 1999. p. 29-57.
257. Deshpande A, Jauvin V, Magnin N, Pinson P, Faure M, Masquelier B, et al. Resistance mutations in subtype C HIV type 1 isolates from Indian patients of Mumbai receiving NRTIs plus NNRTIs and experiencing a treatment failure: resistance to AR. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2007 Feb;23(2):335-40.
258. Ly JK, Margot NA, MacArthur HL, Hung M, Miller MD, White KL. The balance between NRTI discrimination and excision drives the susceptibility of HIV-1 RT mutants K65R, M184V and K65r+M184V. *Antivir Chem Chemother*. 2007;18(6):307-16.
259. Panos G, Charatsis G, Pappazios V, Kazantzi M, Falagas ME. Prevalence of genotypic resistance to nucleoside analogues, nonnucleoside analogues, and protease inhibitors in HIV-infected persons in Athens, Greece. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2008 Jan;24(1):43-51.
260. Wainberg MA. The impact of the M184V substitution on drug resistance and viral fitness. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2004 Feb;2(1):147-51.
261. De Clercq E. Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs): past, present, and future. *Chem Biodivers*. 2004 Jan;1(1):44-64.
262. Shafer RW, Kantor R, Gonzales MJ. The Genetic Basis of HIV-1 Resistance to Reverse Transcriptase and Protease Inhibitors. *AIDS Rev*. 2000 Oct-Dec;2(4):211-28.
263. Condra JH, Holder DJ, Schleif WA, Blahy OM, Danovich RM, Gabryelski LJ, et al. Genetic correlates of in vivo viral resistance to indinavir, a human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor. *J Virol*. 1996 Dec;70(12):8270-6.
264. Vasudevachari MB, Zhang YM, Imamichi H, Imamichi T, Falloon J, Salzman NP. Emergence of protease inhibitor resistance mutations in human immunodeficiency virus type 1 isolates from patients and rapid screening procedure for their detection. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996 Nov;40(11):2535-41.
265. Brindeiro RM, Diaz RS, Sabino EC, Morgado MG, Pires IL, Brigido L, et al. Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance (HIV-BResNet): a survey of chronically infected individuals. *Aids*. 2003 May 2;17(7):1063-9.
266. Fernandez-Montero JV, Barreiro P, Soriano V. HIV protease inhibitors: recent clinical trials and recommendations on use. *Expert Opin Pharmacother*. 2009 Jul;10(10):1615-29.
267. Booth CL, Garcia-Diaz AM, Youle MS, Johnson MA, Phillips A, Geretti AM. Prevalence and predictors of antiretroviral drug resistance in newly diagnosed HIV-1 infection. *J Antimicrob Chemother*. 2007 Mar;59(3):517-24.
268. Erice A, Balfour HH, Jr. Resistance of human immunodeficiency virus type 1 to antiretroviral agents: a review. *Clin Infect Dis*. 1994 Feb;18(2):149-56.
269. Veenstra J, Schuurman R, Cornelissen M, van't Wout AB, Boucher CA, Schuitemaker H, et al. Transmission of zidovudine-resistant human immunodeficiency

