

Rosas Escareño Abraham Noé*
Hernández Madrigal Paloma Guadalupe*
Nájjar Guerrero Israel*
Guzmán Pérez Cristian Ricardo*
Castañeda Achutiguí Fátima Denise*

Características estructurales y funcionales del Virus de la Inmunodeficiencia Humana

Structural and functional characteristics of the Human Immunodeficiency Virus

Fecha de aceptación: abril 2013

Resumen

El origen del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) ha sido polémico y de interés desde que esta enfermedad fue identificada a principios de los años 80. Su origen se remonta a la transmisión a humanos del retrovirus que infecta a poblaciones de chimpancés en África central desde hace aproximadamente cien años. La intensas investigaciones realizadas nos permite disponer de un tratamiento antirretroviral que, si bien no puede erradicar la infección por el VIH, mantiene suprimida la replicación viral, incrementa el número de linfocitos CD4+, disminuye la morbi-mortalidad, mejora la calidad de vida y previene la transmisión sexual del VIH. Sin embargo, no es posible entender estos fenómenos sin un conocimiento detallado de la biología del VIH-1 y los mecanismos que se han seleccionado en este asombroso agente para infectar una célula clave como el linfocito T CD4+ y evadir la respuesta inmune. En este estudio se realizó una revisión bibliográfica sobre las características estructurales-morfológicas, el ciclo vital, el tratamiento antirretroviral y algunos métodos de laboratorio para la detección e interpretación de resistencias del VIH-1.

Palabras clave: *Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1, tratamiento antirretroviral, mecanismos de resistencia, genotipo, fenotipo.*

Abstract

The origin of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) has been controversial and interesting since the disease was identified in the early 80s. It dates back to human transmission of retroviruses that infect populations of chimpanzees in central Africa about 100 years ago. The intensive research conducted allows us to have an antiretroviral regimen, while it cannot eradicate HIV infection, remains suppressed viral replication, increases the number of CD4+, decrease morbidity and mortality, improve quality of life and prevent sexual transmission of HIV. However, not is possible to understand these phenomena without detailed knowledge of the biology of HIV-1 and the mechanisms that have been selected in this amazing agent to infect a cell key and CD4+ T lymphocyte and evade the immune response. So in this study we reviewed the literature on structural-morphological characteristics, life cycle, antiretroviral treatment and some laboratory methods for the detection and interpretation of resistance of HIV-1 resistance.

Keywords: *Human Immunodeficiency Virus Type 1 Antiretroviral Therapy, Mechanisms of Resistance, Genotype, Phenotype.*

Introducción

El origen del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) ha sido polémico y de interés desde que esta enfermedad fue identificada a principios de los años 80. Lo que se sabe es que el VIH es un virus perteneciente a la familia *Retroviridae*. Este tipo de virus se caracteriza por invadir el sistema inmune. El daño al sistema inmune se manifiesta mediante la destrucción de las células CD4 o

células T y a largo plazo se manifiesta por la susceptibilidad a enfermedades oportunistas. Los retrovirus contienen su información genética en forma de ARN, incompatible con el ADN de la célula huésped. Para lograr dicha compatibilidad, se requiere de una enzima característica de los retrovirus; transcriptasa reversa. El VIH pertenece al género *lentivirus*, caracterizados por producir infecciones

*Laboratorio de Investigación y Desarrollo Farmacéutico, Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, CUCEI, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, México.

Correspondencia: QFB Abraham Noé Rosas Escareño

Departamento de Farmacobiología, División de Ciencias Básicas, Universidad de Guadalajara, CP 44430, Guadalajara Jalisco México.

Dirección electrónica: noek.padge@hotmail.com

con largos periodos de latencia que conduce a un desarrollo tardío de la enfermedad. Estos virus se encuentran en diversos animales, tales como gatos, ovejas, caballos y ganado. Sin embargo, el lentivirus más interesante en términos de la investigación sobre los orígenes del VIH es el virus de la inmunodeficiencia de los simios (SIV).¹

En la actualidad, se conocen dos variedades de VIH; el tipo 1 (VIH-1) y el tipo 2 (VIH-2). Filogenéticamente, el VIH-2 y el VIS (virus de inmunodeficiencia en simios) tienen una similitud del 75% en su secuencia de sus nucleótidos, mientras que el VIH-1 y VIH-2 tienen una similitud del 60%.² Se han encontrado tres genotipos del VIH-1: M (*main*, principal), O (*outlier*, atípico) y N (*new*, nuevo). Mundialmente predomina el grupo genómico M, el cual se ha dividido en once subtipos (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J y K) y en cepas recombinantes entre ellos, denominados CRF (formas recombinantes circulantes). Las CRF se forman por recombinación de fragmentos genómicos de distintos subtipos. Actualmente se han descrito más de 30 CRF y su número se incrementa constantemente.³

Estructura y morfología del VIH-1

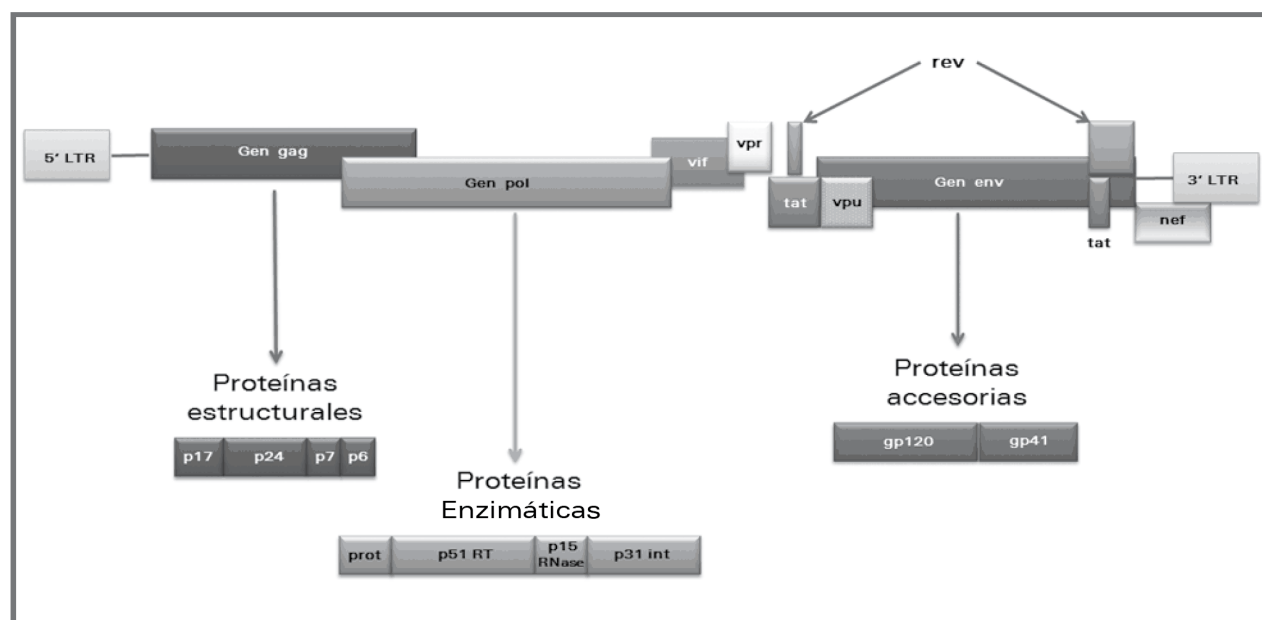
El VIH es una partícula esférica de 90 a 120 nm de diámetro que posee una bicapa lipídica que toma de la célula huésped, cuya envoltura externa es una bicapa lipídica en la que se insertan unas espículas formadas por las glicoproteínas virales, gp 120 y gp 41, las cuales están asociadas no covalentemente en la superficie del virión.²

