

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

**Facultad de Ingeniería Marítima, Ciencias Biológicas, Oceánicas
y Recursos Naturales**



**“ANÁLISIS GENÉTICO DE LAS MUTACIONES PRESENTES EN
LAS POBLACIONES VIRALES MINORITARIAS ASOCIADAS CON
FARMACORRESISTENCIA A LA FAMILIA DE LOS NRTI EN
PACIENTES CON VIH-1”**

TESIS DE GRADO

Previo a la obtención del Título de:

BIÓLOGO

Presentada por:

Katherine Stefania Hermida Alava

GUAYAQUIL – ECUADOR

2015

AGRADECIMIENTO

Agradezco a INSPI, ESPOL y SENESCYT por haber hecho posible la realización de mi Tesis.

A mi madre, por su esfuerzo del día a día y su apoyo incondicional, porque en realidad este logro se lo debo a ella.

A mi padre, hermana y esposo, porque de una u otra forma estuvieron ahí para apoyarme

A mis tutores, el Máster César Bedoya y el Dr. Manuel González, por su enseñanza y paciencia.

A Luis Fernando Gómez y Consuelo Correa, por su colaboración en la elaboración de mi Tesis.

A mis compañeros de trabajo y amigos universitarios en general, por darme ánimos en cada momento.

DEDICATORIA

A mi pequeño Simón.

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

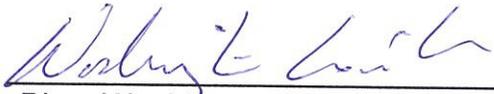
Víctor Osorio MSc.
Presidente de Tribunal



Ac. César Bedoya MSc.
Director de Tesis



Dr. Manuel González MSc.
Co-Director de Tesis

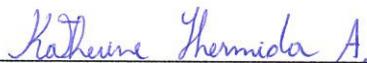


Blgo. Washington B. Cárdenas PhD.
Miembro Principal

DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad del contenido de esta Tesis de Grado, me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la Escuela Superior Politécnica del Litoral”

(Reglamento de Graduación de la ESPOL)



Katherine Stefania Hermida Alava

RESUMEN

La resistencia del VIH a los antirretrovirales es uno de los principales problemas en la lucha contra el VIH/SIDA en la actualidad. Existen sistemas cerrados de diagnóstico de resistencia, pero sólo dan información sobre mutaciones encontradas en aquellas poblaciones virales mayores al 20% de la población viral total. El objetivo de esta tesis fue el de implementar la técnica de pirosecuenciación 454 (Roche), para detectar mutaciones asociadas a resistencia en poblaciones minoritarias (1 - 20%).

La cantidad de mutaciones asociadas a resistencia fue relativamente extensa, siendo la M184V/I la más frecuente para la región de la transcriptasa inversa y L63A/I/P/Q/H/T para la región de la proteasa. Se encontraron las siguientes mutaciones con menor frecuencia: M41L, D67N, K70R, L210W y T215F/Y, las cuales confieren resistencia a AZT y D4T, y resistencia cruzada a ABC, ddI y TDF. No concordaron la cantidad de personas que tomaron los medicamentos

con la cantidad de personas que presentaron resistencia, debido a que las mutaciones minoritarias no representan la resistencia actual sino la posibilidad de resistencia a corto o mediano plazo, además de existir mutaciones que revierten resistencia a ciertos medicamentos (3TC, ABC y FTC) como la M184V. También se determinó el subtipo siendo el subtipo B el más común de la población en estudio, seguido por el CRF28_BF. Se recomienda realizar el estudio con pacientes en diferentes etapas, pacientes vírgenes al tratamiento (Naïve), paciente con tratamiento y pacientes en etapa SIDA.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	VI
ÍNDICE GENERAL.....	VII
ABREVIATURAS	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	X
ÍNDICE DE TABLAS	XI
ÍNDICE DE ANEXOS.....	XII
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1	4
MARCO TEÓRICO.....	4
1.1 Características estructurales del VIH-1.....	4
1.2 Genoma.....	6
1.3 Ciclo de vida del VIH-1	7
1.4 Variabilidad Genética del VIH-1	8
1.5 Epidemiología.....	10
1.6 Distribución geográfica de los subtipos del VIH-1.....	12
1.7 Terapia Antirretroviral	12

1.8	Ensayos para determinar resistencia a los antirretrovirales.....	15
CAPÍTULO 2.....		22
MATERIALES Y MÉTODOS		22
2.1.	Experimentos realizados.....	23
2.2.	Extracción de ARN	25
2.3.	Síntesis de ADNc y generación de amplicones	27
2.4.	Purificación de Amplicones.....	30
2.5.	Cuantificación por fluorescencia (PicoGreen).....	32
2.6.	Formación de la Librería	34
2.7.	PCR en emulsión.....	37
2.7.1.	Preparación de la pre-emulsión.....	38
2.7.2.	Preparación de las perlas de captura	38
2.7.3.	Emulsificación.....	39
2.7.3.1.	Amplificación	39
2.7.4.	Recuperación de perlas.....	40
2.7.4.1.	Recolección de la emulsión y lavados iniciales	40
2.7.4.2.	Recuperación de las perlas	41
2.7.5.	Enriquecimiento de perlas	42
2.7.5.1.	Enriquecimiento de las perlas cargadas con ADN	44
2.7.5.2.	Recolección de perlas enriquecidas con ADN	45
2.7.6.	Seq primer annealing	45
2.7.6.1.	Conteo de perlas	46
2.8.	Secuenciación	46
2.8.1.	Preparación de capas.....	47
2.8.1.1.	Preparación de DNA beads adicionando las perlas de control XLTF 47	
2.8.1.2.	Preparación de las packing beads	48
2.8.1.3.	Preparación de enzyme beads y PPIase beads.....	48

2.8.1.4.	Preparación de la capa 1 y 3.....	49
2.8.1.5.	Preparación de la mezcla de DNA beads (perlas enriquecidas) y Packing beads.....	49
2.8.1.6.	Depósito de la capa 1.....	50
2.8.1.7.	Depósito de la capa 2.....	50
2.8.1.8.	Depósito de la capa 3.....	51
2.8.1.9.	Depósito de la capa 4.....	51
2.9.	Análisis de la resistencia.....	52
2.10.	Análisis estadístico	53
CAPÍTULO 3	55
RESULTADOS	55
3.1	Análisis de mutaciones del gen de la Transcriptasa Reversa.....	56
3.2	Resistencia a los medicamentos de la familia NRTI	59
3.3	Resistencia a los NRTI y las características de la muestra estudiada ..	61
3.4	Subtipos.....	63
CAPÍTULO 4	64
DISCUSIÓN	64
CONCLUSIONES	69
RECOMENDACIONES	71
ANEXOS	72
BIBLIOGRAFÍA	87

ABREVIATURAS

ABC: Abacavir

ADN: ácido desoxiribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

ARV: agentes antirretrovirales

AZT: zidovudina

CRF: Forma recombinante circulante

CV: Carga viral

d4T: estavudina

ddC: zalcitabina

ddl: didanosina

EFV: efavirenz

FCR: resistencia a una clase completa de medicamentos ARV

FTC: Emtricitabina

HT: heterosexual

Kb: kilobases

LTR: secuencias terminales largas repetidas

NAM: mutaciones asociadas a nucleósidos/nucleótidos

NNRTIs: inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos

NRTIs: inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos y nucleótidos

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PI: inhibidores de proteasa

PR: proteasa

R: resistencia alta

I: resistencia intermedia

S: susceptible

SIDA: síndrome de inmunodeficiencia adquirida

S^NC: resultados no conclusivos

3TC: lamivudina

TAM: mutaciones relacionadas con análogos de timidina

TARVAE: terapia antirretroviral altamente efectiva

TDF: Tenofovir

TI: transcriptasa inversa

VIH: virus de inmunodeficiencia humana

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Organización Genómica del VIH-1	7
Figura 2. Número estimado de casos de personas viviendo con VIH para el 2013 según la distribución geográfica. Tomada de Core epidemiological slides HIV/AIDS stimates. 2014 (2).....	11
Figura 3. Separación de fragmentos y análisis en la secuenciación por el método de Sanger. Detalla brevemente la secuenciación de Sanger desde la separación de la hebra (punto 1), pasando por las cuatro reacciones para separar cada nucleótido mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (paso 2 y 3), hasta llegar al análisis del patrón de banda (paso 4). Tomada de Luque y Herráez 2006 (35).	18
Figura 4. Pasos del proceso de pirosecuenciación	20
Figura 6. Flujo de trabajo. Detalla los pasos que deben realizarse en la técnica de genotipificación por pirosecuenciación.	24
Figura 7. Porcentaje de pacientes con poblaciones de VIH-1 con mutaciones asociadas a resistencia a los ARV.....	58
Figura 8. Porcentaje de pacientes con poblaciones de VIH-1 con mutaciones que no están asociadas a resistencia a los ARV	58

Figura 9. Porcentaje de pacientes con poblaciones de VIH-1 con mutaciones asociadas resistencia a los ARV, en cuanto a poblaciones retrovirales mayoritarias (>20%) y a todas las poblaciones retrovirales analizadas.....	59
Figura 10. Niveles de resistencia a los NRTI.	60
Figura 11. Porcentaje de pacientes con poblaciones de VIH-1 que presentan resistencia a los medicamentos NRTI y de pacientes utilizando los ARV.....	61
Figura 12. Porcentaje de pacientes con poblaciones de VIH-1 que presentan resistencia a los medicamentos NRTI según sexo.	62
Figura 13. Porcentaje de pacientes con poblaciones de VIH-1 que presentan resistencia a los medicamentos NRTI según subtipo viral.....	63

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Proteínas estructurales del VIH-1.	5
Tabla II. Proteínas no estructurales del VIH-1.	6
Tabla III. Pacientes con datos según lo obtenido en la ficha personal.....	53
Tabla IIV. Características de la población.....	56

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A. Ficha de Resistencia.....	73
ANEXO B: Preparación de mix y perfiles de temperatura de PCR	74
ANEXO C. Tabla de diluciones para cuantificación de ADN.....	76
ANEXO D. Descripción de capas en la PTP	77
ANEXO E. Tabla de mutaciones asociadas a resistencia a los distintos fármacos con sus respectivas frecuencias.	78
ANEXO F. Tabla de mutaciones que no están asociadas a resistencia a los distintos fármacos con sus respectivas frecuencias.	79
ANEXO G. Tabla de comparación entre las mutaciones encontradas en las poblaciones minoritarias y las encontradas en las poblaciones mayoritarias	81
ANEXO H. Tabla de niveles de resistencia.....	82
ANEXO I. Tabla de Porcentaje de pacientes con poblaciones de VIH-1 que presentan resistencia a los medicamentos NRTI y de pacientes utilizando los ARV.	83
ANEXO J. Tabla de porcentaje de pacientes con poblaciones de VIH-1 que presentan resistencia a los medicamentos NRTI según sexo.....	84

ANEXO K. Tablas de porcentajes de pacientes con poblaciones de VIH-1 que presentan resistencia a los medicamentos NRTI según su conteo de CD4 y CV.
..... 85

ANEXO L. Porcentaje de pacientes con poblaciones de VIH-1 que presentan resistencia a los medicamentos NRTI según subtipo viral..... 86

INTRODUCCIÓN

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) pertenece a la familia *Retroviridae*, género *Lentivirus*. Es un virus envuelto con una cápside proteica, con genoma de ARN de cadena simple y polaridad positiva; es más complejo que otros retrovirus (1). Una de las características de este género, es causar enfermedades con períodos de incubación relativamente extensos. A este virus se le atribuye el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).

Para el 2013 se estimó que 35 millones de personas vivían con VIH en el mundo (2), con una incidencia por año desde el 2005 al 2013 de 1.6% (3, 4). Habiendo aproximadamente 39 millones de decesos a causa de enfermedades relacionadas con VIH desde el inicio de la pandemia (4).

A partir de 1987 se inició la monoterapia utilizando sólo un análogo de nucleósido, pero es en 1996 donde se empieza con la terapia antirretroviral altamente efectiva (TARVAE) reduciendo la frecuencia de muerte y de SIDA de 38% a 22%. Este tipo de terapia es muy costosa pero gracias a los esfuerzos a nivel mundial, alrededor de 10 millones de personas con VIH tuvieron acceso a ella para finales del 2012 (5).

La causa principal del fallo de la TARVAE fue la selección de variantes resistentes de VIH-1 a los medicamentos empleados en la terapia (6). Dichas mutaciones son la causa de las resistencias inferidas. La resistencia puede determinarse de dos formas, con pruebas genotípicas o con pruebas fenotípicas. Al realizar pruebas genotípicas de resistencia nos permite, entre tantas cosas, conocer las variantes del virus que circulan y elegir de manera adecuada la TARVAE. Se han realizado estudios sobre el costo – efectividad de realizar este tipo de pruebas en pacientes sin TARVAE previa, los resultados de estos estudios nos indican que al realizar la prueba antes de iniciar la TARVAE las expectativas de vida de las personas con VIH aumentan y los costos del tratamiento disminuyen (7).

En Ecuador, hasta el año 2010 se contabilizaron alrededor de 18739 pacientes viviendo con VIH (8). En la actualidad existen 15 drogas antirretrovirales (ARV) en Ecuador. Las drogas de primera línea, recomendadas por el programa de

VIH/sida del Ecuador son NRTIs y NNRTI, particularmente el esquema es Tenofovir (TDF)/Emtricitabina (FTC)/ efavirenz (EFV) (8). Existen alrededor de 6765 pacientes bajo tratamiento antirretroviral y se estima que cada año, alrededor de 300 pacientes necesitarán un cambio en la terapia (13).

Las guías internacionales actuales de tratamiento ARV incluyen el empleo de las pruebas de resistencia, con el fin de ayudar a los clínicos en la toma adecuada de decisiones respecto a los regímenes de tratamiento en cada caso (9). Desafortunadamente, estas pruebas no están disponibles en estos momentos de forma estable en Ecuador.

Por ello nos trazamos los siguientes objetivos:

- Implementar la plataforma de pirosecuenciación 454 de ROCHE para el gen de la Transcriptasa Inversa localizada en la región Gag/Pol del VIH-1.
- Determinar las mutaciones asociadas a fármacorresistencia, presentes en la población viral minoritaria, del gen de la Transcriptasa Inversa del VIH-1 presente en las muestras analizadas.

CAPÍTULO 1

MARCO TEÓRICO

1.1 Características estructurales del VIH-1

El VIH es un virus envuelto con una cápside proteica, su genoma consiste en una cadena simple de ARN de polaridad positiva y es más complejo que otros retrovirus.

El virión maduro tiene un diámetro de 100 nm, tiene una envoltura proteica en la que se encuentran las glicoproteínas de superficie (gp120) y la proteína transmembranal (gp41). Presenta una matriz (p17) y una cápside (p24), dentro de la cápside se encuentra una compleja estructura formada por la nucleocápside (p7) y el ARN genómico; además de tres enzimas necesarias para la replicación (PR, TI e Integrasa) y proteínas no estructurales (10).