- virus type 1 variants following deliberate injection of blood from a patient with AIDS: characteristics and natural history of the virus. *Clin Infect Dis*. 1995 Sep;21(3):556-60.
270. Boden D, Hurley A, Zhang L, Cao Y, Guo Y, Jones E, et al. HIV-1 drug resistance in newly infected individuals. *Jama*. 1999 Sep 22-29;282(12):1135-41.
271. Simon V, Vanderhoeven J, Hurley A, Ramratnam B, Louie M, Dawson K, et al. Evolving patterns of HIV-1 resistance to antiretroviral agents in newly infected individuals. *Aids*. 2002 Jul 26;16(11):1511-9.
272. Lloyd B, O'Connell RJ, Michael NL, Aviles R, Palou E, Hernandez R, et al. Prevalence of resistance mutations in HIV-1-Infected Hondurans at the beginning of the National Antiretroviral Therapy Program. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2008 Apr;24(4):529-35.
273. Tuboi SH, Harrison LH, Sprinz E, Albernaz RK, Schechter M. Predictors of virologic failure in HIV-1-infected patients starting highly active antiretroviral therapy in Porto Alegre, Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2005 Nov 1;40(3):324-8.
274. Wensing AM, Boucher CA. Worldwide transmission of drug-resistant HIV. *AIDS Rev*. 2003 Jul-Sep;5(3):140-55.
275. Wensing AM, van de Vijver DA, Angarano G, Asjo B, Balotta C, Boeri E, et al. Prevalence of drug-resistant HIV-1 variants in untreated individuals in Europe: implications for clinical management. *J Infect Dis*. 2005 Sep 15;192(6):958-66.
276. Vercauteren J, Wensing AM, van de Vijver DA, Albert J, Balotta C, Hamouda O, et al. Transmission of drug-resistant HIV-1 is stabilizing in Europe. *J Infect Dis*. 2009 Nov 15;200(10):1503-8.
277. Agwale SM, Zeh C, Paxinos E, Odama L, Pienazek D, Wambebe C, et al. Genotypic and phenotypic analyses of human immunodeficiency virus type 1 in antiretroviral drug-naïve Nigerian patients. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2006 Jan;22(1):22-6.
278. Tee KK, Kamarulzaman A, Ng KP. Prevalence and pattern of drug resistance mutations among antiretroviral-treated HIV-1 patients with suboptimal virological response in Malaysia. *Med Microbiol Immunol*. 2006 Jun;195(2):107-12.
279. Vergne L, Diagbouga S, Kouanfack C, Aghokeng A, Butel C, Laurent C, et al. HIV-1 drug-resistance mutations among newly diagnosed patients before scaling-up programmes in Burkina Faso and Cameroon. *Antivir Ther*. 2006;11(5):575-9.
280. Little SJ, Holte S, Routy JP, Daar ES, Markowitz M, Collier AC, et al. Antiretroviral-drug resistance among patients recently infected with HIV. *N Engl J Med*. 2002 Aug 8;347(6):385-94.
281. Chaix ML, Descamps D, Harzic M, Schneider V, Deveau C, Tamalet C, et al. Stable prevalence of genotypic drug resistance mutations but increase in non-B virus among patients with primary HIV-1 infection in France. *Aids*. 2003 Dec 5;17(18):2635-43.
282. Bennett DE. The requirement for surveillance of HIV drug resistance within antiretroviral rollout in the developing world. *Curr Opin Infect Dis*. 2006 Dec;19(6):607-14.
283. DeGruttola V, Dix L, D'Aquila R, Holder D, Phillips A, Ait-Khaled M, et al. The relation between baseline HIV drug resistance and response to antiretroviral therapy: re-analysis of retrospective and prospective studies using a standardized data analysis plan. *Antivir Ther*. 2000 Mar;5(1):41-8.
284. Pao D, Andrady U, Clarke J, Dean G, Drake S, Fisher M, et al. Long-term persistence of primary genotypic resistance after HIV-1 seroconversion. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2004 Dec 15;37(5):1570-3.
285. Cane PA. Stability of transmitted drug-resistant HIV-1 species. *Curr Opin Infect Dis*. 2005 Dec;18(6):537-42.

