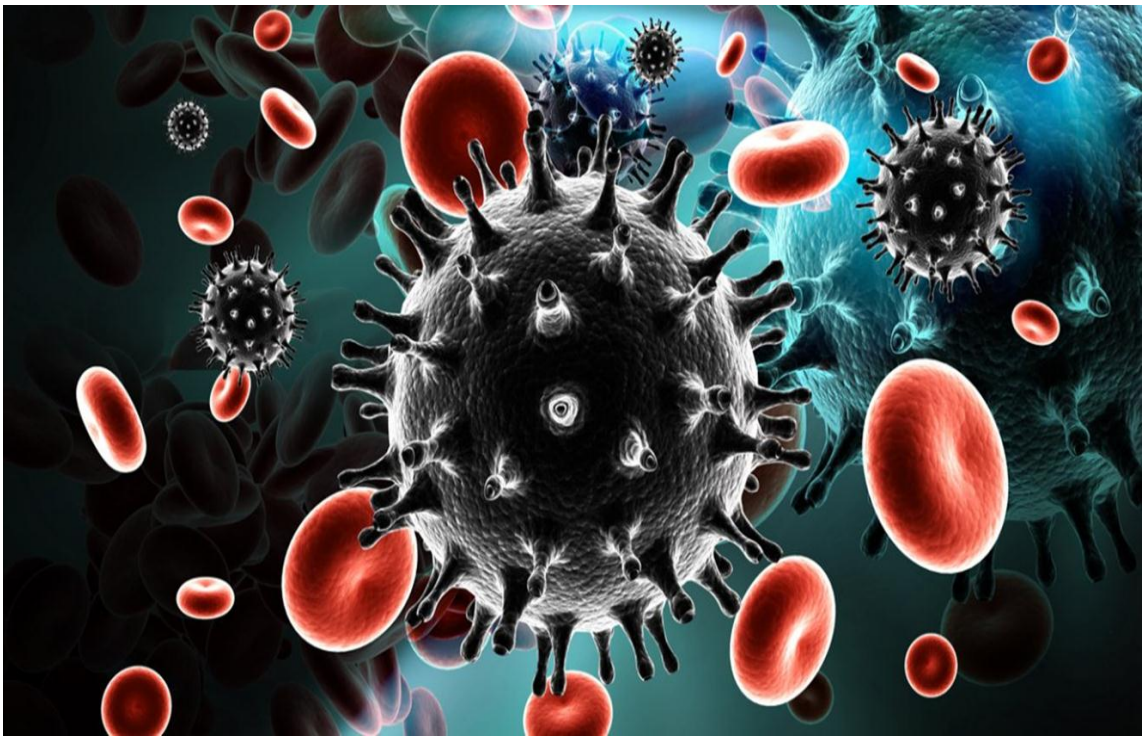
Resumen.pdf

TESIS COMPLETA.pdf

Consentimiento Informado.pdf

"TESIS DE MAESTRÍA PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE MASTER EN VIROLOGÍA"



# "RESISTENCIA PRIMARIA Y SECUNDARIA DEL VIH-1 A LOS INHIBIDORES DE LA INTEGRASA"

## ENERO 2017- ENERO 2019


Autora: Lic. Yanet Pintos Saavedra

**Instituto de Medicina Tropical**

**"PEDRO KOURI"**

**Departamento de Virología**


**2019**

# TESIS DE MAESTRÍA

## "RESISTENCIA PRIMARIA Y SECUNDARIA DEL VIH-1 A LOS INHIBIDORES DE LA INTEGRASA"

## ENERO 2017- ENERO 2019

Autora: Lic. Yanet Pintos Saavedra

Tutores: Lic. Lissette Pérez Santos, DrC[1]

Dra. Vivian Kourí Cardellá, DrC[1]

Afiliación:[1] Instituto de Medicina tropical "Pedro Kourí"

**Instituto de Medicina Tropical**

**"PEDRO KOURI"**

**Departamento de Virología**

## ***Agradecimientos***

*Yo quiero dar gracias primero que nada a Dios, por cuidarme, guardarme y permitirme llegar al final de esta tesis.*