Tabla I. Proteínas estructurales del VIH-1.

Se encuentra el nombre de cada proteína estructural, con su respectiva abreviatura y nombre alternativo. Modificado de Acheson, 2011 (11)

Nombre	Abreviatura	Nombre alternativo
Matriz	MA	p17
Cápside	CA	p24
Nucleocápside	NC	p7
Proteasa	PR	p14
Transcriptasa inversa	RT	p66/51
Integrasa	IN	p32
Proteína de superficie	SU	gp120
Proteína transmembranal	TM	gp41
Proteína R del virión	Vpr	p15

Tabla II. Proteínas no estructurales del VIH-1.

Se encuentra el nombre de cada proteína no estructural, con su respectiva abreviatura y nombre alternativo. Modificado de Acheson, 2011 (11)

Nombre	Abreviatura	Nombre alternativo
Factor de Infectividad viral	Vif	p23
Proteína única del VIH-1	Vpu	p16
Transactivador de la Transcripción	Tat	p15
Proteína reguladora de la expresión de proteínas virales	Rev	p19
Efactor negativo	Nef	p27

1.2 Genoma

El genoma del VIH tiene una longitud de 9.8 kilobases (kb). Posee tres regiones codificantes para las proteínas estructurales, *gag*, *pol* y *env*, posee también regiones codificantes de proteínas no estructurales que se encuentran en los

genes *vif*, *vpr*, *vpu*, *nef*, *tat* y *rev*. En los extremos 5' y 3' existen secuencias no codificantes llamadas secuencias terminales largas repetidas (LTR). En el extremo 5' de los LTR se localizan las secuencias promotoras para la transcripción, mientras que en el 3' se halla la señal necesaria para la poliadenilación (12).

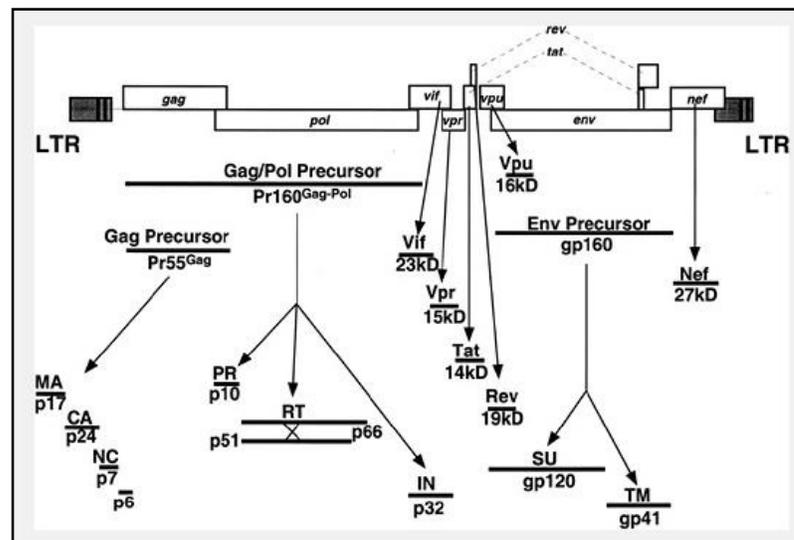


Figura 1. Organización Genómica del VIH-1.

Se describe cada gen del virus y las proteínas que sintetizan. Modificado de Fields, 2007(1)

1.3 Ciclo de vida del VIH-1

Las células blanco son los macrófagos y las células T. El ciclo de vida se inicia con la adsorción de partículas virales a la molécula CD4 de las células blanco a

infectar aquí ocurre una interacción con sus respectivos correceptores, CCR5 para los macrófagos y CXCR4 para las células T. Producto de esta interacción ocurren cambios conformacionales en la gp120, lo que a su vez induce un cambio conformacional en la gp41, resultando en el ingreso del virus al citoplasma de la célula, mediante la fusión de las membranas tanto del virus como de la célula huésped (1, 11, 13).

Después de la entrada a la célula, las partículas subvirales que están parcialmente descubiertas inician la retrotranscripción del ARN viral para generar el ADN complementario (ADNc), mediante la enzima transcriptasa inversa. El ADNc es usado por esta misma enzima para formar ADN proviral de doble cadena, el cual es transportado del citoplasma al núcleo, integrándose en el genoma de la célula huésped y expresándose junto con él. El ARNm producido es transportado al citoplasma donde es traducido en proteínas virales. Las poliproteínas *gag* y *gag-pol* son llevadas por vías independientes a la membrana plasmática, donde las partículas de virus progenie son liberadas como partículas inmaduras. La maduración se produce cuando la proteasa es activada por autocatálisis y escinde las poliproteínas para formar proteínas funcionales (1, 11).

1.4 Variabilidad Genética del VIH-1

La transcriptasa inversa no tiene un mecanismo eficiente para corregir los errores durante la formación del ADN proviral. La retrotranscripción resulta de 1 a 10

mutaciones por moléculas de ADN proviral sintetizada. Esto le permite al VIH producir descendientes con una alta variabilidad genética.

La variación genética de los virus de ARN no sólo puede ocurrir por mutaciones puntuales sino también por inserciones, supresiones, recombinación homóloga o no homóloga y por reordenamiento de segmentos en virus de genoma segmentado (14).

Los análisis filogenéticos del VIH-1, han revelado la existencia de 4 grandes grupos. M, N, O y P, siendo estos 2 últimos los más cercanos al virus de inmunodeficiencia del simio (15). El grupo M es el causante de la actual pandemia y presenta subtipos que van del A-D, F-H, J y K. Dentro de los subtipos A y F existen sub-subtipos denominados como A1- A4 y F1, F2 (16).

Además existe la presencia de virus recombinantes, para la generación de virus recombinantes se requiere que 2 virus infecten a la misma célula, esto puede ser en una misma transmisión o en varios episodios de transmisión. Esta recombinación se puede dar entre diferentes cepas del mismo subtipo (intra-subtipo), entre cepas de diferentes subtipos (inter-subtipos) o entre cepas de diferentes grupos (inter-grupos) (16, 17).

La recombinación en los retrovirus requiere que los genomas virales genéticamente distintos sean co-encapsidados en cada virión, estos viriones

deben infectar productivamente una célula, permitiendo la generación de partículas heterocigóticas. En un ciclo infectivo posterior, puede generarse un genoma recombinante mediante saltos alternativos de la transcriptasa reversa entre ambos genomas co-encapsidados (18).

La fácil recombinación del VIH-1 ha llevado al surgimiento de formas recombinantes circulantes (CRF por sus siglas en inglés). Antes de designar a una nueva forma como CRF, deben caracterizarse 3 virus sin relación epidemiológica entre ellos, con los mismos patrones de recombinación y agrupación permanente en árboles filogenéticos. Las CRF se designan con números consecutivos a medida que se van describiendo, seguido por los subtipos de donde proviene, o cpx cuando derivan de más de 2 subtipos(18).

Hasta el momento se han identificado 72 CRF distribuidas en todos los continentes (19). La recombinación tanto in vitro como in vivo puede ligar mutaciones en el VIH-1 y aumentar la resistencia a un determinado fármaco antirretroviral (20) o generar virus multirresistentes (21).

1.5 Epidemiología

Para el 2013 se estimó que existían 35 millones de personas en el mundo viviendo con VIH y 2.1 millones de nuevos infectados, siendo África el continente con

mayor cantidad de casos, concentrándose su mayoría en África Subsahariana (Figura 2) (2).

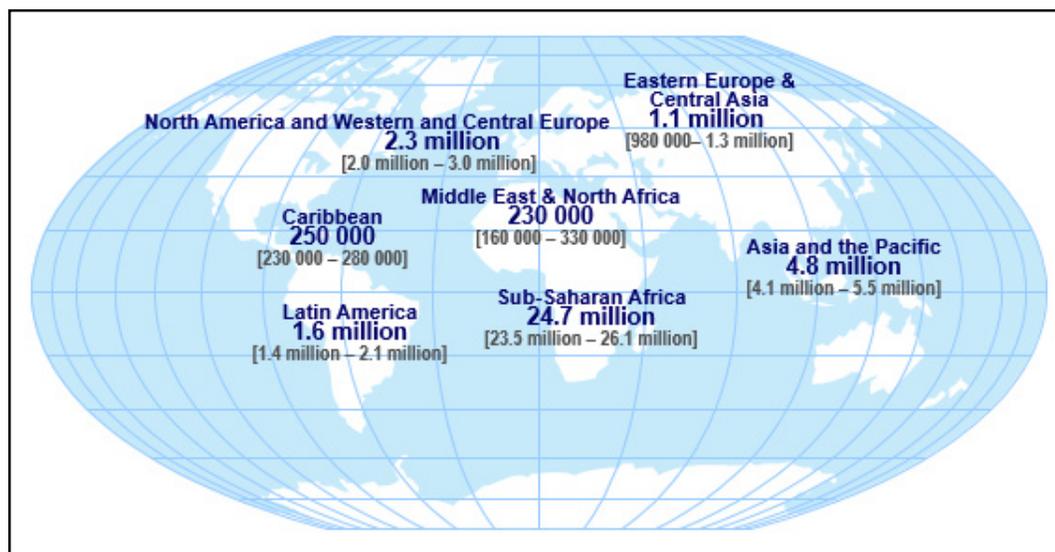


Figura 2. Número estimado de casos de personas viviendo con VIH para el 2013 según la distribución geográfica. Tomada de Core epidemiological slides HIV/AIDS estimates. 2014 (2).

En el Ecuador hasta el 2010 habían 18524 personas viviendo con VIH, de las cuales 6765 recibían ARV (22). En el 2009 se diagnosticaron 4041 nuevos casos, presentando una tasa de incidencia de 22,5 x 100000 habitantes (22)

La tasa de incidencia de VIH y SIDA para el 2010 fue de 27,72 y 9,09 x 100000 habitantes respectivamente. El sector poblacional más afectado era el grupo de personas con edades que comprendían entre los 20 y 44 años. La mayor tasa de

incidencia se presentó en la Costa, principalmente en la provincia del Guayas (22).

1.6 Distribución geográfica de los subtipos del VIH-1

Las formas genéticas con mayor prevalencia en todo el mundo son los subtipos A, B, C, D, y G. El subtipo A se localiza principalmente en África del este, oeste y central. El subtipo B está expandido globalmente, con predominio en América, China, Europa y África del Norte. 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, India y Brasil. Los subtipos D y G tienen la mayor prevalencia en África y Europa (23, 24).

1.7 Terapia Antirretroviral

1.7.1 Agentes antirretrovirales y resistencia viral

En sus inicios el tratamiento fue administrado en forma de monoterapia, siendo la zidovudina el primer fármaco en administrarse (25). Su evolución incluyó la administración de una combinación de 3 fármacos antirretrovirales, lo cual dio lugar a la llamada terapia antirretroviral de alta eficacia. Esta introducción fue decisiva en la reducción de la morbilidad y la mortalidad asociada con la infección por VIH-1 y el SIDA (26). Entre los objetivos de TARVAE se encuentra la reducción de la carga viral en plasma por debajo de los límites de detección de

los ensayos más sensibles (<50 copias de ARN/mL) y por el máximo tiempo posible, además de la restauración de la función inmune mediada por los linfocitos CD4 (27).

Existen aproximadamente 30 drogas que han sido aprobadas por la FDA (Food and Drug Administration) para el tratamiento de pacientes infectados con VIH-1 (28). Están divididas en 5 grupos distintos (29):

- a. Inhibidores de la transcriptasa inversa por análogos de nucleósidos (NRTI por sus siglas en inglés)
- b. Inhibidores de la transcriptasa inversa por nucleósidos no análogos (NNRTI por sus siglas en inglés)
- c. Inhibidores de la Integrasa
- d. Inhibidores de la Proteasa
- e. Inhibidores de la fusión

Una buena adherencia al tratamiento puede suprimir la replicación viral por varios años; sin embargo la terapia no elimina la infección. Se sugiere que algunos de los problemas relacionados con la terapia pueden deberse a mala adherencia, pobre tolerabilidad de la droga e interacciones entre las drogas ARV y otros medicamentos (30).

En el país se da inicio de la TARV cuando el conteo de células CD4 en pacientes asintomáticos es menor a 500 células/mL (31).

1.7.2 Inhibidores de la transcriptasa inversa por análogos de nucleósidos/nucleótidos (NRTI)

Los NRTI inhiben la transcriptasa inversa mediante un mecanismo competitivo y se dividen en análogos de purinas (didanosina y guanosina) y análogos de pirimidinas (timidina y citidina) (32).

Los NRTI se incorporan a la cadena de ADN provírico naciente, interrumpiendo la elongación de la misma y a la vez la replicación viral. Esto ocurre porque los NRTI no poseen el grupo OH en la terminación 3' para la formación de puentes fosfodiéster, actuando como terminadores de la cadena (32).

Estos compuestos pueden actuar indistintamente durante la síntesis de la cadena de ADN-ARN dependiente, como durante la síntesis de la cadena de ADN-ADN dependiente (30).

1.7.3 Resistencia a los fármacos de la familia NRTI

Como en el resto de las terapias antirretrovirales, los tratamientos con cualquiera de estos compuestos a menudo inducen la aparición de cepas de VIH-1 que tienen disminuidas la susceptibilidad a la droga. Se plantea que la resistencia a los análogos se debe a dos mecanismos. El primero relacionado con la pirofosfolisis dependiente de ATP, la que provoca la eliminación del análogo

incorporado en la posición 3' terminal de la cadena que se está formando y que por ende revierte la acción del antirretroviral. En el segundo mecanismo se reduce la afinidad por el análogo, pero se mantiene la afinidad al desoxinucleótido natural (33).

Las mutaciones que ocurren en la transcriptasa reversa viral responsable de la pérdida de la sensibilidad a los análogos se clasifican como: mutaciones asociadas a nucleósidos/nucleótidos (NAM) o mutaciones relacionadas con análogos de timidina (TAM) (32). Las TAM son las responsables de accionar el mecanismo de pirofosfolisis y por tanto de la eliminación del AZT y el d4T (30).

Existen otras mutaciones con diferentes mecanismos a las otras clases de drogas pero que no son resumidos aquí por no constituir uno de los objetivos trazados.

1.8 Ensayos para determinar resistencia a los antirretrovirales

La caracterización, prevención y manejo clínico de la resistencia viral a los fármacos determinaron el rápido desarrollo de nuevas tecnologías para su estudio.

Actualmente se utilizan 2 metodologías para detectar la resistencia: ensayos genotípicos y ensayos fenotípicos.

1.8.1 Ensayos genotípicos

Esta técnica consta de dos etapas: la amplificación de la región específica (genes *gag* y *pol*) y la detección de mutaciones. La amplificación se realiza mediante técnicas de PCR y la detección de mutaciones puede realizarse por 3 técnicas diferentes: secuenciación de ADN, hibridación y ensayos de sondas en línea. La secuenciación de ADN es el método de referencia, en ella se determina la secuencia de nucleótidos de las regiones del genoma anteriormente amplificadas y se comparan con secuencias de referencia del VIH-1, para determinar la presencia de las diferentes mutaciones (34).