286. Vandamme AM, Sonnerborg A, Ait-Khaled M, Albert J, Asjo B, Bacheler L, et al. Updated European recommendations for the clinical use of HIV drug resistance testing. *Antivir Ther.* 2004 Dec;9(6):829-48.
287. Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S. Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004. *Aids.* 2006 Oct 24;20(16):W13-23.
288. Snoeck J, Kantor R, Shafer RW, Van Laethem K, Deforche K, Carvalho AP, et al. Discordances between interpretation algorithms for genotypic resistance to protease and reverse transcriptase inhibitors of human immunodeficiency virus are subtype dependent. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006 Feb;50(2):694-701.
289. Descamps D, Collin G, Letourneur F, Apetrei C, Damond F, Loussert-Ajaka I, et al. Susceptibility of human immunodeficiency virus type 1 group O isolates to antiretroviral agents: in vitro phenotypic and genotypic analyses. *J Virol.* 1997 Nov;71(11):8893-8.
290. Tuaille E, Gueudin M, Lemee V, Gueit I, Roques P, Corrigan GE, et al. Phenotypic susceptibility to nonnucleoside inhibitors of virion-associated reverse transcriptase from different HIV types and groups. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2004 Dec 15;37(5):1543-9.
291. Kantor R, Shafer RW, Katzenstein D. The HIV-1 Non-subtype B Workgroup: An International Collaboration for the Collection and Analysis of HIV-1 Non-subtype B Data. *J Int AIDS Soc.* 2005;7(1):71.
292. Montes B, Vergne L, Peeters M, Reynes J, Delaporte E, Segondy M. Comparison of drug resistance mutations and their interpretation in patients infected with non-B HIV-1 variants and matched patients infected with HIV-1 subtype B. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2004 Apr 1;35(4):329-36.
293. Eyer-Silva WA, Morgado MG. A genotyping study of human immunodeficiency virus type-1 drug resistance in a small Brazilian municipality. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005 Dec;100(8):869-73.
294. Brenner B, Turner D, Oliveira M, Moisi D, Detorio M, Carobene M, et al. A V106M mutation in HIV-1 clade C viruses exposed to efavirenz confers cross-resistance to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Aids.* 2003 Jan 3;17(1):F1-5.
295. Grossman Z, Istomin V, Averbuch D, Lorber M, Risenberg K, Levi I, et al. Genetic variation at NNRTI resistance-associated positions in patients infected with HIV-1 subtype C. *Aids.* 2004 Apr 9;18(6):909-15.
296. Lacerda HR, Medeiros LB, Cavalcanti AM, Ximenes RA, Albuquerque Mde F. Comparison of the epidemiology, profile of mutations, and clinical response to antiretrovirals among subtypes B and F of the human immunodeficiency virus type 1. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007 Sep;102(6):693-9.
297. Thomson MM, Casado G, Posada D, Sierra M, Najera R. Identification of a novel HIV-1 complex circulating recombinant form (CRF18_cpx) of Central African origin in Cuba. *Aids.* 2005 Jul 22;19(11):1155-63.
298. Turner D, Brenner B, Moisi D, Detorio M, Cesaire R, Kurimura T, et al. Nucleotide and amino acid polymorphisms at drug resistance sites in non-B-subtype variants of human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Aug;48(8):2993-8.
299. Perno CF, Cozzi-Lepri A, Forbici F, Bertoli A, Violin M, Stella Mura M, et al. Minor mutations in HIV protease at baseline and appearance of primary mutation 90M in patients for whom their first protease-inhibitor antiretroviral regimens failed. *J Infect Dis.* 2004 Jun 1;189(11):1983-7.
300. Perez-Alvarez L, Thomson MM, Villahermosa ML, de Parga EV, Rodriguez A, Cuevas MT, et al. HIV-1 subtype G and BG recombinant viruses in Spanish natives:

- evidence of characteristic mutations in reverse transcriptase and protease. *Aids*. 2001 Sep 28;15(14):1907-10.
301. Kuritzkes DR. Resistance to protease inhibitors. *J HIV Ther*. 2002 Nov;7(4):87-91.
302. Alexander CS, Dong W, Chan K, Jahnke N, O'Shaughnessy MV, Mo T, et al. HIV protease and reverse transcriptase variation and therapy outcome in antiretroviral-naive individuals from a large North American cohort. *Aids*. 2001 Mar 30;15(5):601-7.
303. Wu TD, Schiffer CA, Gonzales MJ, Taylor J, Kantor R, Chou S, et al. Mutation patterns and structural correlates in human immunodeficiency virus type 1 protease following different protease inhibitor treatments. *J Virol*. 2003 Apr;77(8):4836-47.
304. Pieniazek D, Rayfield M, Hu DJ, Nkengasong J, Wiktor SZ, Downing R, et al. Protease sequences from HIV-1 group M subtypes A-H reveal distinct amino acid mutation patterns associated with protease resistance in protease inhibitor-naive individuals worldwide. HIV Variant Working Group. *Aids*. 2000 Jul 28;14(11):1489-95.
305. Cornelissen M, van den Burg R, Zorgdrager F, Lukashov V, Goudsmit J. pol gene diversity of five human immunodeficiency virus type 1 subtypes: evidence for naturally occurring mutations that contribute to drug resistance, limited recombination patterns, and common ancestry for subtypes B and D. *J Virol*. 1997 Sep;71(9):6348-58.