*A mi esposo, por apoyarme siempre, por estar ahí cuando pensaba que no podía más.*

*A mis padres por ser mi guía desde que era una niña, y porque sin su ayuda no habría podido llegar hasta el final.*

*A mi hermano y a Tamara, gracias por su preocupación y su apoyo en todo momento.*

*A mis abuelos, siempre preocupados por todo lo que tenía que ver con mi vida porofesional.*

*A mis tíos y mi prima porque estuvieron ahí cuando los necesité*

*A mis tutores:*

1. *La Lic. Lissette Pérez Santos, que me ayudó, y me enseñó en todo momento, por estar presente en cada detalle de la tesis, y más que nada quiero darle gracias porque no solo fue mi tutora, sino también una amiga en los momentos difíciles.*
2. *A la Dra. Vivian Kourí Cardellá, por recibirme en el laboratorio desde que empecé aquí en el TEK, por su preocupación y dedicación todo este tiempo.*

*A todo el personal del laboratorio del departamento de Virología, especialmente al laboratorio de TTOS, excelentes compañeras de trabajo como: Lissette, Vivian, Yudira, Melisa, Elías, Celeste, Yoanna, Yaniris.*

*También todos los compañeros que en momento de la tesis cuando necesite su ayuda, me dieron la mano sin pensarlo dos veces: Carlos, Mayra, Yoanna, Lissette, Elías, Yaimi, entre otras.*

*A mis amigos de la maestría, que durante estos dos años me han acompañado y juntas hemos sufrido y también nos hemos reído: Ana Marys, Dayana,, y los que viene conmigo desde la universidad: Daylin, Camilo y Yandy.*

*A mis amigas y compañeras de la guagua y del desayuno, y almuerzo hemos compartido de todo juntas, y en este tiempo han sido de gran ayuda para mí: Yahisel, Yani, Rosita, Maylin, Daylin, Carlos y Magile, Teresa.*

*A mi hija Liana, que ha soportado todo este tiempo dentro de mí, ha sido una nena que se ha portado muy bien y gracias a Dios yo he podido terminar esta tesis.*

*Y por último y no menos importante quiero darle gracias a todos esos profesores que me han acompañado a lo lago de la maestría que me han motivado, enseñado, y preparado no solo como profesional sino también para la vida.*

*A todas estas personas, gracias, Por su apoyo y dedicación*

***Resumen***

*La terapia antirretroviral altamente eficaz ha cambiado la historia natural de la infección por VIH/sida. Los estudios cubanos muestran altos niveles de resistencia viral en pacientes tratados y no tratados. En el 2017 se adquieren los inhibidores de la integrasa para ser empleados en terapia de rescate y cambiar los esquemas de primera línea. El objetivo del presente estudio fue normalizar un RCP-secuencia casero y determinar la resistencia primaria y secundaria del VIH-1 a los inhibidores de la integrasa en el período enero 2017-enero 2019. Se determinó el límite inferior de amplificación y se evaluó la exactitud del ensayo. Se estudiaron 32 pacientes que deberían recibir o recibían, inhibidores de la integrasa, como terapia de rescate. A partir del plasma se realizó la extracción del ácido ribonucleico, amplificación y secuenciación del gen de la integrasa viral. Se determinaron las mutaciones virales asociadas a resistencia y el subtipo viral. El límite inferior de amplificación para el subtipo B y C fue de 250 copias/mL; CRF_BG, 5 000 copias/mL; CRF18_cpx, 12 000 copias/mL y CRF19_cpx, 1 220 copias/mL. Los valores de identidad nucleotídica y aminoacídica fueron ≥98% en los ensayos de repetitividad y la reproducibilidad. Se detectaron en el gen de la integrasa los subtipos: B (41%), CRF19_cpx (24%), CRF18_cpx y C (14%, respectivamente), y subtipo G (7%). No se detectaron mutaciones de resistencia en los 23 pacientes vírgenes al dolutegravir. En cuatro de los seis pacientes tratados, se detectaron resistencia a los inhibidores de la integrasa. El método de RCP-secuenciación casero normalizado, fue más eficiente para detectar los subtipos puros que los recombinantes. Se sugiere la utilidad de este antirretroviral como terapia de rescate en población no tratada. Se emplearon esquemas sub-óptimos en pacientes tratados con esta familia.*