El nucleoide central o nucleocápside, se refiere a la porción central del virus, es una estructura tubular proteica

que alberga en su interior la información genética en dos cadenas idénticas de ARN. El material genético viral posee tres genes estructurales (pol, gag, env) y seis genes reguladores (nef, tat, rev, vpr, vif y vpu). Además, en el estado de provirus el genoma está flanqueado por unas secuencias repetidas largas (LTR, *long terminal repeats*)^{4,5} que participan en la integración del genoma vírico en el genoma de la célula huésped y que contienen los elementos reguladores de la transcripción viral y de la poliadenilación (figura 1).²

El producto de la traducción del gen gag es la poliproteína precursora Gag. Durante la traducción, el extremo amino terminal de esta proteína es miristilado, lo que desencadena su asociación con la membrana de la célula infectada. Durante la maduración vírica esta proteína es procesada por una proteasa codificada por el gen pol dando lugar a la proteína de la matriz p17, la proteína de la cápside p24 y las proteínas de la nucleocápside p6 y p7. El producto del gen pol es la poliproteína Pol cuyo procesamiento da lugar a las tres enzimas víricas: la proteasa (p11), la RT (p66/p51) y la integrasa (p32). El gen env se encuentra situado en el extremo 3' del genoma y se expresa como una glicoproteína precursora Gp160, que es procesada por proteasas celulares dando lugar a las proteínas de la envoltura Gp120 (de superficie) y Gp41 (transmembrana). Los genes tat y rev por su parte codifican las proteínas reguladoras, encargadas de activar la transcripción y promover el transporte al citoplasma de los ARN mensajeros (ARNm) respectivamente. Por último, los genes vif, vpr, vpu y nef codifican las proteínas accesorias cuya función es participar activamente en los procesos de localización nuclear del complejo de preintegración en la maduración y liberación extracelular de los viriones (cuadro 1).⁶

Figura 1
Genoma del Virus de la Inmunodeficiencia Humana



Cuadro 1

Gen	Función
Gag	Región genómica que codifica la proteína de la cápside. El precursor es la proteína p55 miristilada, que se procesa a p17 (matriz), p24 (cápside), proteínas p7 (nucleocápside) y p6, por la proteasa viral. Gag asociados con la membrana plasmática, donde tiene lugar el ensamblaje del virus.
	P17. Proteína que favorece el anclaje en la membrana y dirige al complejo de pre-integración hacia el núcleo
	24. Proteína de la cápside
	P7. Proteína responsable del reconocimiento y la incorporación del ARN al virión y además interviene en la transcripción inversa facilitándola.
	P6. Proteína responsable de la incorporación de la proteína accesoria Vpr (producto de la traducción del gen vpr) al virión en formación y de la interacción con la membrana de la célula que hace posible la gemación.
Pol	Región genómica que codifica a las enzimas virales: proteasa, transcriptasa reversa e integrasa. Estas enzimas se producen como una poliproteína precursora Gag-Pol, que es procesada por la proteasa viral.
	P10. Proteasa, actúa cortando las piezas de las proteínas Gag, Pol y de la Gag-. Esta proteína escinde al precursor Gag.
	P15. ARNasa. Presente en la subunidad p66 de la transcriptasa reversa, cuya función es eliminar la plantilla de ARN viral del duplex ARN/ADN.
	P31. Integrasa que realiza la inserción del ADN proviral en el genoma de la célula huésped. Esta realiza tres funciones: actividad exonucleasa, endonucleasa y ligasa.
	P51. Transcriptasa inversa cuya función es la síntesis del ADN de doble cadena del provirus usando como patrón la cadena singular del ARN viral.
Env	La proteína Env se encarga de la formación de la bicapa lipídica y todas sus estructuras incluyendo a 72 espículas espaciadas formando las proteínas virales.
	P41: es una proteína transmembranal dentro de las espículas de la membrana se encuentre relacionada con la p120 para la fusión a la célula a invadir.
	P120: son la cabeza externa de espículas de membrana y se relacionan con la p41. Estas son las encargadas de la fijación a las células CD4.
Proteínas reguladoras	Tat: transactivador de la expresión génica del VIH. Uno de los dos factores virales esenciales reguladoras (Tat y Rev) para la expresión de genes del VIH.
	Rev: El segundo factor regulador necesario para la expresión del VIH. Encargado de transportar selectivamente el ARNm completo hacia el citoplasma.
Proteínas accesorias	Vif (p23): promueve la maduración y la infectividad de la partícula vírica.
	Vpr (p15): facilita la entrada al núcleo del complejo de pre-integración.
	Vpu (p16): aumenta la liberación de los viriones y promueve la degradación de CD4 en el retículo endoplasmático.
	Nef (p27): Proteína que se encarga de inducir la producción de quimiocinas, facilita la activación de células T en reposo y desregular la expresión de la subpoblación de linfocitos T cooperadores (CD4) y del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase 1.

Ciclo biológico del VIH-1

Dada su nula capacidad de auterreplicación, debido a que carece de ADN y otros organelos auxiliares en este proceso, es necesario que invada una célula huésped. De manera general, las células eucariotas que cuentan con los receptores CD4 y correceptores CCR5 y CXCR4.⁷

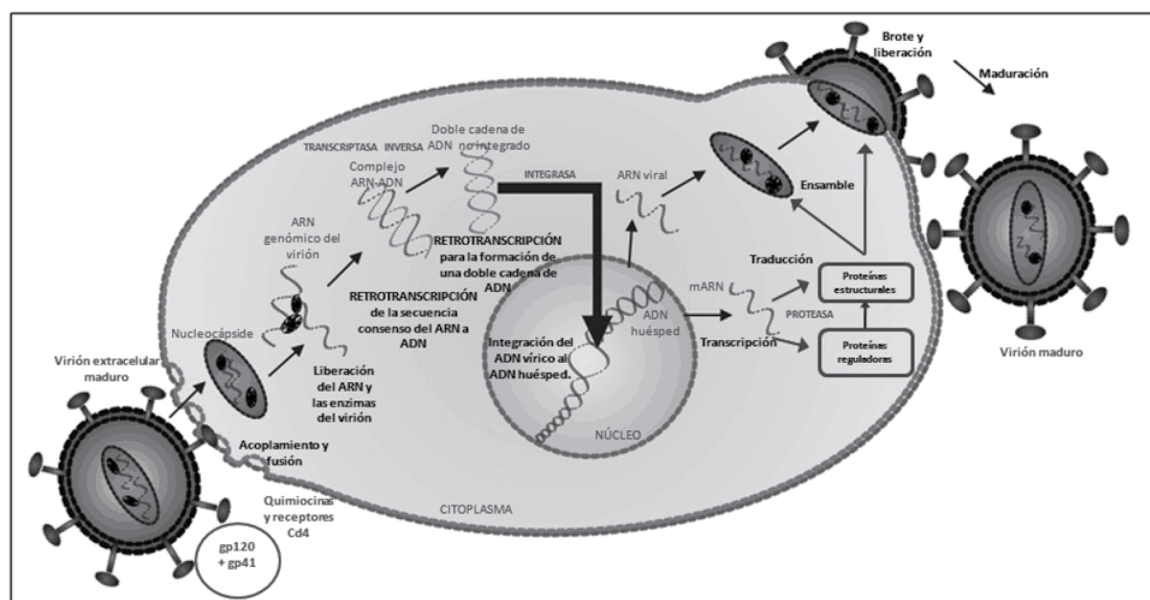
El ciclo biológico del VIH-1 se divide en dos etapas bien diferenciadas: la primera etapa del ciclo comprende desde el reconocimiento celular hasta la integración del ADN viral al ADN huésped. El reconocimiento celular está directamente relacionado con la sensibilidad a los receptores CD4 en un linfocito T4. La interacción entre los complejos proteicos que se encuentran inmersos en la envoltura del virus, están compuestos por dos glucoproteínas (gp120 y gp41) y cuando el gp120 se une a los receptores de la célula diana, auxiliado por los correceptores, es denominado acoplamiento. Esta unión origina un cambio conformacional en gp120, que permite plegarse a gp41 e insertar sus terminales no polares en la membrana celular, y gp41 fusiona la envoltura viral con la membrana celular, permitiendo el ingreso y fragmentación del nucleocápside dando paso a la liberación de los componentes virogenéticos-enzimáticos.⁷