La secuenciación puede ser por método químico conocido como el Método de Maxam y Gilbert, y el método enzimático conocido como el Método de Sanger (35), este último presenta varias modificaciones, siendo una de ellas la pirosecuenciación.

1.8.1.1 Secuenciación de Sanger

Este método fue descrito por *Sanger et al* en 1977 y se lo conoce como el método de Sanger o el método con inhibidores de terminación de cadena (36).

Se utilizan cuatro reacciones de secuenciación en paralelo para secuenciar una sola muestra. Cada reacción implica un molde de cadena sencilla, un cebador específico para iniciar la reacción, los cuatro desoxinucleótidos estándar (dATP,

Figura 3. Separación de fragmentos y análisis en la secuenciación por el método de Sanger. Detalla brevemente la secuenciación de Sanger desde la separación de la hebra (punto 1), pasando por las cuatro reacciones para separar cada nucleótido mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (paso 2 y 3), hasta llegar al análisis del patrón de banda (paso 4). Tomada de Luque y Herráez 2006 (35).

El inicio de la automatización de este método fue en 1986 gracias a *Smith et al* (38). La secuenciación se realiza en tiempo real (38), esto puede ser posible gracias a que se agrega un fluorocromo distinto en cada una de las 4 reacciones para la síntesis (35), convirtiéndose en el precursor del sistema de genotipificación ViroSeq HIV-1.

Actualmente existen dos sistemas cerrados para la genotipificación de VIH que amplifican la región de la proteasa y parte de la transcriptasa reversa, utilizando formas automatizadas de secuenciación, estos sistemas son: ViroSeq HIV-1 de Applied Biosystems y Trugene HIV-1 de Siemens.

1.8.1.2 Pirosecuenciación

Esta técnica fue desarrollada por *Ronaghi et al* en 1996 y uno de sus principales usos ha sido el de genotipificación (39). *Eriksson et al* en el 2008, utilizó la

pirosecuenciación para estimar efectivamente la población viral en pacientes con VIH, comparando 165 secuencias de 4 poblaciones virales diferentes (40).

En el 2009, *Le et al* indicó que las mutaciones asociadas a resistencia de baja abundancia, puede aumentar la resistencia en el momento de fallo virológico, pero estas mutaciones suelen pasar desapercibidas en los métodos convencionales de genotipificación, demostrando así que la pirosecuenciación puede proporcionar información importante para los médicos sobre la planificación de terapias posteriores (41).

Ji et al en el 2010 demostró que la vigilancia epidemiológica de la fármacorresistencia del VIH-1 basada en pirosecuenciación agrupada es costo-competitiva para la detección de mutaciones asociadas a la resistencia en la región de la proteasa, y que al realizar modificaciones a la pirosecuenciación agrupada puede ser utilizada para determinar la tasa poblacional de mutaciones que confieren resistencia tanto en la región de la proteasa como de la transcriptasa inversa (42).

Dudley et al en el 2012 demostró que utilizando pirosecuenciación se pudo realizar secuenciación simultánea de muestras de hasta 48 pacientes, 4 veces más de otros métodos. Además este método fue 4 veces más sensible a costos 3 – 5 veces menores que en la secuenciación por el método de Sanger (43).

El sistema de pirosecuenciación está basado en un sistema enzimático y ha sido utilizado para genotipificar algunos tipos de virus (44).

La pirosecuenciación presenta varios pasos detallados a continuación (Figura 4):

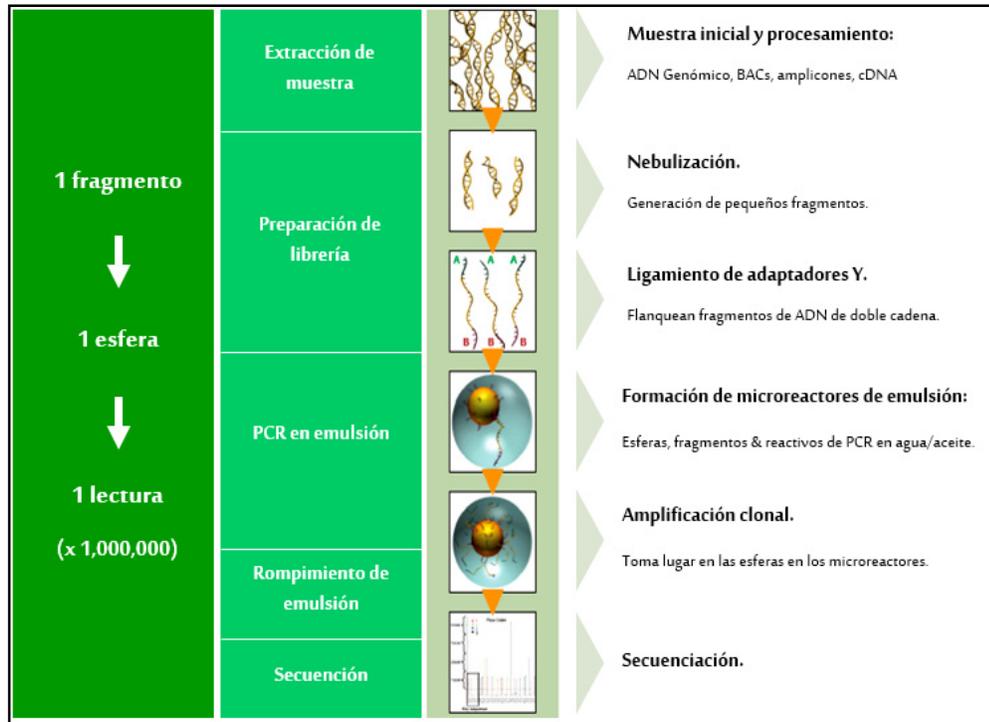


Figura 4. Pasos del proceso de pirosecuenciación.

Breve descripción del procedimiento y lo que conlleva cada uno de los pasos en la pirosecuenciación. Tomada de Hernández, 2013 (45).

El principio del proceso de secuenciación es el siguiente, la polimerasa incorpora los nucleótidos (dNTP) correspondientes, inmediatamente después se libera una molécula de pirofosfato y la sulfurilasa genera ATP a partir de la molécula

liberada. La luciferasa hidroliza el ATP y utiliza el sustrato (luciferina) para la formación de luz. La luz generada es la utilizada para la elaboración del pirograma, el cual nos servirá para realizar la lectura de secuencia (40).

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio observacional, descriptivo de corte transversal. El universo de estudio estuvo constituido por todas las muestras de plasma de los pacientes con VIH-1, con fallo al tratamiento antirretroviral recibidas junto a su respectiva ficha (Anexo A) en el laboratorio de Virología del INSPI, Guayaquil, como parte del diagnóstico del Programa Nacional de Control y Prevención del VIH/sida. El período de estudio comprendió aquellas muestras que entraron de mayo 2013 a febrero del 2014. La muestra de estudio quedó constituida por el plasma de 33 pacientes que cumplieron los criterios de inclusión en el estudio.

Los criterios de inclusión fueron: muestras de plasma que tuvieran 1mL y que hubieran estado conservadas a -80 °C. Se tomaron en cuenta muestras de pacientes cuya carga viral previa sea mayor a 20000 cp/ml.

Los criterios de exclusión fueron aquellas muestras con menor volumen, que no se hubieran conservado de forma adecuada y que tuviera una carga viral menor a 20000 cp/ml.

Las muestras de plasma procesadas en este estudio provenían de las clínicas del SIDA de diferentes hospitales de las provincias de Pichincha, Guayas, Esmeraldas, Los Ríos y El Oro, y pertenecen al proyecto INSPI – ESPOL “Epidemiología Molecular del VIH-1 en el Ecuador”, auspiciado por SENESCYT.

2.1. Experimentos realizados

Para determinar la presencia de mutaciones asociadas o no a resistencia a drogas ARV, se realizó estudios de PCR y secuencia del gen *pol* y *gag*.

Flujo de trabajo

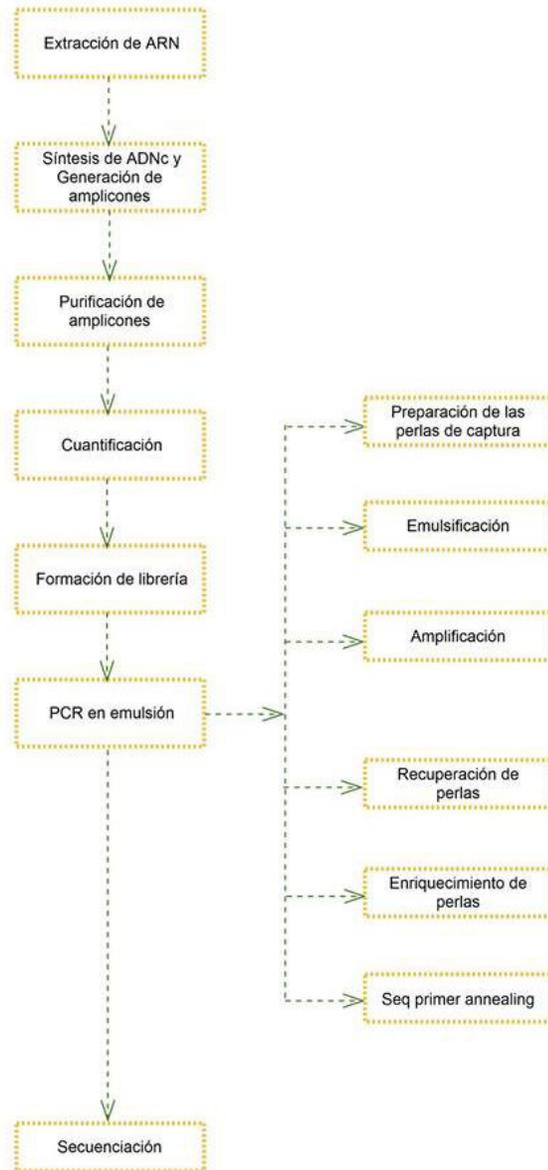


Figura 5. Flujo de trabajo. Detalla los pasos que deben realizarse en la técnica de genotipificación por pirosecuenciación.

2.2. Extracción de ARN

Se usó High Pure Viral Nucleic Acid Large Volume Kit (Roche) para la extracción de ARN, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se agregó 2 μ l de MS2 RNA al final de la extracción, para evitar la degradación del ARN extraído.

Equipos y materiales

- Tubos falcon de 50 ml
- Tubos falcon de 15 ml
- Microtubos de 1.5 ml
- Micropipetas
- Centrífuga de tubos
- Pipetas serológicas
- Baño maría
- Microcentrífuga

Reactivos

- High Pure Viral Nucleic Acid Large Volume Kit (Roche)
- MS2 RNA (Roche)
- Etanol

Metodología

- a. En un tubo de 15 ml se agregó 1ml de plasma más 1 ml de binding buffer suplementado con 15 µl de poly A y 250 µl de proteinasa K.
- b. Se mezcló inmediatamente y se incubó en baño maría a 70°C por 15 minutos.
- c. Se sacó del baño maría y se mezcló con 400 µl de binding buffer.
- d. Se transfirió toda la mezcla a los tubos falcon de 50 ml ensamblados con columna interna con filtro y luego se procedió a centrifugar por 5 minutos a 4000 g.
- e. Se removi6 la columna interna y se coloc6 dentro de un tubo colector y posteriormente se agreg6 500 µl de inhibitor buffer.
- f. Se centrifug6 por 1 minuto a 8000 g.
- g. Se descart6 el sobrenadante y el tubo colector.
- h. Posteriormente se coloc6 la columna dentro de un nuevo tubo colector y se agreg6 450 µl de wash buffer.
- i. Se centrifug6 por 1 minuto a 8000g y se descart6 el sobrenadante.
- j. Se repitieron los pasos h – i una vez m6s.
- k. Luego se centrifug6 por 30 segundos a m6xima velocidad (13000 g) y se descart6 el tubo colector.

l. Se procedió a colocar la columna en tubo de 1.5 ml, añadiendosele 50 μ l de elution buffer y centrifugando por 1 min a 8000 g.

m. Se descartó la columna y se agregó 2 μ l de MS2 RNA a cada producto de extracción.

2.3. Síntesis de ADNc y generación de amplicones

Se usó HIV Primer Set YELLOW (Roche) para la síntesis de ADNc y la generación de amplicones, siguiendo el protocolo del manual GS Junior Training (Roche) (43). Luego de obtener los amplicones se realizó un control migrando los amplicones en un gel de agarosa al 2%, se valoró la migración de las bandas al visualizar el gel en un foto-documentador donde debía observarse una banda de 400 bp aproximadamente.

Equipos y materiales

- Cabina de flujo laminar
- Centrifuga de placas
- Micropipetas
- Microtubos de 1.5 ml
- Cooler
- Vortex
- Mini spin
- Termociclador

- Lámina selladora de placas

Reactivos

- HIV Primer Set YELLOW (Roche)
- Agua ultrapura
- Protector RNase Inhibitor (Roche)
- Transcriptor Reverse transcriptase (Roche)
- RNase H (Roche)
- 10 mM dNTP mix (Roche)
- FastStart High Fidelity Polymerase (Roche)
- FastStart High Fidelity 10X buffer #2 (Roche)

Metodología

- a. Se procedió a centrifugar el HIV cDNA Primer Plate y el HIV RTP PCR Primer Plate por 30 segundos a 900 g.
- b. Se abrió el HIV cDNA Primer Plate dentro de la cabina de extracción y se le agregaron 13 µl del ARN extraído de la muestra a cada pocillo de las filas A y C.
- c. Se selló la placa y se centrifugó por 30 segundos a 900 g.
- d. Se llevó la placa al termociclador a 65°C por 10 minutos, al terminar inmediatamente se llevó la placa a un cooler por 2 minutos.
- e. Posteriormente se centrifugó la placa por 30 segundos a 900 g.

- f. La placa se llevó a la cabina, se retiró el adhesivo de la placa y se colocaron 7 μ l del RT master mix en los mismos pocillos donde se habían colocado las muestras. La preparación del mix se realizó en el Área Blanca (Anexo B).
- g. Se selló la placa y se centrifugó por 30 segundos a 900 g.
- h. Se colocó la placa en el termociclador. El perfil de temperatura se muestra en el Anexo B.
- i. Se sacó la placa del termociclador y se centrifugó por 30 segundos a 900 g.
- j. Se llevó a la cabina, se le retiró el adhesivo a la placa y se colocó 1 μ l de RNAse Inhibitor en los mismos pocillos anteriores.
- k. Se selló la placa y se centrifugó por 30 segundos a 900 g.
- l. Posteriormente se colocó la placa en el termociclador a 37°C por 20 minutos.
- m. Luego se centrifugó la placa por 30 segundos a 900 g.
- n. En la cabina de Área Blanca, se dispensaron 22 μ l del PCR de master mix en los pocillos de la fila A hasta la fila D de HIV RTP PCR Primer Plate, la preparación del mix se realizó en el Área Blanca (Anexo B).
- o. Se llevó la placa a la cabina de extracción y se agregaron 3 μ l de ADNc, de la fila A a las filas A y B, y de la fila C a las filas C y D.
- p. Se selló la placa y se centrifugó por 30 segundos a 900 g.

q. Se colocó la placa en el termociclador, el perfil de temperatura se muestra en el Anexo B.

r. La placa se mantuvo en frío hasta el siguiente paso.