## ***Listado de abreviaturas***

***3TC:*** *Lamivudina*

***ADN:*** *Ácido desoxirribonucleico*

***ADNc:*** *Ácido desoxirribonucleico complementario*

***ARN:*** *Ácido ribonucleico*

***ARNm:*** *Ácido ribonucleico mensajero*

***ARV:*** *Antirretroviral*

***ARVs:*** *Antirretrovirales*

***AZT:*** *Zidovudina*

***BIC:*** *Bictegravir*

***CDC:*** *Centro para el Control de las Enfermedades (del inglés, Centers for Disease Control and Prevention).*

***CRFs:*** *Formas Recombinantes Circulantes (del inglés, circulating recombinant forms)*

***CV:*** *Carga viral*

***CVs:*** *Cargas virales*

***D4T:*** *Estavudina*

***DRV:*** *Darunavir*

***DTG:*** *Dolutegravir*

***EFV:*** *Efavirenz*

***ELV:*** *Elvitegravir*

***env:*** *Gen de la envoltura del VIH-1*

***FRs:*** *Formas recombinantes*

***gag:*** *Gen del VIH-1*

***gp:*** *Glicoproteína de la envoltura viral*

***HSH:*** *Hombres que tienen sexo con otros hombres*

***IPR:*** *Inhibidores de proteasas*

***IN:*** *Integrasa*

***IIN:*** *Inhibidores de la integrasa*

***ITIAN:*** *Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos*

***ITINAN:*** *Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos*

***ITS:*** *Infecciones de transmisión sexual*

***Kb:*** *kilobases*

***LT CD4+:*** *Linfocitos T CD4+ (grupo de diferenciación celular (del inglés, cluster of differentiation)*

***NVP:*** *Nevirapina*

***pol:*** *Gen que codifica para la PR, TI, IN*

***OMS:*** *Organización Mundial de la Salud*

***RT:*** *Resistencia Transmitida*

***RAL:*** *Raltegravir*

***RCP:*** *Reacción en cadena de la polimerasa*

***RTV:*** *Ritonavir*

***sida:*** *Síndrome de inmunodeficiencia adquirida*

***TARVAE:*** *Terapia antirretroviral altamente efectiva*

***TDF:*** *Tenofovir*

***MRD:*** *Mutaciones de resistencia a droga*

***TI:*** *Transcriptasa inversa*

***TLR:*** *Secuencias terminales largas repetidas*

***URF:*** *Formas Recombinantes Únicas (del inglés, unique recombinant forms)*

***VIH:*** *Virus de la inmunodeficiencia humana*

***VIH-1:*** *Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1*

***VMRD:*** *Vigilancia de Mutaciones de Resistencia a droga*

***Listado de Aminoácidos***

***A:*** *Alanina*

***R:*** *Arginina*

***N:*** *Asparagina*

***D:*** *Aspártico*

***C:*** *Cisteína*

***E:*** *Glutámico*

***Q:*** *Glutamina*

***G:*** *Glicina*

***H:*** *Histidina*

***I:*** *Isoleucina*

***U:*** *Selenocisteína*

***L:*** *Leucina*

***K:*** *Lisina*

***M:*** *Metionina*

***F:*** *Fenilalanina*

***P:*** *Prolina*

***S:*** *Serina*

***T:*** *Treonina*

***W:*** *Triptófano*

***Y:*** *Tirosina*

***V:*** *Valina*

***O:*** *Pirrolisina*

***INDICE***

***Introducción*** ..... *3*

***1. Revisión Bibliográfica*** ..... *7*

1.1 Historia y Origen del VIH ..... 7

1.2 Clasificación ..... 7

1.3 Estructura del virión ..... 8

1.4 Genoma ..... 8

1.5 Ciclo de vida del VIH-1 ..... 9

1.6 Historia natural de la enfermedad ..... 10

1.7 Marcadores de la progresión de la enfermedad ..... 12

1.8 Variabilidad genética del VIH-1 ..... 12

1.9 Epidemiología ..... 14

1.9.1 Distribución mundial y regional de los subtipos del VIH-1 ..... 14

1.9.2 Epidemiología en Cuba ..... 15

1.10 Terapia antirretroviral y resistencia viral ..... 15

1.10.1 Resistencia viral a drogas por clases de antirretrovirales ..... 16

1.10.2 Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos/nucleótidos ..... 18