Una vez liberado el ARN en el citoplasma celular, la transcriptasa reversa comienza el proceso de retrotranscripción (transformación de ARN viral a ADN viral). Dicho proceso inicia en el sitio activo de la polimerasa, que transforma el ARN viral en una cadena complementaria de ADN; dando origen a una doble hélice de ARN-ADN. Posteriormente, el sitio de la ribonucleasa separa la doble cadena de ARN-ADN eliminando la cadena simple de ARN. Nuevamente el sitio de la polimerasa sintetiza una secuencia consenso a la secuencia simple de nucleótidos retrotranscrita,

formando una cadena útil de ADN viral. Seguidamente, la integrasa crea extremos cohesivos en la cadena de ADN viral, consecuentemente, la cadena de ADN viral es integrada al genoma de la célula huésped, finalizando así la primera mitad de su ciclo biológico.⁸

La segunda etapa del ciclo biológico del VIH-1 comprende desde la biosíntesis de los componentes virales hasta la salida de los viriones. La iniciación de la transcripción del provirus, depende de factores celulares y virales que interaccionan con las secuencias reguladoras localizadas en la región U3 de la LTR. Estos elementos celulares se unen al promotor viral y aumentan la expresión genética del VIH-1 en respuesta a la estimulación celular por diferentes mecanismos, como citoquinas exógenas, y permiten la formación y activación del complejo transcripcional primario con la ARN polimerasa II celular. El ARN generado es procesado en el núcleo y transportado al citoplasma con ayuda de la proteína viral Rev, donde se traduce dando las distintas proteínas virales, que viajan hasta los centros de ensamblaje para formar los nuevos viriones, que son liberados mediante un proceso de gemación a través de la membrana plasmática.⁸ Una enzima fundamental en la formación de los viriones es la proteasa viral, enzima que provoca la ruptura de la poliproteína Gag en proteínas de la cápside y nucleocápside (p6, p9, p17, p24) y de la poliproteína Pol precursora de todas las enzimas virales del VIH-1 (proteasa, integrasa y transcriptasa reversa). La maduración final de los viriones y el ensamblaje correcto de las proteínas virales se produce al final del ciclo infectivo. Este complejo (ahora denominado nucleocápside) abandona la célula llevándose consigo un fragmento membranar dando fin al proceso de ensamble y salida del virión (figura 2).⁹

Figura 2
Ciclo biológico del VIH-1



Variabilidad genética

La acumulación de secuencias genómicas del VIH, tras la primera caracterización molecular en 1983, puso en evidencia la extraordinaria diversidad de este retrovirus. Esta diversidad se genera, principalmente, durante el proceso de replicación del genoma viral, a través de los errores que comete la retrotranscriptasa, y convierte al VIH en uno de los organismos descritos de mayor tasa evolutiva. Esta tasa, entendida como la cantidad de cambios en el genoma por unidad de tiempo, es el resultado sinérgico de una combinación de factores, la recombinación y la introducción de mutaciones, que tienen lugar durante el proceso de retrotranscripción.

Recombinación

Los retrovirus presentan un elevado potencial de recombinación, debido a que este proceso constituye una parte intrínseca de su ciclo replicativo normal. La alta frecuencia de recombinación homóloga observada en los retrovirus, es consecuencia de la naturaleza diploide del genoma vírico. Para que la recombinación homóloga ocurra, se requiere la co-infección o re-infección de una célula por dos virus distintos y el empaquetamiento de dos genomas víricos distintos en una misma partícula viral (heterocigoto).¹⁰ Este mecanismo sirve para mediar la reparación de genomas virales defectivos, aumentar la diversidad viral y acelerar la propagación de mutaciones ventajosas entre las cuasi especies virales. El potencial aumento de la variabilidad mediado por la recombinación confiere a los retrovirus la capacidad para responder rápidamente a cambios de presión selectiva, bien sea inmunológica o farmacológica, mediante la rápida generación de las variantes más aptas para eludir esas presiones, al albergar el conjunto de mutaciones más adecuado.¹¹

Tasa de mutación de la RT del VIH-1

Una de las características más importante del VIH es su extraordinaria variabilidad genética, debido a que tiene un sistema de replicación que comete un gran número de errores durante la polimerización y a que no existen mecanismos de corrección. La base bioquímica de la diferencia en las tasas de error entre los genes virales y los de la célula huésped, es la ausencia de un mecanismo eficiente de reparación en las polimerasas y retrotranscriptasas de los ARN virales (actividad exonucleasa 3-5) razón por la cual los nucleótidos incorporados por error (mutación) no son eliminados. Diversas evidencias experimentales han demostrado que la transcriptasa reversa tiene una tasa de mutación muy alta, en promedio de 1.4×10^{-5} errores por par de bases en cada ciclo de replicación; en cada portador del virus se producen diariamente 10^{10} viriones nuevos, lo cual favorece la mutación del mismo.¹² Como consecuencia del proceso de mutación, las poblaciones virales no son idénticas, sin embargo éstas se encuentran genéticamente

relacionadas; a esto se le denomina cuasiespecies. Las cuasiespecies están sometidas continuamente a un proceso de competencia, variación y selección que permite al virus adaptarse eficazmente al huésped.¹³ Virus aislados de un mismo portador, son filogenéticamente más próximos entre sí, que con aquellas variantes de individuos no relacionadas epidemiológicamente. Cuando estos provienen de diferentes portadores, la relación entre los virus de una región es directamente proporcional al tiempo que el virus lleva presente en esa población y al número de cepas que iniciaron su difusión. Si durante el proceso de retrotranscripción y antes de la integración dos cepas diferentes del virus infectan una misma célula y los genomas de los provirus involucrados se integran en el núcleo, se produce una recombinación que se expresa como una forma recombinante circulante (CRF). Hoy en día, más de la mitad de los virus aislados son recombinantes, lo cual puede brindar mayor resistencia que las mutaciones puntuales.¹⁴