ANEXOS

ANEXO I

Carta de Consentimiento Informado.

Por medio de la presente certifico que el Dr. _____ me ha informado sobre los estudios que se me realizarán como parte del protocolo de investigación relacionado con el desarrollo de resistencia a los antirretrovirales cubanos empleados en la terapéutica de los pacientes HIV/sida. Los resultados de dichos estudios serán utilizados y publicados de forma anónima pudiendo yo en cualquier momento abandonar dichas investigaciones, sin que ello pueda repercutir negativamente en mi asistencia médica en el futuro.

Del mismo modo certifico que participaré en dicho estudio de una forma absolutamente voluntaria teniendo derecho a conocer los resultados de los exámenes a mi realizado.

Certifico por la presente que autorizo a las entidades sanitarias nacionales y extranjeras y al comité ético a que consulten los informes hospitalarios que digan mi nombre, sin que por ello pierdan su carácter confidencial.

Nombre y apellidos del paciente:

Firma del paciente:

Nombre y apellidos del testigo:

Firma del testigo:

Fecha:

Yo: _____ responsable del protocolo de investigación certifico por medio de la presente haberle explicado al paciente todo lo relacionado con este estudio e igualmente certifico que el mismo ha participado de forma absolutamente voluntaria en el ensayo.

Fecha:

Firma:

ANEXO II

Números de accesos en el GenBank de las secuencias del gen *pol* del VIH-1 de las cepas cubanas descritas en nuestro estudio.

- DQ112963-DQ113387.

Secuencias de referencias empleadas (gen *pol* del VIH-1) en los árboles filogenéticos.

A1.SE7253	A1.Q23-17	A1.92UG037	A1.U455	A2.94CY017-41
A2.97CDKTB48	B.HXB2	B.RF	B.SF2	B.WEAU160
C.ETH2220	C.97ZA012	C.98IN012	C.96BW0502	C.92BR025
D.94UG114	D.ELI	D.83.ELI	F1.93BR020.1	F1.VI850
F1.FIN9363	F1.MP411	F2.MP257	F2.MP255	G.SE6165
G.92NG083	G.HH8793-12.1	G.DRCB	H.90CF056	H.VI997
K.MP535	K.EQTB11C	J.SE7022	J.SE7887	02_AG.IBNG
02_AG.DJ264	02_AG.97CM-MP807	12_BF.ARMA159	12_BF.A32989	18_cpx.CU76
18_cpx.CU14	19_cpx.CU7	19_cpx.CU38	19_cpx.CU29	

ANEXO III

Datos recogidos de los pacientes

(Los datos fueron obtenidos de la Base de datos de VIH del MINSAP y las Historias clínicas).

Caso Índice

Orientación Sexual

Internacionalista (País)

Lugar de Residencia (Urbana o Rural)

Fecha y lugar (país) probable de infección con VIH.

Fecha de Diagnóstico de VIH.

Conteo de CD4 y Carga viral de VIH.

Contactos sexuales anteriores y posteriores.

ANEXO IV

Listado de Aminoácidos y símbolo de cada uno.

Nombre del aminoácido	Código de una letra
Isoleucina	I
Valina	V
Leucina	L
Fenilalanina	F
Cisteína	C
Metionina	M
Alanina	A
Glicina	G
Treonina	T
Triptófano	W
Serina	S
Tirosina	Y
Prolina	P
Histidina	H
Ácido glutámico	E
Glutamina	Q
Ácido aspártico	D
Asparagina	N
Lisina	K
Arginina	R