1.10.3 Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos ..... 18

1.10.4 Inhibidores de proteasa ..... 19

1.10.5 Inhibidores de entrada ..... 19

1.10.6 La integrasa viral ..... 20

1.10.7 Inhibidores de la integrasa viral ..... 21

1.11 Resistencia transmitida ..... 23

1.12 Ensayos para la determinación de la resistencia del VIH-1 a los antirretrovirales ..... 24

***2. Materiales y Métodos*** ..... *26*

2.1 Definición del Universo de Estudio ..... 26

2.1.1 Diseño del estudio ..... 26

*2.1.2 Universo de estudio* ..... *26*

2.2. Criterios de Inclusión y Exclusión ..... 26

2.3 Definición de términos ..... 28

2.4 Obtención del consentimiento informado ..... 28

2.5 Introducción de un sistema casero para la determinación del genotipo del VIH-1 en el gen de la IN y la evaluación de la detección de las mutaciones que confieren resistencia a los IIN en pacientes cubanos infectados con VIH-1 ..... 28

2.6 Espécimen para el estudio ..... 30

2.6.1 Extracción del ARN viral ..... 30

2.6.2 Síntesis del ADNc y amplificación ..... 30

2.6.3 Análisis de los productos de la RCP anidada ..... 32

2.6.4 Purificación de los productos de la RCP anidada ..... 33

2.6.5 Secuenciación de ácidos nucleicos ..... 33

2.6.6 Edición de las secuencias ..... 34

2.6.7 Análisis de las mutaciones de resistencia ..... 34

2.6.8 Determinación del subtipo ..... 34

2.6.9 Control de Calidad ..... 35

2.7 Aplicación del RCP-secuencia casero para la determinación de la resistencia del VIH-1 a los IIN en la práctica clínica ..... 35

2.7.1 Población de estudio ..... 35

2.7.2 Ensayos de resistencia genotípica ..... 35

2.7.3 Análisis de los datos ..... 36

***3. Resultados y Discusión*** ..... *37*

3.1 Normalización de un método de RCP-secuenciación casero para la detección de resistencia a los inhibidores de la integrasa del VIH-1 ..... 38

3.1.2 Precisión del ensayo de RCP casero para la amplificación del segmento del gen correspondiente a la integrasa viral. Varibilidad intraensayo (repetitividad) e interensayo (reproducibilidad) ..... 43

**3.2** Detección de resistencia a los inhibidores de la integrasa. Implementación del ensayo genotípico de resistencia para los inhibidores de la integrasa. Aplicación del ensayo casero a la práctica clínica ..... 45

3.2.1 Pacientes no tratados con inhibidores de la integrasa ..... 45

3.2.2 Detección de subtipos en la región de la integrasa del VIH-1 y análisis del subtipo global ..... 50

3.2.3 Variabilidad de la región que codifica para la IN del VIH-1 ..... 52

3.2.4 Pacientes tratados con DTG ..... 57

***Conclusiones*** ..... *64*

**Recomendaciones** ..... 65

***Bibliografía*** ..... *66*

## ***Introducción***

*El Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) pertenece a la familia Retroviridae, subfamilia Lentivirinae, género Lentivirus. Esta familia está conformada por virus exógenos no oncogénicos, que causan infecciones persistentes, ya sea en forma de infecciones activas o crónicas, y enfermedades con períodos de incubación relativamente extensos. El VIH en el interior de la célula puede permanecer en estado latente o ser activo y multiplicarse. El virus se ha aislado de diversos fluidos y tejidos del organismo de personas infectadas (sangre, semen, líquido preseminal, secreciones vaginales y la leche materna). Existen tres vías fundamentales de transmisión del VIH: parenteral, sexual y vertical (1).*