La variabilidad genética influye directamente en la respuesta del tratamiento antirretroviral. Se ha demostrado que los distintos subtipos y CRF del VIH-1 presentan una sensibilidad distinta ante los tratamientos antirretrovirales actuales, generada a partir de la alta capacidad adaptativa del virus al huésped por las distintas actividades farmacológicas que alteran el ambiente ordinario de replicación. La presión ejercida por el fármaco en el tratamiento antirretroviral genera una sustitución de la población sensible al fármaco por una población resistente, sin embargo las poblaciones sensibles no se eliminan completamente y pasan a ser reservorios. Consecuentemente si existe un cese de la presión del fármaco, ya sea por falta de adherencia al tratamiento o por cambio del mismo, volverán a predominar las poblaciones inicialmente sensibles.¹⁵

Distribución geográfica

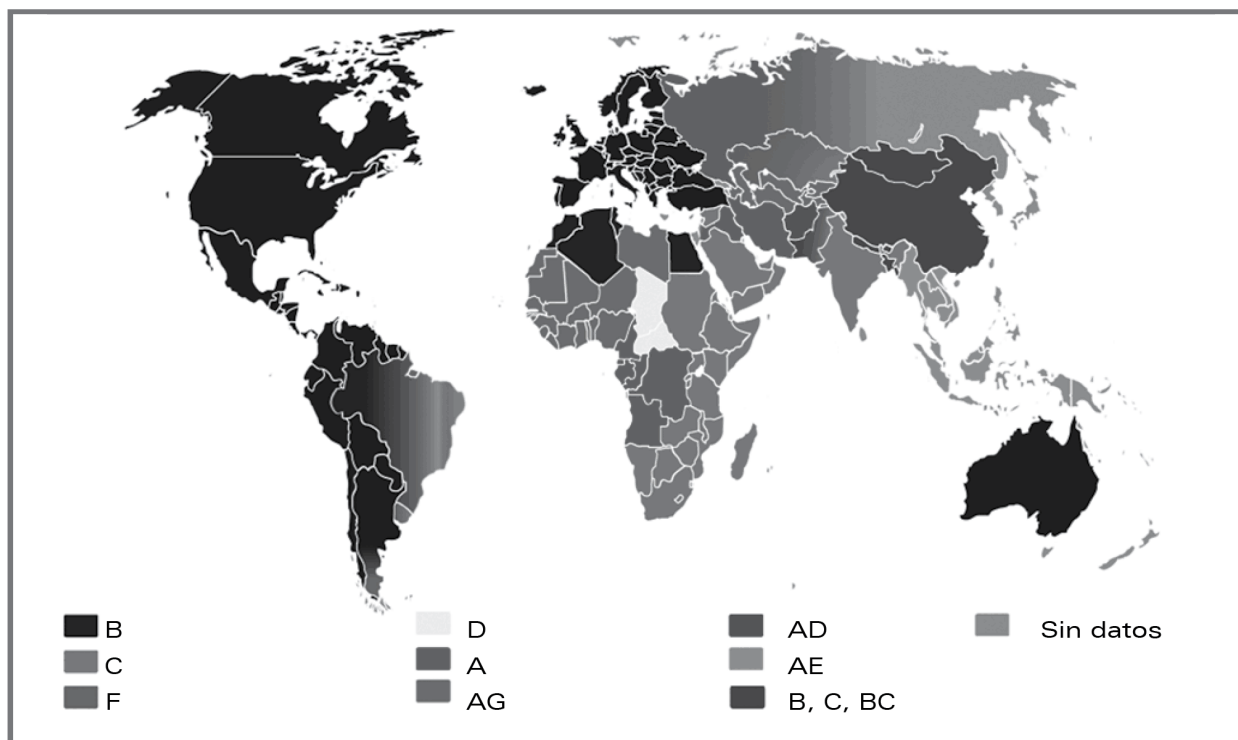
Se ha estimado mediante modelos matemáticos, que el VIH-1 surgió aproximadamente en los años treinta en África. En este continente, coexisten todos los subtipos del grupo genómico M (*main*), con predominio del subtipo C, posteriormente, la infección por VIH- del grupo M se expandió mundialmente.¹⁶ La infección del grupo O es menos común: supone menos del 10% en Camerún,¹⁷ aunque se han descrito ya casos en Europa y Estados Unidos. La infección del grupo N se localiza en África Central - Occidental, más concretamente en Camerún.¹⁸

En América y Europa predomina el subtipo B, en la ex Unión Soviética el subtipo A, mientras que en el Sureste asiático predomina la forma recombinante AE, en tanto, al sur de Asia hay prevalencia del subtipo C y formas recombinantes BC; sin embargo, a nivel mundial predomina el subtipo C.^{19,20} Si bien el subtipo B predomina en América, existen marcadas diferencias en la frecuencia de sus formas recombinantes; por ejemplo, se observa que aproximadamente el 30% de los afectados de todo el continente residen en Brasil, del cual más del 10% corresponde al subtipo C o a la forma recombinante BF, mientras que el resto de

Centro y Sudamérica, presenta una prevalencia de infección del subtipo no B que va del 2 al 10%. En Norteamérica, las

infecciones por el subtipo no B, representan sólo el 2% (figura 3).²¹

Figura 3
Distribución geográfica del VIH-1



Tratamiento antirretroviral

El principal objetivo de la terapia antirretroviral es reducir la carga viral (CV) a niveles indetectables en el paciente, es decir a niveles inferiores a 50 copias por mililitro en un lapso de 24 semanas de iniciado el tratamiento, y usar como mínimo tres diferentes fármacos en modo simultáneo con el objetivo de atacar diferentes blancos y en consecuencia obtener una mayor eficiencia farmacológica. (*Department of Health and Human Services*, 2012).²²

Los antirretrovirales (ARV) actuales no eliminan el virus VIH-1 del organismo huésped, sino que actúan en diferentes estadios biológicos limitando su replicación y así mismo evitan el deterioro del sistema inmune del paciente. Se ha observado que los sujetos infectados generan mayor resistencia cuando son tratados con una sola clase de fármaco (monoterapia) sin embargo, la resistencia a dos o más fármacos de distinta clase es menos probable.²³ La terapia antirretroviral combinada es eficaz en el tratamiento del VIH sin importar el subtipo del cual se trate, sin embargo la resistencia ante los fármacos difiere según la variante del virus. Una terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA) combina tres o más clases de fármacos que actuarán en distintos estadios biológicos del virus en el huésped, y por lo tanto posee una mayor eficiencia terapéutica.

Inhibidores de la fusión y de la entrada

La inhibición de los mecanismos de entrada y fusión del VIH-1 a los linfocitos CD4 constituye una nueva estrategia en el tratamiento antirretroviral; los inhibidores de la entrada actúan bloqueando el correceptor CCR5 impidiendo la entrada del virus a la célula, los virus con tropismo dual (CXCR4-CCR5) y los CXCR4 son resistentes a este tipo de fármaco, en cambio los inhibidores de la fusión se unen al dominio HR1 del gp41 inhibiendo el cambio conformacional de esta glucoproteína, evitando así la fusión entre la envoltura del virus y la membrana de las células CD4.²⁴ Este último ha demostrado eficiencia en el tratamiento de pacientes altamente pre-tratados con fracaso virológico y multi-resistentes. Sin embargo, la gran diversidad (20-40%) en la región env, pronostica que este grupo de fármacos tendrán una probabilidad de desarrollar resistencia natural y emergente.