2.4. Purificación de Amplicones

Se usó AxyPrep™ Mag PCR Clean-Up (Axygen) para la purificación de amplicones siguiendo el protocolo del manual GS Junior Training (Roche) (43).

Equipos y materiales

- Centrifuga de placas
- Placa de fondo redondo
- Pipeta multicanal
- Placa magnética
- Termociclador
- Lámina selladora de placas

Reactivos

- Buffer TE 1X
- AxyPrep™ Mag PCR Clean-Up (Axygen)
- Etanol

Metodología

a. Se centrifugó la HIV RTP Primer Plate durante 30 segundos a 900 g.

- b. Se colocaron 22.5 μ l de agua ultra pura en los pocillos de la fila A hasta la D y de la columna 1 a la 11 de una placa de fondo redondo.
- c. Se transfirieron 22.5 μ l de los amplicones a cada pocillo, dejando vacía la columna 12. Se mantuvo refrigerado hasta el siguiente paso.
- d. Se le dio vortex a las perlas, y con una pipeta multicanal se agregaron 45 μ l de perlas a cada uno de los pocillos, exceptuando la columna 12 y esto se realizó pipeteando 12 veces en cada pocillo.
- e. Se incubó 10 minutos a temperatura ambiente.
- f. Posteriormente se colocó la placa sobre el magneto por 5 minutos a temperatura ambiente
- g. Se retiró con la pipeta multicanal el sobrenadante, direccionando siempre las puntas de la pipeta al centro del pocillo para evitar coger las perlas.
- h. Se realizó el lavado que consistió en retirar la placa del magneto para dispensarle 100 μ l de etanol 70%, se agitó la placa manualmente dando pequeños golpes a los lados.
- i. Se colocó la placa sobre el magneto por 1 minuto y se retiró cuidadosamente el sobrenadante.
- j. Se repitieron los pasos h e i 2 veces, en el último lavado se extrajo todo el remanente de alcohol.

- k. Posteriormente se incubó la placa en el termociclador a 40°C por 4 minutos, con el objetivo de que se evaporara todo el etanol.
- l. Se colocó la placa sobre el magneto, agregando 10 µl de buffer TE 1X y se incubó por 2 minutos a temperatura ambiente.
- m. Luego se recuperó el sobrenadante sin perlas y se colocó en otra placa, posteriormente se selló esta placa y se refrigeró.

2.5. Cuantificación por fluorescencia (PicoGreen)

Se usó Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit para la cuantificación siguiendo el protocolo del manual GS Junior Training (Roche) (43).

Equipos y materiales

- Fluorómetro
- Vortex
- Placa de color negro

Reactivos

- Buffer TE 1X
- Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit

Metodología

- a. Se rotularon 8 tubos de 1.5 ml
- b. Se dispensaron 441 µl de TE 1X al tubo 1
- c. Se dispensaron 225 µl de TE 1X del tubo 2 al 8

- d. Luego al tubo 1 se le agregaron 9 μl de DNAstandar, para obtener una dilución 1:50.
- e. De la dilución anterior se pasaron 225 μl al tubo 2, se le dio vortex por 10 segundos y así sucesivamente se hicieron las diluciones hasta llegar al tubo 7, pues el tubo 8 fue el blanco.
- f. Una vez lista las diluciones, se transfirieron 100 μl a los pocillos de la placa de color negro, como se indica en el Anexo C.
- g. Se colocaron 99 μl de TE 1X en los pocillos de la fila A a la D y de la columna 1 a la 11 en la placa negra.
- h. Se transfirieron 1 μl de los amplicones, exceptuando el del control negativo.
- i. Luego se transfirieron 5970 μl de TE 1X a un tubo falcon de 50 ml y se agregaron 30 μl de solución stock de PicoGreen.
- j. Se colocaron 100 μl de la solución anterior en los pocillos y se homogenizó cuatro veces.
- k. Se llevó la placa al fluorómetro y se realizó la lectura tres veces.
- l. Posteriormente se realizó un promedio de la fluorescencia y con esos valores se realizó la curva. Todos los datos fueron ingresados en una tabla de Excel donde estaban aplicadas las fórmulas para los respectivos cálculos.
- m. El valor de correlación de la curva estándar debía ser mayor o igual a 0.98 ($R^2 \geq 0.98$), en caso contrario se repitió la dilución.

n. Si los valores estaban por encima de la curva estándar entonces se diluyó la muestra y se tomó en cuenta el factor de dilución para el cálculo de la concentración final. Si los valores estaban por debajo de la curva estándar se repitió la operación de la muestra.

o. Con todos los cálculos obtenidos previamente se procedió a preparar el pool primario, intermedio y final.

2.6. Formación de la Librería

La formación de la librería se realizó utilizando las especificaciones detalladas en el manual GS Junior Training (Roche) (43).

Equipos y materiales

- Placa fondo redondo
- Termociclador
- Vortex
- Microtubos de 1.5 ml
- Tubos para PCR de 0.2 ml
- Micropipetas

Reactivos

- AxyPrep™ Mag PCR Clean-Up (Axygen)
- Buffer TE 1x
- Etanol

Metodología

- a. Se temperaron las partículas magnéticas y se rotuló un tubo 0,2 ml para cada amplicón (A1-D10)
- b. Luego se calculó la dilución de cada amplicón purificado de forma tal que quedara 1×10^9 moléculas/ul (amplicón C 3×10^9 moléculas/ul, menor eficiencia).
- c. Se transfirió la cantidad calculada de TE 1x y de amplicón a cada tubo de 0,2 ml rotulado previamente (A1-D10)
- d. Luego se rotuló un tubo de 0,2 ml para cada muestra (1-10) (pool primario).
- e. Se homogenizó cada tubo con los amplicones purificados diluidos a 1×10^9 moléculas/ul.
- f. Se preparó el mix de amplicones (pool primario 1×10^9 moléculas/ul) en cada tubo de 0,2 ml. Esto se preparó mezclando 6 μ l de cada amplicón (1A, 1B, 1C y 1D para el primer tubo, así sucesivamente para los tubos siguientes).
- g. Se transfirieron 22,5 ul de cada pool primario a la placa fondo redondo (columnas 1-10) y se agregaron 22,5 ul de agua ultra pura a cada pocillo.
- h. Se le dio vortex 20 segundos a las partículas magnéticas y se agregaron 45 ul de partículas a cada pocillo de la placa de fondo redondo (aplicando vortex frecuente).
- i. Se mezcló por pipeteo con multicanal cada pocillo unas 12 veces y se incubó la placa de fondo redondo a temperatura ambiente por 10 minutos.

- j. Se incubó la placa de fondo redondo a temperatura ambiente por 5 min sobre concentrador magnético y se descartó el sobrenadante.
- k. Se removió la placa de fondo redondo del concentrador magnético y se agregaron 100 ul de etanol al 70% a cada pocillo.
- l. Se le dieron pequeños golpes (10 veces) para homogenizar.
- m. Se incubó la placa de fondo redondo a temperatura ambiente por 1 min sobre concentrador magnético y se descartó el sobrenadante.
- n. Posteriormente se repitió el lavado con etanol al 70% descartando todo el sobrenadante.
- o. Se colocó la placa de fondo redondo en el termociclador abierto a 40 °C, hasta que los pellets estén completamente secos.
- p. Se agregaron 22,5 ul de TE 1x a cada pocillo con la placa sobre el concentrador magnético.
- q. Se dieron pequeños golpes sobre el magneto para favorecer la elución.
- r. Posteriormente se incubó la placa de fondo redondo a temperatura ambiente por 2 min sobre la placa magnética
- s. Se rotularon unos tubos de 0,2 ml para cada pool primario purificado (1-10).
- t. Se transfirió el sobrenadante (22,5 ul) a cada uno de los tubos de 0,2 ml rotulados (pool primario purificado).

- u. Se transfirieron 10 ul de cada pool primario purificado a un tubo sarstedt (pool final a una concentración madre 1×10^9 moléculas/ul) (100 ul).
- v. Se guardaron los tubos de 0,2 ml con los pool primarios purificados (12,5 ul) en falcon y se conservaron a -20 °C.
- w. Se transfirieron 5 ul del pool final concentración madre (1×10^9 moléculas/ul) a un tubo 1,5ml con 495 ul TE 1x (pool final concentración intermedia 1×10^7 moléculas/ul) (500 ul).
- x. Se conservó el pool final a una concentración madre (1×10^9 moléculas/ul) (95 ul) a -20 °C (en alicuotas).
- y. Posteriormente se transfirieron 10 ul del pool final a una concentración intermedia (1×10^7 moléculas/ul) a un tubo de 1,5ml con 90 ul de TE 1x (pool final con una concentración de trabajo de 1×10^6 moléculas/ul) (librería) (100 ul).

2.7. PCR en emulsión

Se usó GS Junior emPCR Reagents (Lib-A), GS Junior Titanium emPCR Kit Oil and Breaking Kit y GS Junior Titanium emPCR Kit Bead Recovery Reagents, para la realización del PCR en emulsión, la recuperación de las perlas y el enriquecimiento de perlas, utilizando las especificaciones detalladas en el manual GS Junior Training (Roche) (46). La preparación de los reactivos se detalla en Anexos.

Equipos y materiales

- Vortex
- Termociclador
- IKA Turrax
- Placa de 96 pocillos
- Lámina selladora de placas
- Microcentrífuga
- Combitip
- Termociclador

Reactivos

- GS Junior emPCR Reagents (Lib-A)
- GS Junior Titanium emPCR Kit Oil and Breaking Kit

2.7.1. Preparación de la pre-emulsión

- a. Se agitó en el vortex el tubo de aceite de emulsión por 10 segundos a la máxima velocidad y se colocó el contenido completo (4 ml) en el tubo Turrax.
- b. Se agregaron 2 ml del mix Mock 1X en el tubo Turrax.
- c. Se programó el Ultra Turrax Tube Dispenser (UTTD) a 4000 rpm durante 5 minutos, se colocó el tubo en el UTDD y se inició para el mix de emulsión.
- d. Se removió el tubo del UTDD cuando finalizó el programa.

2.7.2. Preparación de las perlas de captura

- a. Se agregó 1 ml de wash buffer 1X a los tubos de perlas de captura A y B.
- b. Se centrifugó a la máxima velocidad (13000 rpm) por 10 segundos, luego se rotó el tubo 180° y se volvió a centrifugar por 10 segundos, a esto se le llama spin-rotate-spin y se lo realiza para nivelar el pellet.
- c. Se descartó el sobrenadante sin remover las perlas.
- d. Se realizaron los pasos a – c dos veces más.
- e. Luego se adicionaron 5 µl de la librería a los tubos de perlas de captura A y B, y se le dio vortex por 5 segundos.

2.7.3. Emulsificación

- a. Se agregaron 600 µl del mix B a las perlas de captura B, se le dio vortex y se transfirió todo el contenido al tubo Turrax, por las paredes de este.
- b. Se colocó el tubo en el UTTD, y se programó a 2000 rpm por 5 minutos.
- c. Luego se realizaron los pasos a y b con las perlas de captura A.
- d. Una vez finalizado estos pasos se removió el tubo del UTTD.

2.7.3.1. Amplificación

Dispensar la emulsión

- a. Se empleó la combitip y se colocaron 100 µl de la emulsión en los pocillos de la placa, hasta agotar todo el volumen del tubo.
- b. Luego se limpió cuidadosamente la placa para que no quedara ningún residuo de la emulsión en los espacios entre los pocillos.

- c. Se procedió a sellar la placa y llevarla al termociclador, el perfil de temperatura se muestra en el Anexo B.

2.7.4. Recuperación de perlas

Equipos y materiales

- Bomba al vacío
- Centrífuga
- Tubos de 50 ml
- Microcentrífuga
- Vortex
- MPC (Magnetic Particle Concentrator)
- Bead counter

Reactivos

- Isopropanol
- Etanol
- GS Junior Titanium emPCR Kit Oil and Breaking Kit
- GS Junior Titanium emPCR Kit Bead Recovery Reagents

2.7.4.1. Recolección de la emulsión y lavados iniciales

- a. Con la bomba al vacío se aspiró isopropanol para limpiar el equipo.

- b. Luego se colocaron 80 a 100 μ l de isopropanol en cada pocillo de la placa, con una pipeta multicanal y se aspiró este contenido, esto se recolectó en el tubo de 50 ml que se encontraba en el sistema anteriormente ensamblado.
- c. El paso anterior se repitió dos veces con 100 μ l de isopropanol por pocillo.
- d. Lentamente se aspiró un volumen adicional de 5 ml de isopropanol para quitar cualquier remanente de perlas de la peineta.
- e. Luego se removió el tubo del sistema.

2.7.4.2. Recuperación de las perlas

- a. Se puso a temperar el enhancing buffer.
- b. Se le dio vortex al tubo que contenía la emulsión.
- c. Se agregó isopropanol hasta llegar a un volumen final de 35 ml, se le dio vortex hasta que el pellet quedara suspendido.
- d. Se centrifugó el tubo a 930 g por 5 minutos y luego se procedió a eliminar el sobrenadante cuidadosamente.
- e. Se agregaron 10 ml de enhancing buffer y se le aplicó vortex en máxima velocidad.
- f. Se centrifugó el tubo a 930 g por 5 minutos y se eliminó el sobrenadante.
- g. Se le agregaron 40 ml de isopropanol y luego se le aplicó vortex.
- h. Se centrifugó el tubo a 930 g por 5 minutos y cuidadosamente se eliminó el sobrenadante.

- i. Se repitió el paso g y el h.
- j. Se le agregaron 40 ml de etanol al 100% y se le aplicó vortex.
- k. Se centrifugó el tubo a 930 g por 5 minutos y cuidadosamente se eliminó el sobrenadante.
- l. Se agregaron 40 ml de enhancing buffer y se le aplicó vortex.
- m. Se centrifugó el tubo a 930 g por 5 minutos y se retiró el sobrenadante dejando un volumen aproximado de 2 ml.
- n. Luego se transfirió la suspensión de perlas, que contiene ADN, a un tubo de 1,7 ml, sin botar la punta, para luego recuperar todo el remanente de perlas.
- o. Spin-rotate-spin a 13000 rpm por 1 minuto y se descartó el sobrenadante.
- p. Se enjuagó el tubo de 50 ml con 1 ml de enhancing buffer y se vertió este enjuague en el tubo de 1,7 ml, luego se le aplicó spin-rotate-spin y se descartó el sobrenadante.
- q. Se enjuagó el pellet con 1 ml de enhancing buffer, luego se le aplicó spin-rotate-spin y se descartó el sobrenadante.
- r. Se repitió el paso anterior una vez más.