Inhibidores de la transcriptasa reversa

La transcriptasa reversa está compuesta por dos subunidades denominadas p66 y p51. El sitio activo de la enzima se encuentra en la subunidad p66 formada por el dominio polimerasa unido al dominio ARNasa. Esta clase de fármacos se clasifican en dos grupos con base en sus características

moleculares que determinan su mecanismo de acción: los inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos o nucleótidos (ITIAN) y los inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos a nucleósidos (ITINAN). Los ITIAN poseen una estructura similar a los nucleósidos naturales y como éstos, necesitan estar trifosforilados por una fosfoquinasa para ser biológicamente activos. Una vez fosforilados compiten con los dNTP para ser incorporados a la cadena de ADN sintetizada por la transcriptasa reversa; al carecer de un grupo hidroxilo en la posición 3' del azúcar interrumpe el proceso de síntesis y los nuevos nucleótidos no se unen a la cadena de ADN sintetizada.²⁵ En cambio los ITINAN no requieren activación metabólica; no se incorporan a la cadena de ADN en formación, en su lugar se unen de forma no competitiva a un sitio cercano al centro catalítico de la enzima, una región hidrofóbica de la subunidad p66. La unión produce un cambio conformacional en la enzima imposibilitando la polimerización del ADN. Estos fármacos son inútiles en el tratamiento de la infección por VIH-1 subtipo O y contra infecciones del VIH-2. Algunas cepas del subtipo F muestran una menor sensibilidad a estos fármacos.²⁶

Inhibidores de la integrasa

La integración cromosómica del ADN viral en el genoma del huésped es una etapa crucial en la replicación del VIH-1. Esta clase de fármacos evita la integración del ADN viral en el genoma de la célula huésped y no tiene ninguna acción sobre la enzima que lleva a cabo este proceso. Sin embargo, la gama de fármacos utilizados para este propósito es muy limitada.

Inhibidores de la proteasa

Estos fármacos se unen selectivamente al sitio activo de la proteasa, compitiendo con sus sustratos naturales *gag* y *gag-pol* dando como resultado la formación de partículas virales inmaduras, y por consiguiente no infecciosas, particularmente se habla de la inhibición de la aspartilproteasa del virus que es esencial para la catálisis proteica.²⁷

Fracaso terapéutico

El fracaso de un régimen antirretroviral se define como el incremento de las concentraciones de ARN viral en un paciente en quien no se detectaba previamente el virus, a pesar de un tratamiento ininterrumpido por ese régimen. (*Department of Health and Human Services*, 2012).²²

El fracaso clínico ocurre cuando el paciente sufre alguna enfermedad oportunista exceptuando cuando ésta se desarrolla entre los primeros 3-6 meses de tratamiento en pacientes con inmunosupresión avanzada. Un fracaso inmunológico refiere que en un periodo de entre 4 y 7 años no se logra mantener un recuento de células CD4 superior a 350-500 x ml, o cuando no se incrementa el recuento de las mismas a niveles que van de 50-100 sobre el recuento basal al lograr la supresión virológica. En cambio, un fracaso virológico ocurre cuando la carga viral es detectable después de 24 semanas de tratamiento, o bien después de haber logrado niveles indetectables ("<50 copias por mililitro)

estos son nuevamente detectados en dos determinaciones consecutivas; sin embargo, pueden ser detectadas cargas virales inferiores a 1000 copias por mililitro, y esto no siempre es o será sinónimo de un fracaso virológico; cuando esto sucede no es recomendable alterar el tratamiento en curso, pero debe aumentarse la vigilancia sobre el paciente.²⁸

Implicaciones clínicas

El subtipo B del VIH-1 tiene una mayor incidencia en países desarrollados, motivo por el cual, en general, los métodos de diagnóstico, desarrollo de terapia ARV e investigación están encaminados a este subtipo. La alta tasa de mutación del VIH puede generar diferente sensibilidad a distintos fármacos, y por consiguiente distintos tratamientos para cada variable del VIH. Los métodos de diagnóstico se ven afectados por estas variantes del virus, pues según estudios realizados, un método de diagnóstico para el subtipo B puede resultar en un falso negativo para un subtipo no-B, por lo cual es importante incorporar técnicas de diagnóstico específicas para subtipos no-B. Algunas técnicas moleculares de cuantificación de carga viral utilizan primers (secuencias específicas complementarias al ADN viral de entre 18 y 25 bases), que están diseñados específicamente para secuencias del subtipo-B, y al aplicarlas a un subtipo no-B, existe la posibilidad de no hibridar en el genoma del virus y por consecuencia, errar en el diagnóstico y futuro tratamiento. La respuesta ante el tratamiento ARV es distinta entre diferentes subtipos del VIH-1, debido a que cada variante presenta distinta sensibilidad a la presión del fármaco, por ejemplo, los ARV ITINAN ofrecen una baja actividad frente al grupo VIH-2, o una total ineficiencia en el grupo O del VIH-1.²⁹

Métodos de laboratorio para la detección de resistencias e interpretación de resistencias

Debido a la resistencia farmacológica presentada en algunos individuos bajo tratamiento ARV se tuvo la necesidad de diseñar métodos o técnicas que ayudaran a detectar las mutaciones, esto para modificar el tratamiento en curso. Existen dos métodos básicos utilizados para determinar la resistencia de cepas de virus frente a los fármacos ARV'S; genotipificación y fenotipificación.³⁰

La genotipificación es el método que se basa en el análisis del genoma del virus para identificar mutaciones presentes asociadas con la ineficiencia terapéutica a los ARV. Es un marcador indirecto de la resistencia e identifica mutaciones antes de ser expresadas, es un proceso simple y rápido, menos complejo técnicamente, y más económico comparado con la fenotipificación.³¹ Este último es un método directo y cuantitativo de sensibilidad a uno o más fármacos, a partir de la concentración de fármaco necesaria para reducir la replicación del agente patógeno. La resistencia fenotípica se expresa comparando el aumento

de la concentración de fármaco para inhibir el agente patógeno, comparado con el virus de referencia (*wild type*); por el aumento del IC50 o de IC90. Las veces que se haya incrementado la dosis durante el proceso, define la resistencia fenotípica. El proceso es lento (mínimo dos semanas para obtener resultados), técnicamente complejo, de fácil interpretación y permite identificar resistencia a uno o más fármacos que actúan en la misma diana terapéutica (resistencia cruzada).³²

Genotipificación (interpretación)

La interpretación de un genotipo requiere de un conocimiento profundo de cómo y a qué nivel afecta cada mutación en el tratamiento ARV en curso o próximo a administrar. Existen tres métodos de interpretación del genotipo: fenotipo virtual, algoritmos informáticos y consulta de un experto o especialista en el área.

El fenotipo virtual se basa en el análisis comparativo de la secuencia de interés con una base de datos que contiene codones de resistencia identificados y su impacto en el tratamiento. Estas bases de datos se actualizan periódicamente debido a la alta tasa de mutación del virus. Los algoritmos informáticos son estrategias de interpretación de resistencia cualitativa, basándose en la presencia de patrones de mutación en el genotipo e indican si la resistencia es posible, presente o ausente. En ocasiones estas herramientas no son suficientes para una adecuada interpretación de las mutaciones que presenta, por ello es necesaria la intervención de un especialista en el área para que el diagnóstico sea preciso y por ende se esclarezcan las dudas que dificultan el diagnóstico.