2.7.5. Enriquecimiento de perlas

- a. Se calentó el termobloque a 65°C.
- b. Se agregó 1ml de solución melt al tubo que contiene las perlas, luego se le dio vortex y se incubó por 2 minutos a temperatura ambiente.

- c. Posteriormente se aplicó Spin-rotate-spin y se descartó el sobrenadante, este sobrenadante se almacenó para punto de control.
- d. Se repitió el paso anterior una vez más.
- e. Se agregó 1 ml de annealing buffer, se le aplicó vortex, luego spin-rotate-spin y se descartó el sobrenadante.
- f. Se repitió el paso anterior 2 veces más.
- g. Se agregaron 45 μ l de annealing buffer, 15 μ l del primer enriquecido A y 15 μ l del B, y posteriormente se aplicó vortex.
- h. Se colocó el tubo en el termobloque por 5 minutos, e inmediatamente se colocó en hielo por 2 minutos.
- i. Se agregó 1 ml de enhancing buffer y se le aplicó vortex.
- j. Posteriormente Spin-rotate-spin y se descartó el sobrenadante.
- k. Se repitió el paso i y j una vez más.
- l. Luego se agregó 1 ml de enhancing buffer y se le aplicó vortex.
- m. Posteriormente se dejó a temperatura ambiente hasta usarlo.
- n. Al tubo de tapa color café se le aplicó vortex hasta resuspenderlo completamente.
- o. Se colocó el tubo en el MPC (Magnetic particle concentrator) por 3 minutos hasta que se precipitó el pellet.
- p. Se descartó el sobrenadante con mucho cuidado.

- q. Se agregaron 500 μ l de enhancing buffer y se le aplicó vortex.
- r. Se colocó el tubo en el MPC por 3 minutos hasta que se precipitó el pellet.
- s. Se procedió a descartar el sobrenadante con mucho cuidado de no descartar perlas.
- t. Se repitieron los pasos q – s una vez más.
- u. Después de descartar el sobrenadante se retiró el tubo del magneto.
- v. Posteriormente se adicionaron 80 μ l de enhancing buffer y se le aplicó vortex.
- w. Luego se refrigeró hasta ser usado más adelante.

2.7.5.1. Enriquecimiento de las perlas cargadas con ADN

- a. Se agregaron 80 μ l de las perlas enriquecidas anteriormente al tubo que contenía las perlas recuperadas de la emulsión, se le aplicó vortex.
- b. Se colocó el tubo en el lab rotator por 5 minutos.
- c. Luego se colocó el tubo en el magneto de 3 a 5 minutos hasta la precipitación del pellet.
- d. Se rotó el tubo 180° y se esperó de 3 a 5 minutos.
- e. Se descartó el sobrenadante evitando tomar perlas.
- f. Posteriormente se lavaron las perlas con 1 ml de enhancing buffer y se repitieron los pasos c – e, de 6 a 10 veces.

2.7.5.2. Recolección de perlas enriquecidas con ADN

- a. Se coge el tubo de perlas enriquecidas y se colocaron 700 μ l de solución melt, se le aplicó vortex.
- b. Luego se colocó el tubo en el magneto hasta que se formó el pellet.
- c. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo.
- d. Se repitieron los pasos a y b.
- e. Se transfirió el sobrenadante al tubo del paso c.
- f. Se realizó spin-rotate-spin a este último tubo y se descartó el sobrenadante.
- g. Se agregó 1 ml de annealing buffer y se le aplicó vortex.
- h. Se realizó spin-rotate-spin y se descartó el sobrenadante.
- i. Se repitieron los pasos g y h.
- j. Se le adicionaron 100 μ l de annealing buffer y se le aplicó vortex.

2.7.6. Seq primer annealing

- a) Al tubo del proceso anterior se le agregaron 15 μ l del seq primer A y 15 μ l del seq primer B, y se le aplicó vortex.
- b) Se colocó el tubo en el termobloque a 65°C por 5 minutos, e inmediatamente se colocó en hielo por 2 minutos.
- c) Se agregó 1 ml de annealing buffer y se le aplicó vortex.
- d) Spin-rotate-spin y descartar el sobrenadante.

- e) Se agregó 1 ml de annealing buffer y se le aplicó vortex.
- f) Spin-rotate-spin.

2.7.6.1. Conteo de perlas

- a. Se colocó el tubo dentro del contador de perlas (bead counter).
- b. Se realizó la lectura, con el fondo del tubo en el fondo del dispositivo y con el dispositivo a nivel de los ojos.
- c. Las opciones de lectura fueron las siguientes: Si el borde del pellet se encontró entre el borde inferior y el borde superior de la hendidura del dispositivo, se removió el exceso de perlas hasta que esta quedara en el borde inferior.
- d. Si el borde del pellet quedó por debajo del borde inferior, esto significa que no obtuvimos la cantidad de perlas mínima necesaria (500000) para proceder a la secuenciación.
- e. Si el borde del pellet se encontró por arriba del borde superior, significó que se obtuvo una cantidad de perlas mayor a la máxima necesaria (2000000) y se repitió el proceso de emulsión con una cantidad 3 veces menor de ADN.

2.8. Secuenciación

Se usó GS Junior Titanium Sequencing Reagents and Enzymes, GS Junior Sequencing Buffer y GS Junior Packing Beads para preparar la PicoTiter antes de ingresar al secuenciador, siguiendo las especificaciones detalladas en el manual GS Junior Training (Roche) (47).

Antes de iniciar la secuenciación se debe realizar un pre lavado al equipo, con una duración de media hora y con los reactivos presentes en el estuche.

Equipos y materiales

- Pirosecuenciador GS Junior (Roche)
- Centrifuga de Placas
- PTP (PicoTiter Plate)
- BDD (Bead Deposition Device)
- MPC

Reactivos

- GS Junior Titanium Sequencing Reagents and Enzymes
- GS Junior Sequencing Buffer
- GS Junior Packing Beads

2.8.1. Preparación de capas

Las perlas se colocaron en el PTP en forma de capas, la descripción de las capas se detalla en el Anexo D.

2.8.1.1. Preparación de DNA beads adicionando las perlas de control XLTF

- a. Se le dio una breve centrifugación al tubo que contenía las perlas de control XLTF a 9300 RCF.

- b. Se le agregaron 6 μ l de las perlas de control a las perlas de ADN enriquecidas.
- c. Cuando el volumen resultante fue mayor a 100 μ l, se centrifugó y se extrajo el sobrenadante, dejando en el tubo aproximadamente 100 μ l.
- d. Luego se agregaron 550 μ l de BB2, se le aplicó vortex a máxima velocidad y se incubó por 2 minutos en el lab rotator.

2.8.1.2. Preparación de las packing beads

- a. Se agregó 1 ml de BB2 y se le aplicó vortex a máxima velocidad.
- b. Se lavaron las packing beads 3 veces con 1 ml de BB2 y se centrifugó a 9300 RCF por 5 minutos en cada lavado. Después de cada centrifugación se removió cuidadosamente el sobrenadante.
- c. Después del tercer lavado, se agregaron 200 μ l de BB2, se le aplicó vortex a máxima velocidad y luego se colocó el tubo en hielo.

2.8.1.3. Preparación de enzyme beads y PPiase beads.

- a. Se adicionó 1 ml de BB2 a cada tubo y se le aplicó vortex a velocidad media.
- b. Se colocaron los tubos en el MPC, durante 30 segundos y posteriormente se rotaron los tubos unos 180° durante 30 segundos más.
- c. Luego se removió el sobrenadante y se sacaron los tubos del MPC.

- d. Luego se lavaron ambos tipos de perlas 3 veces con 1 ml de BB2, se le aplicó vortex y se recolectaron las perlas usando el MPC.
- e. Después del tercer lavado, se adicionaron 400 µl de BB2 a enzyme beads y 410 µl a PPiase beads, se les aplicó vortex a velocidad media y se mantuvieron los tubos en hielo.

2.8.1.4. Preparación de la capa 1 y 3.

- a. Se comenzó este paso rotulando dos nuevos tubos uno con capa 1 y el otro con capa 3.
- b. La preparación de estas capas se detalla en el Anexo D.

2.8.1.5. Preparación de la mezcla de DNA beads (perlas enriquecidas) y Packing beads.

- a. Se retiró el tubo de perlas enriquecidas del lab rotator.
- b. Posteriormente se le dio una breve centrifugación a 9300 RCF por 10 segundos para formar el pellet.
- c. Luego se removió una parte del BB2 hasta dejar aproximadamente 50 µl (se calculó el volumen del sobrenadante a remover desde un volumen conocido de perlas de ADN enriquecidas más 6 µl de perlas de control XLTF más 500 µl de BB2).
- d. Se le aplicó una breve centrifugación a los tubos de la polimerasa y al del cofactor de polimerasa a 9300 RCF por 5 segundos.

- e. Posteriormente al tubo de perlas enriquecidas se le agregaron 40 μ l de polimerasa, 20 μ l de cofactor de polimerasa y 65 μ l de BB2.
- f. Se le aplicó vortex a velocidad baja durante 5 segundos y se incubó en el lab rotator durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- g. Luego se le aplicó vortex a máxima velocidad.
- h. A la mezcla anterior se le agregaron 175 μ l de packing beads, se le aplicó vortex a baja velocidad y se incubó en el lab rotator por 5 minutos a temperatura ambiente.

2.8.1.6. Depósito de la capa 1

- a. Se le aplicó vortex al tubo de la capa 1 a baja velocidad por 5 segundos hasta obtener una suspensión homogénea.
- b. Inmediatamente después se tomaron 350 μ l de la suspensión dentro del PTP, a través del orificio del BDD.
- c. Se centrifugó el BDD a 1620 RCF por 5 minutos.

2.8.1.7. Depósito de la capa 2

- a. Se removió el BDD de la centrifuga y con una pipeta se removió la mayor cantidad de sobrenadante.
- b. Luego la mezcla que se estaba incubando del lab rotator se debe coger y dar una breve centrifugación a 9300 RCF por 5 segundos.

- c. Dicha mezcla, se suspende pipeteando 5 veces e inmediatamente se cogieron 350 μ l de esta suspensión y se colocaron dentro del PTP.
- d. Luego se centrifugó el BDD a 1620 RCF por 10 minutos.

2.8.1.8. Depósito de la capa 3

- a. Se removió el BDD de la centrifuga y con una pipeta se removió la mayor cantidad de sobrenadante de la capa 2.
- b. Luego se le aplicó vortex al tubo de capa 3 a velocidad media por 5 segundos hasta obtener una suspensión homogénea.
- c. De esta suspensión se cogieron 350 μ l y se aplicó dentro del PTP.
- d. Posteriormente se centrifugó el BDD a 1620 RCF por 10 minutos.

2.8.1.9. Depósito de la capa 4

- a. Se removió el BDD de la centrifuga y con una pipeta se removió la mayor cantidad de sobrenadante de la capa 3.
- b. Luego se le aplicó vortex al tubo de PPIase beads a velocidad media por 5 segundos hasta obtener una suspensión homogénea.
- c. Luego se aplicaron 350 μ l de esta suspensión dentro del PTP.
- d. Posteriormente se centrifugó el BDD a 1620 RCF por 10 minutos.
- e. Y se removió el sobrenadante.
- f. Se sacó el PTP del BDD y se lo colocó en el equipo, se programó y se inició la secuenciación.

Las secuencias resultantes son editadas automáticamente por el software Deep Chek (Advanced Biological Laboratories).

2.9. Análisis de la resistencia

Las mutaciones que confieren resistencia a los ARV, así como los niveles de resistencia se identificaron mediante el algoritmo de interpretación de resistencia genotípica de Stanford HIVdb, versión 6.2.0 de la Universidad de Stanford, EUA (<http://hivdb.stanford.edu/pages/documentPage/drm.html>).

Para facilitar el análisis, los niveles de resistencia definidos en este algoritmo fueron re-clasificados en 3 niveles, combinando la resistencia potencialmente baja con la resistencia baja en la sola categoría de resistencia baja (RB), por lo que los grupos quedaron definidos como: susceptible (S), resistencia intermedia (RI) y resistencia alta (RA).

Los niveles de resistencia a los NRTI se calcularon mediante la determinación del promedio del porcentaje de RA, RI y RB de cada medicamento individual que pertenece a cada clase de droga. Se consideró como resistencia a una clase completa (FCR), si el virus estudiado presentaba algún tipo de resistencia a todos los medicamentos incluidos en una clase, pudiendo preservar la sensibilidad a los de otra clase de drogas.

2.10. Análisis estadístico

Se determinaron las frecuencias absolutas y relativas de las variables estudiadas.

Las variables incluyeron las mutaciones que confieren resistencia y las que no confieren resistencia a los ARV a las poblaciones virales presentes en las muestras de plasma analizadas.

Se recogieron datos de la ficha de resistencia del Programa Nacional de VIH/sida.

Los datos recogidos con su número de identificación, abarcaron las siguientes variables de estudio: edad (dividida en <10, 10-19, 20-29, 30-39, 40-49 y >50 años), sexo (femenino o masculino), preferencia sexual (heterosexual, homosexual o bisexual), terapia antiretroviral (medicamentos, número de terapias), valor de la última carga viral (dividida en 20000-100000, 100000-1000000, >1000000 copias/mL) y valor de los linfocitos T CD4+ (divididos en <200, 200-350, 350-500, >500 células).

Cada muestra se recibió con su respectiva ficha, en muchos casos con datos incompletos, en la tabla se exponen los datos encontrados.

Tabla III. Pacientes con datos según lo obtenido en la ficha personal.

Pacientes estudiados	Tipo de ARV	CV	CD4	Sexo		Edad						Preferencia Sexual		
				M	F	0-9	10-19	20-29	30-39	40-49	50-59	HT	HM	BS
27	22	27	22	14	13	6	6	5	3	5	2	7		1

Se elaboró una base de datos en Excel considerando los resultados obtenidos, las características anteriormente señaladas recogidas en la ficha de resistencia del Programa Nacional de VIH/sida para la determinación de frecuencias.

Las variables cuantitativas continuas (edad, carga viral y conteo de células CD4) fueron analizadas también a través de la mediana, considerando los valores mínimo y máximo.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

Se estudiaron un total de 33 pacientes infectados con VIH, con resistencia al tratamiento ARV (Tabla 4). La mediana de la edad fue de 26 años, predominó el sexo masculino (51,9%), siendo los heterosexuales (HT) los más representados con el 25,9%. La mediana del recuento de células T CD4+ más cercana al momento de la toma de muestra fue de 231,5 células/mm³ y la de la carga viral de 104030 copias de ARN/mL.