Cuando se efectúan ambos métodos en una misma muestra, se obtienen resultados discordantes en la mayoría de las ocasiones; esto debido a diversos factores que intervienen en ello. Entre dichos factores sobresalen los errores técnicos en la genotipificación que no permiten identificar la existencia de mezclas genotípicas. La presencia de mutaciones transicionales que no son identificadas por el fenotipo, mas si por el genotipo. Mutaciones antagonistas, que aunque se genera resistencia a un fármaco, causa hipersensibilidad a un segundo, pero existe la posibilidad de que en éste se presenten mutaciones de resistencia indetectables por el fenotipo. Existen mutaciones que no pueden ser detectadas en la genotipificación; esto debido a algunos algoritmos de interpretación que no consideran ciertas mutaciones relacionadas con la resistencia, pero que su efecto sí puede ser detectable con un método fenotípico. Los patrones complejos de un genotipado dificultan su interpretación a causa de información incompleta sobre mutaciones secundarias.³³

Ambos métodos, aunque útiles para la detección de la resistencia, comparten algunas limitaciones como la dificultad de detección cuando la población mutada es inferior al 20% de la población viral total, o la CVP ≤ 1000 copias/ml. Gracias a los avances científicos y a la investigación latente en esta área, se ha logrado superar esas limitaciones aunque estos adelantos no formen parte de la técnica más utilizada por las restricciones económicas que representan.

Resistencia del VIH a los fármacos antirretrovirales

Una resistencia es el decremento en la actividad intrínseca del fármaco antirretroviral debido a una modificación en su diana biológica, a consecuencia de un mecanismo de adaptación vírica. Una vez presentada la resistencia al tratamiento ARV en curso, es necesario identificar ante cuál o cuáles fármacos se ha desarrollado esta condición, siendo clave para una modificación en el tratamiento. La generación de resistencia en los fármacos ARV actuales varía entre fármacos de distintas familias e incluso entre fármacos de una misma. Según la sensibilidad a la resistencia a los fármacos, éstos pueden clasificarse como fármacos de baja barrera genética y fármacos de alta barrera genética. Los fármacos que poseen baja barrera genética pierden su actividad intrínseca con una sola variante de mutación, por ejemplo algunos ITAN e ITINAN pueden tornarse ineficientes con sólo un cambio de nucleótido en el blanco biológico, en cambio aquellos que presentan alta barrera genética, requieren de múltiples modificaciones genómicas en el sitio de acción, tal es el caso de los IP que presentan una buena barrera genética, pues requieren dos mutaciones primarias y dos a tres mutaciones secundarias para perder su efecto debido a que la proteasa viral puede mutar en diversas posiciones sin perder su actividad enzimática.^{34,35} Así mismo, la generación de resistencia se ve propiciada por problemas en la adherencia, potencia y en la farmacocinética del ARV.

Mecanismos de resistencia

Los codones que conforman el genoma están compuestos por tripletes de nucleótidos que codifican para un aminoácido específico, cuando uno de estos codones sufre una mutación, es decir, cuando un nucleótido específico es sustituido por otro, posiblemente se codificará para un aminoácido distinto al determinado. Al codón resultante o causante de dicha permutación se le conoce como codón de resistencia. De acuerdo con el aminoácido reemplazado, será la nomenclatura de la mutación iniciando con la letra específica que identifica al aminoácido de secuencia *wild type*, posteriormente se coloca el número que indica la posición del codón en el genoma para concluir con la letra correspondiente al aminoácido reemplazante.³⁵

Resistencia a inhibidores de entrada

La resistencia a este tipo de fármacos es causada por inhibición, ya sea de la unión virus-célula, de la interacción con el co-receptor, así como de la fusión celular, donde la participación de las glucoproteínas gp 120 y gp 41 es indispensable. La gran plasticidad característica de la gp 120 se ve reflejada en el limitado número de mutaciones que afectan a la unión del virus al linfocito CD4.³⁶

La resistencia a este tipo de fármacos es consecuencia de la modificación en la glucoproteína gp 41. Se han detectado mutaciones de resistencia presentes en los codones con posición 36-40, y 42-45 de la porción HR1 de esta misma glucoproteína, en especial las mutaciones G36 D/S, I37V, V38A/M/E, Q39R, Q40H, N42T Y N43D generan

resistencia a enfuvirtida.^{24,37} Existe evidencia de que las mutaciones en la región del asa V3 y en las regiones V2, C3 Y V4 de la gp 120, así como de la gp 41, también generan resistencia, pero en este caso se refieren a un fracaso terapéutico a maraviroc, fármaco considerado antagonista del co-receptor CCR5. La presencia de mutaciones permite que el virus pueda unirse a CCR5, aun con maraviroc presente, dando lugar a un antagonismo no competitivo, y de esta manera disminuyendo la sensibilidad del organismo al antirretroviral.³⁸

Resistencia a inhibidores de la transcriptasa inversa, análogos a nucleósidos/ nucleótidos

Los ITIAN necesitan ser fosforilados para ser incorporados en la cadena de ADN en formación. Uno de los mecanismos de resistencia ante esta familia de fármacos es la pirofosforólisis, que consiste en la remoción de los ITIAN incorporados mediante hidrólisis; la transcriptasa reversa mutada permite el acercamiento al análogo incorporado de ATP que ataca el enlace fosfodiéster que une al ITIAN a la cadena de ADN. Este tipo de resistencia se da por mutaciones asociadas a timidina (TAM). Otro mecanismo de resistencia es dado por impedimentos estéricos causados por cambios estructurales adyacentes al sitio catalítico de la transcriptasa reversa, permitiendo a la enzima discriminar a los ITIAN e incluir a los sustratos necesarios para el ensamble de la cadena de ADN viral. Ejemplo de este tipo de mutaciones es el complejo Q151M, un conjunto de mutaciones que brindan una resistencia contra la mayoría de los ITIAN; la primera de estas mutaciones ocurre cerca del sitio de unión del ITIAN y lentamente se van generando más mutaciones que incrementan la resistencia viral, este complejo es raro en el VIH-1.^{39,40}

Resistencia a inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos a nucleósidos

Los fármacos de este tipo se unen a un sitio hidrofóbico cercano al centro catalítico de la enzima, donde mediante una unión alostérica efectúa la inhibición. Cabe destacar que a diferencia de los ITIAN, este tipo de fármacos no requieren de activación celular, además de que actúan inhibiendo la actividad de la enzima directamente. La mayoría de las mutaciones de resistencia a estos ARVS se encuentran en el sitio hidrofóbico donde afectan la unión del fármaco y su respectiva diana; una sola mutación en este sitio puede generar alto nivel de resistencia a los ARVS de este tipo, dependiendo de la modalidad de la terapia en que se administra este fármaco.⁴¹

Los ITINAN de primera generación presentaban una baja barrera genética además de resistencia cruzada, siendo las principales mutaciones L100I, K103N, V106A/M, V108I, Y181C/I, Y188L y G190A/S que generan MDR (multidrogoresistencia) a NVP y EFV.

Debido a este fracaso terapéutico surgieron los ITINAN de segunda generación, que presentaban ahora una mayor barrera genética debido a las modificaciones en su flexibilidad molecular que facilita su adaptación a este medio aun en presencia de mutaciones. Para generar resistencia en esta nueva generación se requiere de tres o más mutaciones de las hasta ahora 17 identificadas:

V90I, A98G, L100I, K101E/H/P, V106I, E1385A, V179D/FT, Y181C/I/V, G190S/A y M230L, mismas que son identificadas mediante métodos genotípicos auxiliados de algoritmos para la detección de resistencias.⁴²

Resistencia a inhibidores de la integrasa

La enzima encargada de incorporar el ADN viral al del huésped está conformada por 288 aminoácidos, codificada por el gen pol. Hoy en día se dispone de dos fármacos capaces de inhibir la función de esta enzima (raltegravir y elvitegravir). Diversos estudios demuestran la resistencia cruzada entre raltegravir y elvitegravir y la baja barrera genética que los caracteriza.

Existen dos estándares principales de resistencia a inhibidores de la proteasa, en los codones de la posición 148 y 155, distinguidos como la ruta de Q148H/K/R y la de N155H. Ambos patrones incluyen mutaciones secundarias L74M+E138A y E138K o G140S para Q148H/K/R; siendo la combinación más frecuente Q148H-G140S que produce una disminución (hasta diez veces) en la sensibilidad al fármaco.⁴³

La ruta o mutación primaria N155H incluye a L74M, E92Q, T97A, E92Q+T97A, Y143H, G163K/R, V151I o D232N aunque en los estudios realizados se encontró evidencia para la determinación de un tercer patrón conformado por Y143R/C+L74A/I, T97A, I203M, S230R.⁴⁴

Resistencia a inhibidores de la proteasa

Estos ARVS poseen una amplia barrera genética por lo que para que presenten resistencia se requiere de tres a más mutaciones. Dicha resistencia se va generando de manera lenta y secuencial según van apareciendo los cambios. Existen mutaciones primarias que afectan los codones 30, 32, 46, 47, 48, 50, 54, 76, 82, 84, 88 y 90, y mutaciones secundarias en los codones 10, 20, 24, 36, 63, 64, 71, 77 y 93.

Las mutaciones primarias son específicas de cada fármaco y aparecen de manera rápida tras la presión que éste ejerce de manera selectiva. Requieren de un aumento del fármaco para poder surtir efecto, debido a que dichas mutaciones causan una disminución en la afinidad del mismo por su diana biológica. En presencia de la terapia con IP, las cepas resistentes suelen aumentarse en relación a las variantes salvajes; mientras que en ausencia de la presión del fármaco suelen encontrarse en minoría, siendo las variantes *wild type* las cepas dominantes. Cabe destacar que las mutaciones primarias no generan resistencias cruzadas entre los diversos IP.⁴⁴

Las mutaciones secundarias son consecuencia de la existencia de una o varias mutaciones primarias. Que aunque se presenten lejos del sitio activo de la proteasa, al sumarse estos errores replicativos, se eleva el grado de resistencia y la capacidad de reproducción del virus, por lo que podemos destacar una importante resistencia cruzada. Debido a esto, la más alta resistencia del virus hacia los ARV se asocia con el fracaso terapéutico de los fármacos más utilizados en la terapia antirretroviral, los inhibidores de la proteasa.⁴⁷

Las mutaciones en los codones 33, 82, 84 y 90 son denominadas erróneamente mutaciones universales de multiresistencia a inhibidores de la proteasa, puesto que

existe evidencia de que algunas de las mutaciones no aplican de manera general como posible resistencia a los IP; en el caso de la mutación 33F, no tiene relevancia al menos para 3IP, y sólo genera un bajo grado de resistencia.⁴⁸

Mecanismos de resistencia a nivel celular

La resistencia ante ARV no solamente es producto de mutaciones genéticas del virus, algunos cambios fisiológicos de las células infectadas dificultan o impiden que el fármaco llegue a su sitio de acción. Si se altera la fun-

ción de las enzimas que fosforilan los ITIAN éstos serían inútiles, lo cual ocurre cuando aumenta la cantidad de sustratos, disminuyendo la cantidad de enzimas disponibles para fosforilar el fármaco. Debido a lo anterior no se recomienda administrar fármacos que compartan la misma ruta de fosforilación, ya que pueden competir por la misma enzima. También se ha observado que linfocitos y otro tipo de células pueden expulsar el ARV al medio extracelular por medio de bombas de expulsión localizadas en su membrana celular.^{47,48}

Referencias

1. Griffiths PD. "Improved understanding of human genetic control of HIV pathogenicity". *Rev Med Virol* 2005; 15(1), 1-2.
2. Mellors J.W., Rinaldo C.R., Gupta P., White R.M., Todd J. A., Kingsley L.A. "Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma". *Science*. (1996); 272(5265): 1167-1170.
3. Perrin L, Kaiser L, Yerly S. "Travel and the spread of HIV-1 genetic variants". *Lancet Infect Dis*. 2003; 3(1):22-27.
4. Murphy F.A. "Virus taxonomy". En: Fields B N, Knipe D M, Howley P M, editors. *Fields virology*. 3rd ed. Philadelphia, Pa: Lippincott-Raven Publishers; 1996. pp. 15-57.
5. Sierra García de Quevedo José Julio (2004). "Taxonomía y virus de la inmunodeficiencia humana". *Rev Mex Patol Clin*. 2004; 51(1): 37-41.
6. Frankel A.D., and Young, J.A. "HIV-1: fifteen proteins and an RNA". *Annu Rev Biochem*. 1998; 67: 1-25.
7. Koshiba, T., and Chan, D.C. "The prefusogenic intermediate of HIV-1 gp41 contains exposed C-peptide regions". *J Biol Chem*. 2003; 278(9): 7573-7579.
8. Frankel A.D., and Young, J.A. "HIV-1: fifteen proteins and an RNA". *Annu Rev Biochem*. 1998; 67: 1-25.
9. Greene WC. "The molecular biology of human immunodeficiency virus type 1 infection". *N. Engl J Med*. 1991; 324(5):308-317.
10. Piantadosi A., Chohan B., Chohan V., McClelland R. S., and Overbaugh, J. "Chronic HIV-1 Infection Frequently Fails to Protect against Superinfection". *PLoS Pathog* 2007; 3(11): e177.
11. Rousseau C.M., Learn G. H., Bhattacharya T., Nickle D. C., Heckerman D., Chetty S., et al. "Extensive intrasubtype recombination in South African human immunodeficiency virus type 1 subtype C infections". *J Virol*. 2007; 81(9): 4492-4500.
12. Mansky L.M. Forward "Mutation Rate of Human Immunodeficiency Virus Type 1 in a T Lymphoid Cell Line". *AIDS Research and Human Retroviruses*. 1996; 12: 307-314.
13. Perelson AS, Neumann AU, Markowitz M, Leonard JM, Ho DD. "HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time". *Science*. 1996; 15:271(5255):1582-1586.
14. Avelin Fobang Aghokeng., Léonard Ewane., Bih Awazi., Aubin Nanfack., Eric Delaporte., Martine Peeters., Léopold Zekeng. "Evaluation of four simple/rapid assays and two fourth-generation ELISAs for the identification of HIV infection on a serum panel representing the HIV-1 group M genetic diversity in Cameroon". *J Acquir Immune Defic Syndr* 2004; 37(5):1632-1640.
15. Domingo E., Mas A., Yuste E., Pariente N., Sierra S., Gutierrez-Riva M, et al. "Virus population dynamics, fitness variations and the control of viral disease: an update". *Prog Drug Res*. 2001; 57:77-115. 77-115.
16. Geretti A.M. "HIV-1 subtypes: epidemiology and significance for HIV management". *Curr Opin Infect Dis*. 2006; 19(1): 1-7.
17. Yamaguchi J., Bodelle P., Vallari A.S., Coffey R., McArthur C.P., Schochetman G., et al. "HIV infections in northwestern Cameroon: identification of HIV type 1 group O and dual HIV type 1 group M. and group O infections". *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2004; 20(9): 944-957.
18. Ariën KK., Abraha A., Quiñones-Mateu ME., Kestens L., Vanham G., Arts E.J. "The replicative fitness of primary human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) group M, HIV-1 group O, and HIV-2 isolates". *J Virol*. 2005; 79(14): 8979-8990.
19. Lospitao E., Alvarez A., Soriano V., Holguín A. "HIV-1 subtypes in Spain: a retrospective analysis from 1995 to 2003". *HIV Med*. 2005; 6(5): 313-320.
20. Herring BL., Ge YC., Wang B., Ratnamohan M., Zheng F., Cunningham AL., et al. "Segregation of human immunodeficiency virus type 1 subtypes by risk factor in Australia". *J Clin Microbiol* 2003; 41(10): 4600-4604.
21. Sá-Ferreira J.A., Brindeiro P.A., Chequer-Fernandez S., Tanuri A., Morgado MG. "Human immunodeficiency virus-1 subtypes and antiretroviral drug resistance profiles among drug-naïve Brazilian blood donors". *Transfusion*. 2007; 47(1): 97-102.
22. Department of Health and Human Services, 2012 News Releases. En: <http://www.hhs.gov/news/press/2012pres/2012.html>
23. Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents. "Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents". *Department of Health and Human Services*. December 1, 2009; 1-161. En: <http://www.aidsinfo.nih.gov/ContentFiles/AdultandAdolescentGL.pdf>.
24. Raffi F. "Enfuvirtide, first fusion inhibitor in the treatment of human immunodeficiency virus infection: mechanism of action and pharmacokinetics". *Med Mal Infect*. 2004; 34; 1: 3-7.
25. Arts E.J., Wainberg. M.A. "Mechanisms of nucleoside analog antiviral activity and resistance during human immunodeficiency virus reverse transcription". *Antimicrob Agents Chemother*. 1996; 40(3): 527-540.