Tabla IIV. Características de la población

Pacientes (n (%))	33 (100)
Edad en años al muestreo mediana (mínimo-máximo)	26 (1-53)
Género masculino (n (%))	14 (51,9)
Conteo de células T CD4+ más cercana al momento del muestreo mediana en cels/mm ³ (mínimo-máximo)	231,5 (21-1238)
Carga viral más cercana al momento del muestreo mediana en copias de ARN/mL (mínimo-máximo)	104030 (20623-1580860)

3.1 Análisis de mutaciones del gen de la Transcriptasa Inversa

Las secuencias obtenidas pertenecen al gen de la TI del VIH-1. Se encontraron un total de 106 mutaciones en el gen de la transcriptasa inversa, de las cuales 15 están asociadas a resistencia a uno o varios de los medicamentos de la familia de los NRTI, y las 91 restantes no confieren resistencia conocida (Figuras 7, 8 y 9).

Dentro de las mutaciones encontradas en la región de la TI que confieren resistencia, la más frecuente fue: M184V/I (Figura 7). También se encontró un

gran número de mutaciones que no están asociadas con resistencia, algunas de ellas muy frecuentes (Figura 8).

Hubo mutaciones menos frecuentes pero de gran importancia como la M41L, L210W y T215F/Y. Estas mutaciones confieren resistencia a todos los análogos de Timidina (AZT y D4T) y resistencia cruzada a ABC, ddI y TDF.

La frecuencia de mutaciones que confieren resistencia encontradas en poblaciones mayoritarias (>20%) es menor a la frecuencia de mutaciones en población total (poblaciones mayores a un 1%) (Figura 9).

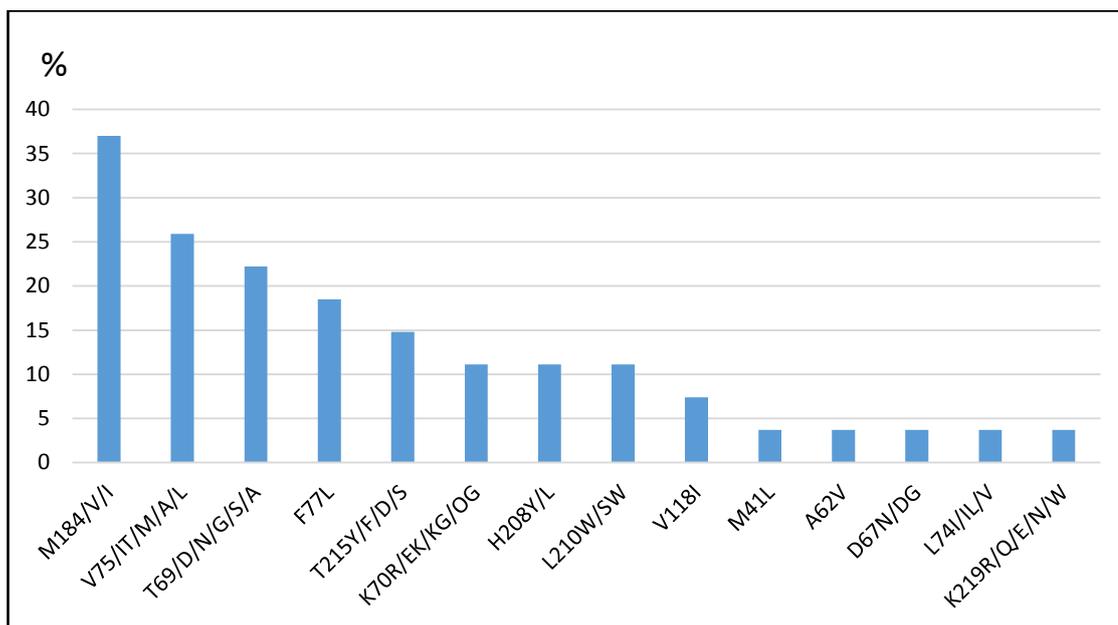


Figura 6. Porcentaje de pacientes con poblaciones de VIH-1 con mutaciones asociadas a resistencia a los ARV.

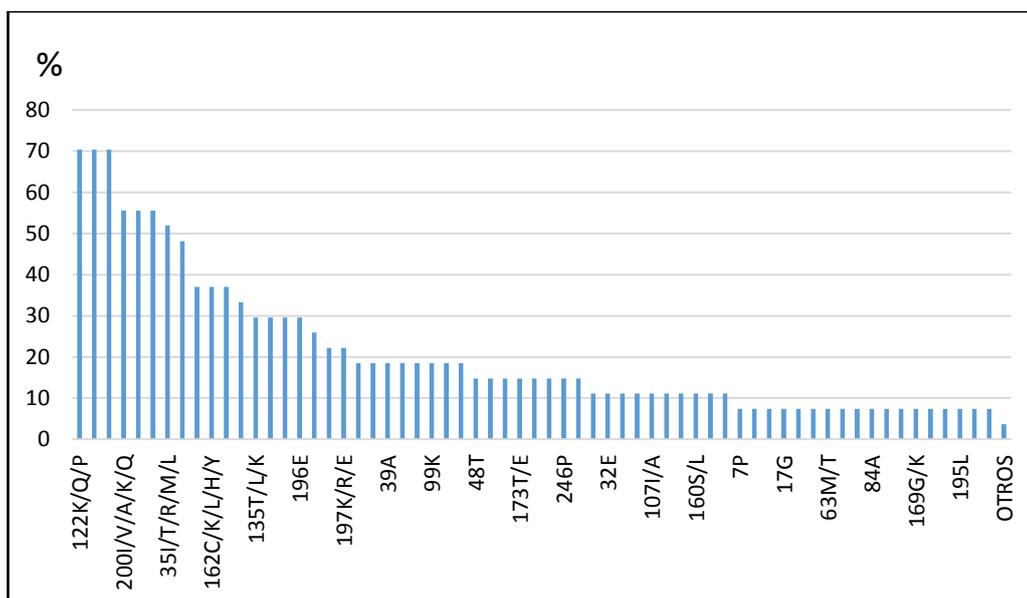


Figura 7. Porcentaje de pacientes con poblaciones de VIH-1 con mutaciones que no están asociadas a resistencia a los ARV

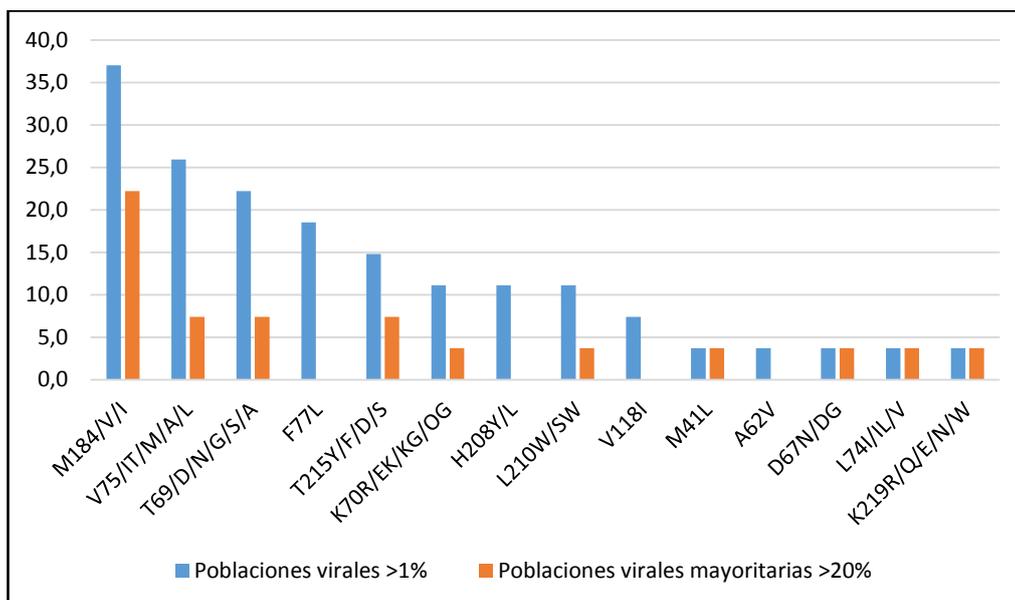


Figura 8. Porcentaje de pacientes con poblaciones de VIH-1 con mutaciones asociadas resistencia a los ARV, en cuanto a poblaciones retrovirales mayoritarias (>20%) y a todas las poblaciones retrovirales analizadas.

3.2 Resistencia a los medicamentos de la familia NRTI

Se encontró que 12 pacientes (45%) tienen mutaciones que confieren sensibilidad a todos los medicamentos de la familia NRTI sin presentar resistencia alguna y 2 pacientes (7%) con mutaciones cuyos resultados fueron inconclusos (S[^]NC). Los 13 pacientes (48%) restantes presentan mutaciones que generan resistencia a varios o a todos los medicamentos de esta familia (Figura 10).

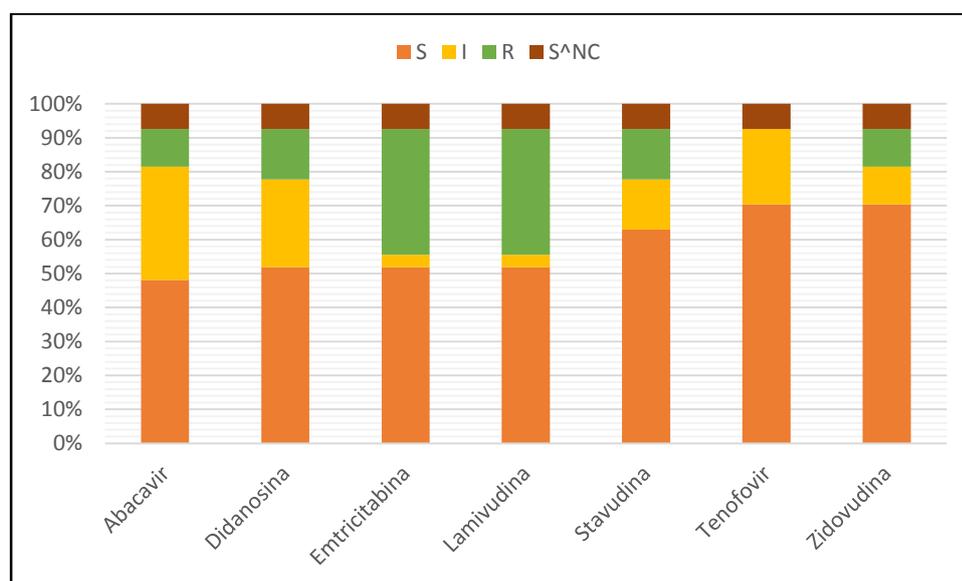


Figura 9. Niveles de resistencia a los NRTI.

De los 27 pacientes, se encontraron 3 pacientes (11%) con FCR (Full Class Resistance). El 40% de pacientes presentaron mutaciones que producen resistencia al 3TC pero el 81% de los pacientes recibió este medicamento en algún esquema del tratamiento, un hallazgo similar se encuentra en el TDF y el AZT. Con el d4T ocurrió totalmente lo opuesto, existe una mayor cantidad de pacientes con mutaciones que confieren resistencia a este medicamento en relación a los pacientes que recibieron este medicamento, al igual que para el ABC, el DDI y el FTC (Figura 11).

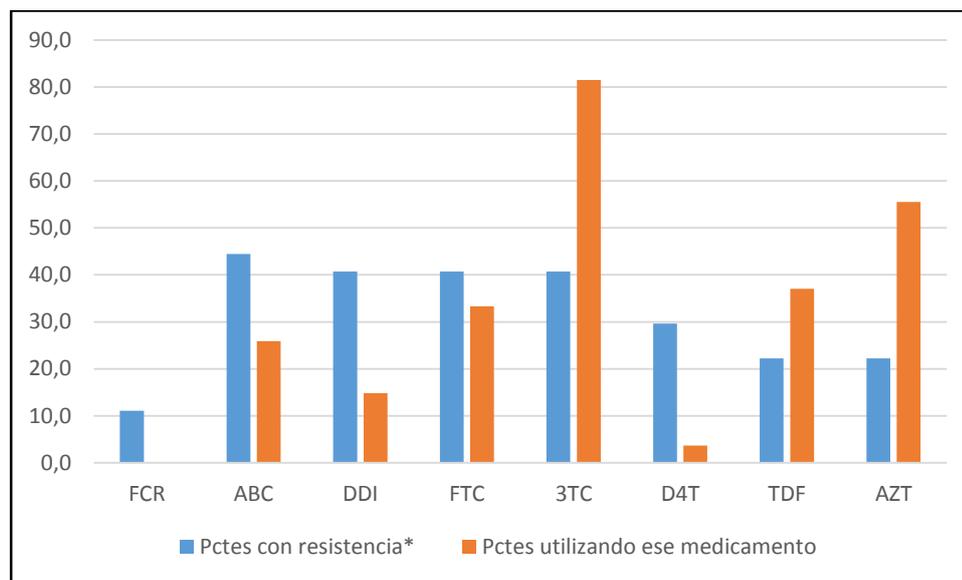


Figura 10. Porcentaje de pacientes con poblaciones de VIH-1 que presentan resistencia a los medicamentos NRTI y de pacientes utilizando los ARV.

3.3 Resistencia a los NRTI y las características de la muestra estudiada

Se encontró una mayor cantidad de mutaciones que producen resistencia en hombre que en mujeres, incluyendo a los 3 pacientes con FCR (Figura 12). Además, ninguna mujer presentó mutaciones que generan resistencia al AZT.

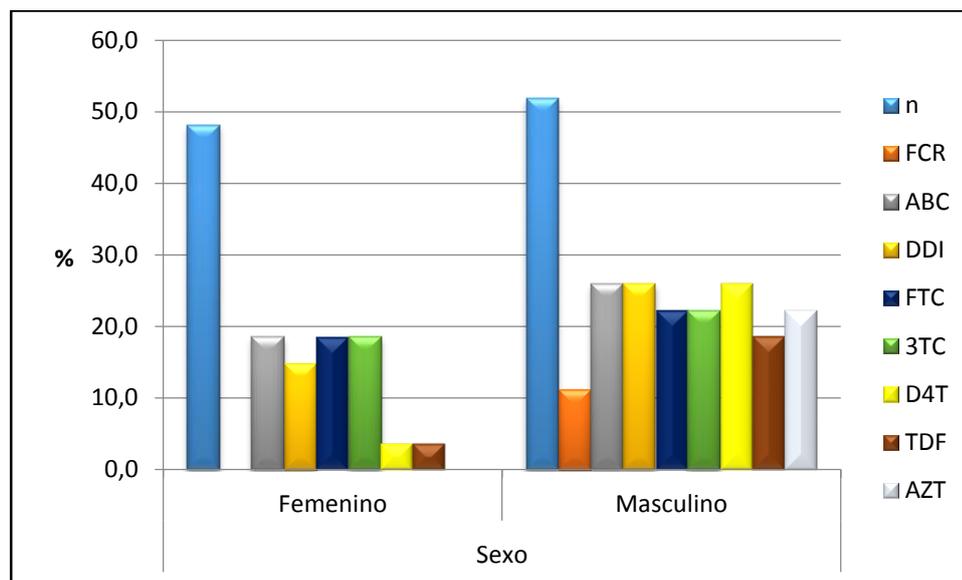


Figura 11. Porcentaje de pacientes con poblaciones de VIH-1 que presentan resistencia a los medicamentos NRTI según sexo.