26. Fonjongo P.N., Mpoudi E.N., Torimiro J.N., Alemnji G.A., Eno L.T., Lyonga E.J., *et al.* "Human immunodeficiency virus type 1 group m protease in cameroon: genetic diversity and protease inhibitor mutational features". *J Clin Microbiol.* 2002; 40(3): 837-845.
27. Tomasselli A.G., Heinrikson R.L. "Targeting the HIV-protease in AIDS therapy: a current clinical perspective". *Biochim. Biophys. Acta.* 2000; 1477: 189-214.
28. Mirales C. "Tratamiento antirretroviral en pacientes con fracaso virológico previo". *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2006; 5(2): 37-46.
29. Harris B., Von Truchsess I., Schätzl H.M., Devare S.G., Hackett J. Jr. "Genomic characterization of a novel HIV type 1 B/G intersubtype recombinant strain from an injecting drug user in Germany". *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2005; 21(7): 654-660.
30. Carlos S., Chuec N., Alvarez M., Garcia F. "Resistencias del VIH". *JANO.* 2006; 1604:63-67.
31. Wilson J.W. "Update on antiretroviral drug resistance testing: combining laboratory technology with patient care". *AIDS Read.* 2003; 13(1): 25-30, 35-38.
32. Petropoulos C.J., Parkin N.T., Limoli K.L., Lie Y.S., Wrin T., Huang W., *et al.* "A novel phenotypic drug susceptibility assay for human immunodeficiency virus type 1". *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44(4): 920-928.
33. Brun-Vézinet F., Descamps D., Ruffault A., Masquelier B., Calvez V., Peytavin G., *et al.* "Clinically relevant interpretation of genotype for resistance to abacavir". *AIDS.* 2003; 15; 17(12): 1795-1802.
34. Alcamí J. "Avances en la inmunología de la infección por el VIH". *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2004; 22(8): 486-496.
35. Wainberg Mark A., Ph.D., Zaharatos Gerasimos J., M.D. and Brenner Bluma G., Ph.D. "Development of Antiretroviral Drug Resistance". *The New England Journal of Medicine.* 2011; 365(7):637-646.
36. Soriano V., de Mendoza C. "Genetic mechanisms of resistance to protease inhibitors and entry inhibitors". *HIV Clin Trials.* 2002; 3(3): 249-257.
37. Johnson VA., Brun-Vézinet F., Clotet B., Günthard H.F., Kuritzkes D.R., Pillay D., *et al.* "Update of the drug resistance mutations in HIV-1". *Top HIV Med.* 2007; 15(4): 119-125. "Characterization of Maraviroc Resistance in Patients
38. Failing Treatment with CCR5-Tropic Virus" in MOTIVATE 1 and 2. XVI international HIV drug resistance workshop. Barbados, 12-16 de Junio de 2007.
39. Ruiz L. "Mecanismos de resistencia". En: V. (eds). *Resistencias a los antirretrovirales 2005.* Barcelona: Publicaciones Permanyer; 2005. p. 11-24.
40. Clavel F., Hance A.J. "HIV drug resistance". *N. Engl J Med.* 2004; 350 (10): 1023-1035.
41. Erickson J.W., Burt SK. "Structural mechanisms of HIV drug resistance". *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1996; 36: 545-571.
42. De Mendoza C., Soriano. *Guía e resistencias a los antirretrovirales 2007. Interpretación de resistencia de la red de investigación en SIDA.* Barcelona: Publicaciones Permanyer; 2007.
43. Steigbigel R, Kumar P, Eron J, *et al.* "Results of BEN-CHMRK-2, a phase III study evaluating the efficacy and safety of MK-0518, a novel HIV-1 integrase inhibitor, in patients with triple-class resistance virus [abstract 105bLB]". Program and abstracts of the 14th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections; Los Angeles, CA Alexandria, VA: Foundation for Retrovirology and Human Health; 2007.
44. Zennou V., Mammano F., Paulous S., Mathez D., Clavel F. "Loss of viral fitness associated with multiple gag and gag-pol processing defects in human immunodeficiency virus type 1 variants selected for resistance to protease inhibitors in vivo". *J Virol.* 1998; 72(4): 3300-3306.
45. Nijhuis M., Schuurman R., de Jong D., Erickson J., Gustchina E., Albert J., *et al.* "Increased fitness of drug resistant HIV-1 protease as a result of acquisition of compensatory mutations during suboptimal therapy". *AIDS.* 1999; 13(17): 2349-2359.
46. Garcia-Deltoro M. "Resistencia a tripanavir". *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2006; 5(2): 22-28.
47. Villalba N., Soriano V., Gómez-Cano M., Castilla J., Mas A., González-Lahoz J. "Short-term efficacy and safety of stavudine in pretreated HIV-infected patients". *Antivir Ther.* 1997 ;2(3): 185-189.
48. Huisman M.T., Smit J.W., Schinkel A.H. "Significance of P-glycoprotein for the pharmacology and clinical use of HIV protease inhibitors". *AIDS.* 2000. 18; 14(3): 237-242.