Al analizar los valores del conteo de células T CD4+, se encontró que de los pacientes que tenían datos de un conteo de CD4 cercano a la toma de la muestra analizada, el 50% presentaba valores muy bajos (<200 células/mm³). Solamente menos del 30% de los pacientes tenían un conteo de CD4 mayor a 500 células/mm³ (ver Anexo K).

Si analizamos los niveles de carga viral y la presencia de mutaciones que confieren resistencia a los ARV (ver Anexo K) se observa que todos los pacientes con alguna mutación tuvieron una alta carga viral (mayor a 20 000 copias/ml). Cabe señalar que el 50% o más de los pacientes con mutaciones que confieren resistencia a alguno de los ITIAN tenían una carga viral muy elevada (mayor a 100 000 copias/ml).

3.4 Subtipos

De los 27 pacientes, 21 pacientes presentaron subtipo B, 3 pacientes subtipos 28_BF y en 3 pacientes no hubo información del subtipo (Figura 13). En los subtipos encontrados se encontraron mutaciones que confieren resistencia y FCR de forma proporcional a la cantidad de pacientes de cada grupo.

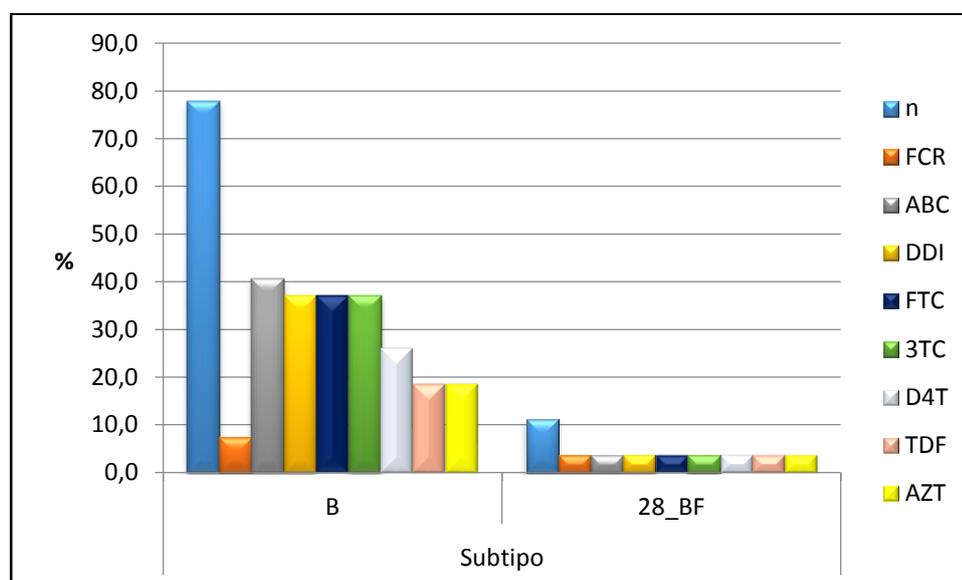


Figura 12. Porcentaje de pacientes con poblaciones de VIH-1 que presentan resistencia a los medicamentos NRTI según subtipo viral.

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

En el estudio se analizaron 33 muestras, de las cuales 27 generaron resultados y 6 no lo presentaron. Se especula de algunos factores que impidieron obtener resultados de estas seis muestras, entre los cuales destacamos, en primer lugar, la falta de conocimiento de la carga viral reciente, en segundo lugar, problemas de temperatura durante el almacenamiento por fallos o variaciones en el fluido eléctrico. En el caso de las muestras que llegaron de provincia, existe la posibilidad que no se respetó la debida cadena de frío. Finalmente, no se dispuso de una segunda alícuota de muestra para repetir el procedimiento.

El sexo masculino es el de mayor incidencia de la infección por VIH en la epidemia ecuatoriana, según los informes del ministerio de salud pública (8), sin embargo estas diferencias en la proporción de infectados en cuanto a

género no resultan significativas. La muestra analizada presenta el mismo patrón, por lo que se adapta a la situación nacional.

En los individuos estudiados, se puede apreciar que la mediana del conteo de linfocitos T CD4+ está por debajo a la cifra que se toma como referencia para el comienzo de la terapia ARV en pacientes asintomáticos en Ecuador (500 células/mL); aún más, la mediana de la carga viral también se encuentra elevada (Ver Anexo K). Estas son señales de una posible falla terapéutica, lo que hizo recomendable realizar pruebas de genotipificación a estas muestras.

El método utilizado para la genotipificación fue la pirosecuenciación por permitir la detección de cuasiespecies minoritarias con capacidad discriminatoria para detectar variantes virales que representan tan solo el 1% de la población (42), las cuales son importantes en el momento de la prescripción de la terapia porque algunas observaciones sugieren que las cuasiespecies pueden emerger como poblaciones mayoritarias de virus después del inicio de la terapia de rescate en pacientes pre-tratados (41).

Usando esta técnica, se han encontrado variantes de VIH resistentes a la droga en poblaciones menores al 20% de pacientes con fallo a la terapia (48).

En el presente estudio se encontraron 15 mutaciones que están asociadas a resistencia a los NRTI. En la región de la transcriptasa inversa la mutación más

frecuente fue la M184V, siendo de gran importancia por ser una mutación que produce resistencia de alto nivel a los fármacos de la familia NRTI (49). Diferentes estudios indican que la mutación M184V/I es de baja abundancia pero de gran prevalencia, produciendo altos niveles de resistencia a lamivudina (3TC) (41, 50).

Se encontraron mutaciones menos frecuentes pero de gran importancia como la M41L, D67N, K70R, L210W y T215F/Y, porque confiere resistencia a todos los análogos de Timidina (AZT y D4T) y resistencia cruzada a ABC, ddI y TDF (51).

La mutación V118I no fue muy frecuente pero es importante porque se ha definido que la aparición de esta mutación después del fallo en la terapia es un indicador de infección avanzada y progreso rápido a SIDA (52). Además, está involucrada a la resistencia a AZT y 3TC (53).

Las mutaciones A62V, V75I, F77L están asociadas al complejo Q151M, el cual confiere FCR (54, 55). Se han realizado estudios donde se determinó que la aparición de la mutación L74I y L74V depende de dos vías distintas, en el caso de L74V la aparición está ligada principalmente al uso de ddI en la terapia, mientras que para la L74I está ligada al uso de TDF y AZT (56). La mutación A62V actúa como mutación compensatoria parcial para la mutación K65R, esta mutación no está directamente involucrada en resistencia, sino que más bien compensa lo producido por la mutación K65R en la transcriptasa reversa

mejorando la capacidad replicativa del virus, lo que conlleva a un aumento del fitness viral (57).

Se encontró que 12 pacientes (45%) tienen mutaciones que confieren sensibilidad a todos los medicamentos de la familia NRTI sin presentar resistencia alguna y 2 pacientes (7%) con mutaciones cuyos resultados fueron inconclusos (S[^]NC). Los 13 pacientes (48%) restantes presentaron mutaciones con potencialidad de generar resistencia a varios o a todos los medicamentos de esta familia. Se encontraron 3 pacientes (11%) con potencialidad de presentar FCR, se define como resistencia total a la clase cuando se es resistente a todas las drogas de una clase (60).

Existe discordancia entre la cantidad de personas que tomaron los medicamentos y la cantidad de personas que presentan resistencia. El principal motivo de esto puede ser que las mutaciones minoritarias no nos dan a conocer la resistencia actual, sino la posible resistencia que pueda presentarse al momento de potencializarse algunas de estas mutaciones (41). Otro motivo es la resistencia cruzada que pueda provocar alguna mutación (51), así como también existen mutaciones que revierten resistencia como la M184V que a pesar de presentar alto nivel de resistencia para 3TC, ABC y FTC revierte la resistencia para AZT, d4T y TDF (61).

La mayoría de los casos son subtipo B, lo que concuerda para el estándar de América (24), con respecto a los 3 paciente de CRF 28_BF, se ha presenciado un alto número de casos de CRF de tipo BF dentro de América del Sur (62).

Identificar el subtipo es de gran importancia, porque existen subtipos que son más susceptibles a generar resistencia a ciertos medicamentos (63), también porque pueden interferir en la progresión a SIDA, existiendo variantes de progresión lenta y de progresión rápida a SIDA como es el caso del CRF19_cpx, que tiene una distribución progresiva en Cuba (24, 64).

La realización de esta investigación nos ayuda a comprender la situación de fármacorresistencia a los NRTI en el país. Incrementar estos conocimientos es de gran importancia porque en la terapia de primera línea se recomienda utilizar 2 fármacos de esta familia (13) sin conocer el tipo de resistencia que pueda tener el individuo infectado.

CONCLUSIONES

- Se implementó el sistema de pirosecuenciación 454 de ROCHE para el gen de la Transcriptasa Inversa localizado en la región Gag/Pol del VIH-1.
- El análisis de las secuencias obtenidas por pirosecuenciación permitió encontrar mutaciones asociadas a resistencia en la región de la transcriptasa inversa, siendo la más frecuente la M184V/I, la cual es muy importante por producir resistencia de alto nivel a los fármacos de la familia NRTI.
- Se encontraron las siguientes mutaciones con menor frecuencia: M41L, D67N, K70R, L210W y T215F/Y, las cuales confieren resistencia a AZT y D4T, y resistencia cruzada a ABC, ddI y TDF.
- Se encontró la mutación A62V, la cual no es una mutación asociada a resistencia directamente, sino que ayuda en el aumento del fitness viral.
- No concordaron la cantidad de personas que tomaron los medicamentos con la cantidad de personas que presentaron resistencia, debido a que las mutaciones minoritarias no representan la resistencia actual sino la posibilidad de resistencia a corto o mediano

plazo, además de existir mutaciones que revierten resistencia a ciertos medicamentos (3TC, ABC y FTC) como la M184V.

- Sólo se encontraron dos subtipos en las muestras trabajadas, el 93% correspondió al subtipo B y el 7% restante al CRF28_BF.

RECOMENDACIONES

- Utilizar una población más grande para el estudio.
- Realizar el estudio con pacientes en diferentes etapas, pacientes vírgenes al tratamiento, paciente con tratamiento y pacientes en etapa SIDA.
- Realizar un estudio para conocer las variantes del VIH-1 que circulan en el país.

ANEXOS

ANEXO A. Ficha de Resistencia

NOMBRE DEL PACIENTE: _____

EDAD AÑOS: _____ SEXO: FEMENINO MASCULINO

PROCEDENCIA PACIENTE: _____

RESIDENCIA DEL PACIENTE: _____

PACIENTE MENOR DE 18 MESES ADULTO: EMBARAZADA:

PREFERENCIA SEXUAL: HETEROSEXUAL: GOMOSEXUAL: BISEXUAL:

UNIDAD HOSPITALARIA: _____

NOMBRE DEL MÉDICO y MAIL: _____

1.- HACE CUÁNTO TIEMPO EL PACIENTE FUE DIAGNOSTICADO COMO VIH POSITIVO?

2.- VALOR DE LA ÚLTIMA CARGA VIRAL: _____ FECHA: _____

3.- VALOR DEL ÚLTIMO CONTEO DE LINFOCITOS T CD4: _____ FECHA: _____

4.- HACE CUÁNTO TIEMPO EL PACIENTE RECIBE TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL?

ESQUEMAS RECIBIDOS POR EL PACIENTE			
ESQUEMA	FECHA INICIO	FECHA FIN	MOTIVO DE CAMBIO
1.-			
2.-			
3.-			
4.-			
5.-			

ESQUEMA ACTUAL:

6.- CONSIDERA USTED QUE LA ADHERENCIA DEL PACIENTE AL TRATAMIENTO ES:

BUENA: MALA:

7.- TOMA DE MUESTRA REALIZADA POR:

FECHA:

ANEXO B: Preparación de mix y perfiles de temperatura de PCR

Mix para RT	
<u>Transcriptor buffer</u>	112 μ l
<u>10 mM dNTP mix</u>	56 μ l
<u>Protector RNase inhibitor</u>	14 μ l
<u>Transcriptor RT enzyme</u>	14 μ l
Volumen total	196 μ l

Perfil de temperatura		
RT		
1 ciclo	50°C	60 min
1 ciclo	85°C	5 min
	4°C	∞

Mix para PCR	
Agua ultra pura	1031.25 μ l
FastStart 10X buffer #2	137.5 μ l
dNTP mix	27.5 μ l
FastStart HiFi polymerase	13.75 μ l
Volumen total	1210 μ l

Perfil de temperatura PCR		
1 ciclo	95°C	30 sec
40 ciclos	95°C	30 sec
	55°C	20 sec
	72°C	45 sec
1 ciclo	72°C	8 min
	4°C	∞

Perfil de temperatura para emPCR	1 ciclo	94°C	3 min
	40 ciclos	94°C	15 sec
			45 sec
		68°C	
		72°C	1 min
	1 ciclo	72°C	8 min
	4°C	∞	

**ANEXO C. Tabla de diluciones para cuantificación de
ADN**

Tabla de diluciones	
TUBO 1 : A 12	200 ng/pozo
TUBO 2 : B 12	100 ng/ pozo
TUBO 3 : C 12	50 ng/ pozo
TUBO 4 : D 12	25 ng/ pozo
TUBO 5 : E 12	12.5 ng/ pozo
TUBO 6 : F 12	6.25 ng/ pozo
TUBO 7 : G 12	3.13 ng/ pozo
TUBO 8 : H 12	0 ng/ pozo

ANEXO D. Descripción de capas en la PTP

No. de capa	Tipo de perla
Capa 1	<u>Enzyme beads pre-layer</u>
Capa2	<u>DNA and packing beads</u>
Capa3	<u>Enzyme beads post-layer</u>
Capa 4	<u>PPiase beads</u>

	BB2	Enzyme beads	Vol. total
Capa 1 (<u>enzyme beads pre-layer</u>)	300 μ l	110 μ l	410 μ l
Capa 3 (<u>enzyme beads post-layer</u>)	180 μ l	230 μ l	410 μ l

ANEXO E. Tabla de mutaciones asociadas a resistencia a los distintos fármacos con sus respectivas frecuencias.

Mutaciones asociadas a resistencia			
		#	%
NRTI	M184V/I	10	37,0
	V75/I/T/M/A/L	7	25,9
	T69/D/N/G/S/A	6	22,2
	F77L	5	18,5
	T215Y/F/D/S	4	14,8
	K70R/EK/KG/OG	3	11,1
	H208Y/L	3	11,1
	L210W/SW	3	11,1
	V118I	2	7,4
	M41L	1	3,7
	A62V	1	3,7
	D67N/DG	1	3,7
	L74I/IL/V	1	3,7
	K219R/Q/E/N/W	1	3,7

**ANEXO F. Tabla de mutaciones que no están
asociadas a resistencia a los distintos fármacos con
sus respectivas frecuencias.**

Mutaciones que no están asociadas a resistencia		
	#	%
122K/Q/P	19	70,4
123E/N/S	19	70,4
214F/V	19	70,4
200I/V/A/K/Q	15	55,6
207E/K/A/N/R/T/G	15	55,6
211G/K/T	15	55,6
35I/T/R/M/L	14	51,9
174K/N/H/R/D/L	13	48,1
102R/Q	10	37,0
162C/K/L/H/Y	10	37,0
177E/N/G	10	37,0
245K/G/M/Q/T	9	33,3
135T/L/K	8	29,6
142V/T	8	29,6
192N/G	8	29,6
196E	8	29,6
139V/A/M	7	25,9
178M/L	6	22,2
197K/R/E	6	22,2
6D/K	5	18,5
20R	5	18,5
39A	5	18,5
60I	5	18,5
104R	5	18,5
99K	5	18,5
202V	5	18,5

204A/K/M	5	18,5
48T	4	14,8
87L/S/V	4	14,8
105P	4	14,8
173T/E	4	14,8
228H/T	4	14,8
229G/R	4	14,8
246P	4	14,8
250E/G	4	14,8
28K	3	11,1
32E	3	11,1
64R	3	11,1
83K/G	3	11,1
107I/A	3	11,1
120S	3	11,1
153R	3	11,1
160S/L	3	11,1
203D/K	3	11,1
232H	3	11,1
7P	2	7,4
8I	2	7,4
11R/Q	2	7,4
17G	2	7,4
27S	2	7,4
53D	2	7,4
63M/T	2	7,4
78G	2	7,4
79D	2	7,4
84A	2	7,4
110N	2	7,4
121H/Y	2	7,4
169G/K	2	7,4
171S	2	7,4
194A/Q	2	7,4
195L	2	7,4
213R/M	2	7,4
248D/G	2	7,4
OTROS	1	3,7

**ANEXO G. Tabla de comparación entre las
mutaciones encontradas en las poblaciones
minoritarias y las encontradas en las poblaciones
mayoritarias**

	Poblaciones virales >1%	Poblaciones virales mayoritarias >20%	Poblaciones virales 1- 20%
M184/V/I	37,0	22,2	14,8
V75/I/T/M/A/L	25,9	7,4	18,5
T69/D/N/G/S/A	22,2	7,4	14,8
F77L	18,5	0,0	18,5
T215Y/F/D/S	14,8	7,4	7,4
K70R/EK/KG/OG	11,1	3,7	7,4
H208Y/L	11,1	0,0	11,1
L210W/SW	11,1	3,7	7,4
V118I	7,4	0,0	7,4
M41L	3,7	3,7	0,0
A62V	3,7	0,0	3,7
D67N/DG	3,7	3,7	0,0
L74I/IL/V	3,7	3,7	0,0
K219R/Q/E/N/W	3,7	3,7	0,0

ANEXO H. Tabla de niveles de resistencia

	S	I	R	S^NC
Abacavir	13	9	3	2
Didanosina	14	7	4	2
Emtricitabina	14	1	10	2
Lamivudina	14	1	10	2
Stavudina	17	4	4	2
Tenofovir	19	6	0	2
Zidovudina	19	3	3	2

ANEXO I. Tabla de Porcentaje de pacientes con poblaciones de VIH-1 que presentan resistencia a los medicamentos NRTI y de pacientes utilizando los ARV.

	Pctes con resistencia*	Pctes utilizando ese medicamento
FCR	11,1	
ABC	44,4	25,9
DDI	40,7	14,8
FTC	40,7	33,3
3TC	40,7	81,5
D4T	29,6	3,7
TDF	22,2	37,0
AZT	22,2	55,6

ANEXO J. Tabla de porcentaje de pacientes con poblaciones de VIH-1 que presentan resistencia a los medicamentos NRTI según sexo.

Sexo	n	FCR	ABC	DDI	FTC	3TC	D4T	TDF	AZT
Femenino	48,1	0,0	18,5	14,8	18,5	18,5	3,7	3,7	0,0
Masculino	51,9	11,1	25,9	25,9	22,2	22,2	25,9	18,5	22,2

BIBLIOGRAFÍA

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. Core epidemiological slides HIV/AIDS estimates. 2014 [updated 2014; cited, 2015 April 5]; Available from: <http://www.who.int/hiv/data/en/>
3. Murray C, Ortblad K, Guinovart C, Lim S, Wolock T, Roberts D, et al. Global, regional and national incidence and mortality for HIV, tuberculosis and malaria during 1990 - 2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. Lancet. 2014;384(9947):1005-70.
4. La epidemia mundial del SIDA - Datos claves mundiales. 2014 [updated 2014; cited 2015 April 8]; Available from: <http://www.unaids.org/es/resources/campaigns/2014/2014gapreport/factsheet>

5. Global Update on HIV treatment 2013: results, impact and opportunities. 2013 [updated 2013; cited 2015 April 4]; Available from: http://www.unaids.org/sites/default/files/en/media/unaids/contentassets/documents/unaidspublication/2013/20130630_treatment_report_en.pdf.
6. Taylor S, Jayasuriya A, Smit E. Using HIV resistance tests in clinical practice. *J Antimicrob Chemother.* 2009 Aug;64(2):218-22.
7. Luz P, Morris B, Grinsztenj B, Freedberg K, Veloso V. Cost-Effectiveness of Genotype Testing for Primary Resistance in Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2015;68:152-61.
8. Guía de atención integral para Adultos y adolescentes con infección por VIH-sida. (2012).
9. Kouanfack C, Montavon C, Laurent C, Aghokeng A, Kenfack A, Bourgeois A, et al. Low levels of antiretroviral-resistant HIV infection in a routine clinic in Cameroon that uses the World Health Organization (WHO) public health approach to monitor antiretroviral treatment and adequacy with the WHO recommendation for second-line treatment. *Clin Infect Dis.* 2009 May 1;48(9):1318-22.
10. 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.

11. Acheson N. Fundamentals of Molecular Virology. 2nd ed. Sons JW, editor.; 2011.
12. 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.
13. Madigan M, Martinko J. Brock Biology of Microorganisms. Thirteenth ed.: Pearson; 2011.
14. Soriano V, Briones C, Gomez-Cano M, Perez-Olmeda M, de Meddoza C. Resistencia a los farmacos antirretroviricos. In: Soriano V, Gonzalez-Lahoz J, editors. Manual del SIDA: IDEPSA; 1999. p. 739-52.
15. Plantier JC, Leoz M, Dickerson JE, De Oliveira F, Cordonnier F, Leme V, et al. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. Nat Med. 2009 Aug;15(8):871-2.
16. 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.
17. Barroso H, Taveira N. Evidence for negative selective pressure in HIV-2 evolution in vivo. Infect Genet Evol. 2005 Apr;5(3):239-46.

18. 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.
19. HIV Sequence Database. Los Alamos NLANLdoticA, 2015.] Available from: <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html>). [cited]; Available from.
20. 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.
21. 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.
22. MSP. Actualización del Plan Estratégico Multisectorial de la Respuesta Nacional al VIH 2007 – 2015 – Planes Operativos Multisectoriales 2011 – 2013 Q, 2011.
23. Resik S. Evaluación de la consistencia del patrón epidemiológico de transmisión en dos cadenas cubanas de seropositivos al virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 mediante análisis filogenético. La Habana: Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”; 2008.

24. Gómez M, Salomón H, Pando M, Kijak G, Avila M. Distribución de subtipos y recombinantes del HIV: Situación en la Argentina. *Medicina*. 2001;61:881-9.
25. Lozano F, Domingo P. Tratamiento antirretroviral de la infección por el VIH. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29(6):455-65.
26. Freedberg K, Losina E, Weinstein M, Paltiel D, Cohen C, Seage GR, et al. The Cost Effectiveness of combination antiretroviral therapy for HIV disease. *New Engl J Med*. 2001;344(11):824-31.
27. Guía de terapia antirretroviral en adultos con VIH. Nicaragua: Ministerio de Salud; 2009.
28. Terapia Antirretroviral. [cited 2015 Abril 7]; Available from: http://www.aidsinfont.org/fact_sheets/view/403?lang=spa.
29. Guía para el uso de medicamentos antirretrovirales. 5 ed. Venezuela; 2011.
30. Gómez LF. Resistencia antirretroviral y variantes genéticas del VIH-1 en pacientes cubanos con fallo a la terapia, Enero-Junio del 2012. La Habana: Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"; 2012.

31. Actualización del Plan Estratégico Multisectorial de la Respuesta Nacional al VIH 2007 - 2015 - Planes Operativos Multisectoriales 2011 - 2013. Quito: Ministerio de Salud Pública; 2011.
32. Ribera E, Tuset M, Martín M, Del Cacho E. Características de los fármacos antirretrovirales. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29(5):362-91.
33. Bertuccio MP, Picerno I, Celesia BM, Galvagna S, Sturniolo G, Spataro P, et al. HIV genomic mutations causing resistance to antiretroviral drugs in seropositive Sicilians. *Curr HIV Res*. 2014;12(1):32-43.
34. Afani SA, Orellana RL, Duarte JP, Acevedo MW, Morales BO, Wolff RM, et al. Resistance to anti-retroviral therapy in Chilean patients with HIV-1 from 2002 to 2005. *Rev Med Chil*. 2007 Oct;135(10):1237-44.
35. Luque J, Herráez A. *Biología Molecular e Ingeniería Genética: Conceptos, Técnicas y Aplicaciones en Ciencias de la Salud*. Madrid: Elsevier; 2006.
36. Adams J. DNA sequencing technologies. *Nature Education*. 2008;1(1):193
37. Sanger F. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1977;74:5463-7.

38. Smith L, Sandres J, Kaiser R, Hughes P, Dodd C. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature*. 1986;321(6071):674-9.
39. Ronaghi M. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Research*. 2001;11:3-11.
40. Eriksson N, Pachter L, Mitsuya Y, Rhee SY, Wang C. Viral Population Estimation Using Pyrosequencing. *PLoS Comput Biol*. 2008;4(5):e1000074.
41. Le T, Chiarella J, Simen BB, Hanczaruk B, Egholm M, Landry ML, et al. Low-abundance HIV drug-resistant viral variants in treatment-experienced persons correlate with historical antiretroviral use. *PLoS One*. 2009;4(6):e6079.
42. Ji H, Massé N, Tyler S, Liang B, Li Y, Merksh H, et al. HIV Drug Resistance Surveillance using pooled pyrosequencing. *PLoS ONE*. 2010;5(2):e9263.
43. Dudley DM, Chin EN, Bimber BN, Sanabani SS, Tarosso LF. Low-Cost Ultra-Wide Genotyping Using Roche/454 Pyrosequencing for Surveillance of HIV Drug Resistance. *PLoS ONE*. 2012;7(5):e36494.
44. Ahmadian A, Ehn M, Hober S. Pyrosequencing: History, biochemistry and future. *Clinica Chimica*. 2005;363(2006):83-94.

45. Hernandez G, editor. Flujo de trabajo general. Genome Sequencer Junior; 2013; INSPI. Roche Diagnostics.
46. . GS Junior emPCR Amplification Method Manual Lib-A. Roche; 2012.
47. GS Junior Sequencing Method Manual. Roche; 2013.
48. Alteri C, Santoro MM, Abbate I, Rozera G, Bruselles A, Bartolini B, et al. 'Sentinel' mutations in standard population sequencing can predict the presence of HIV-1 reverse transcriptase major mutations detectable only by ultra-deep pyrosequencing. *J Antimicrob Chemother.* 2011 Nov;66(11):2615-23.
49. Quan Y, Gu Z, Li X, Li Z, Morrow CD, Wainberg MA. Endogenous reverse transcription assays reveal high-level resistance to the triphosphate of (-)2'-dideoxy-3'-thiacytidine by mutated M184V human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* 1996 Aug;70(8):5642-5.
50. Hedskog C, Mild M, Jernberg J, Sherwood E, Bratt G, Leitner T, et al. Dynamics of HIV-1 quasispecies during antiviral treatment dissected using ultra-deep pyrosequencing. *PLoS One.* 2010;5(7):e11345.
51. Laurido M. Resistencia del VIH-1 a los antirretrovirales. 1 ed.; 2011.

52. Zaccarelli M, Tozzi V, Lorenzini P, Forbici F, Narciso P, et al. The V118I mutation as a marker of advanced HIV infection and disease progression. *Antivir Ther.* 2007; 12(2):163-8.
53. Girouard M, Diallo K, Marchand B, McCormick S, Götte M. Mutations E44D and V118I in the reverse transcriptase of HIV-1 play distinct mechanistic roles in dual resistance to AZT and 3TC. *J Biol Chem.* 2003 Sep 5; 278(36):34403-10.
54. D'Aquila R, Schapiro J, Brun-Vézinet F, Clotet B, Conway B, et al. Drug resistance mutations in HIV-1. *International AIDS Society-USA: Topics in HIV Medicine.* 2002;10(2) Available in:
<https://www.iasusa.org/sites/default/files/tam/10-5-21.pdf>.
55. Jiamsakul A, Sungkanuparph S, Law M, Kantor R, Praparattanapan J. HIV multi-drug resistance at first-line antiretroviral failure and subsequent virological response in Asia. *J Int AIDS Soc.* 2014; 17(1): 19053.
56. Wirden M, Lambert-Niclot S, Marcelin A, Schneider L, Ait-Mohand H, et al. Antiretroviral combinations implicated in emergence of the L74I and L74V resistance mutations in HIV-1-infected patients. *AIDS.* 2009 Jan 2; 23(1):95-9.
57. Svarovskaia ES, Feng JY, Margot NA, Myrick F, Goodman D. The A62V and S68G mutations in HIV-1 reverse transcriptase partially restore the

replication defect associated with the K65R mutation. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2008 Aug 1; 48(4):428-36.

60. Vercauteren J, Deforche K, Theys K, Debruyne M, Duque LM, Peres S, et al. The incidence of multidrug and full class resistance in HIV-1 infected patients is decreasing over time (2001-2006) in Portugal. *Retrovirology.* 2008;5:12.

61. Arduino R. Pruebas de resistencia a los antirretrovirales: Como facilitar su interpretación práctica y mejorar sus indicaciones de uso en Latinoamérica. XV Conferencia de Cali; 2009. 2009.

62. Aulicino PC, Holmes EC, Rocco C, Mangano A, Sen L. Extremely rapid spread of human immunodeficiency virus type 1 BF recombinants in Argentina. *J Virol.* 2007 Jan;81(1):427-9.

63. Santoro MM, Perno CF. HIV-1 Genetic Variability and Clinical Implications. *Journal [serial on the Internet].* 2013 Date; 2013(ID 481314): Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/481314>.

64. Kouri V, Khouri R, Alemán Y, Abrahantes Y, Vercauteren J. CRF19_cpx is an evolutionary fit HIV-1 variant strongly associated with rapid progression to AIDS in Cuba. *EBioMedicine.* 2015;2:244-54.