*El VIH es el agente causal del Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida), se describió por primera vez en Los Ángeles en el año 1981, cuando el Centro para el Control de las Enfermedades (del inglés, CDC: Centers for Disease Control and Prevention) reportó el hallazgo de un síndrome particular caracterizado por linfadenopatías generalizadas e infecciones oportunistas poco frecuentes en individuos varones, jóvenes, homosexuales, de raza blanca, habitantes de Nueva York, Los Ángeles y San Francisco, los cuales se encontraban previamente saludables. Como hallazgo de laboratorio se observaba una marcada depleción de linfocitos T CD4+ (grupo de diferenciación celular (del inglés, cluster of differentiation) (2).*

*En el año 1983, el grupo de Luc Montagnier (3) y posteriormente Robert Gallo en 1984, aislaron de forma independiente un retrovirus linfotrópico de células T cuya asociación etiológica al sida se demostró posteriormente por estudios sero-epidemiológicos (4). El Comité Internacional para la Taxonomía del Virus lo denominó: Virus de Inmunodeficiencia Humana tipo 1 (VIH-1) (5). En 1986, se reporta otro virus con características similares pero con un comportamiento diferente desde el punto de vista de la evolución de la enfermedad, a éste nuevo virus se le clasificó como Virus de Inmunodeficiencia Humana tipo 2 (VIH-2). Predomina en el continente Africano, aunque se reportan algunos casos importados en Europa y América (6). Desde ese entonces el VIH se ha convertido en una epidemia que afecta a millones de adultos y niños en todos los continentes produciendo un deterioro progresivo en la respuesta*

*inmune, con el consiguiente desarrollo de infecciones y enfermedades oportunistas que llevan a la muerte del paciente. Se estima que a finales del 2017, en el mundo, habían 37 millones de personas viviendo con VIH-1, de ellas, dos millones eran nuevas infecciones y un millón de personas morían por el sida (7).*

*Desde el punto de vista genético estos virus están provistos de una gran capacidad de adaptación a los cambios introducidos en su medio natural. El VIH-1 fundamenta esta cualidad con diversos mecanismos, entre los que cabe destacar: la transcriptasa inversa (TI) carece de actividad exonucleasa 3'-5', que actúa como correctora de errores; las proteínas estructurales, como aquellas con actividad funcional, poseen una notable plasticidad; el virus presenta una alta tasa de replicación, que permite generar en el orden de $10^{10}$ "nuevos" viriones cada día (1).*

*Hasta la fecha se han descrito cuatro grandes grupos del VIH-1, M (del inglés, main), O (del inglés, outlier), N (del inglés non M, non O) y P (8). El grupo M es el responsable de la pandemia, y a su vez, está compuesto por subtipos que van desde el A (A1, A2, A3 y A4) al D, F (F1 y F2), H, J y K. Además existen múltiples Formas Recombinantes Únicas (URF, del inglés, unique recombinant forms) y 98 Formas Recombinantes Circulantes (CRF, del inglés, circulating recombinant forms) (9, 10).*

*En el año 1995 se describe en Cuba que el subtipo B es la forma genética del VIH-1 predominante y en el 2001 se reporta la circulación de los subtipos A, C, H (11, 12) Cuevas et al., en ese mismo año, refieren un mosaico de subtipos y virus recombinantes (13). Machado y col en un estudio publicado en el año 2019 refiere que las variantes genéticas predominantes en Cuba son el subtipo B (26,9%), CRF19_cpx (24,1%), CRF 20, 23, 24_BG (23,4%) y CRF18_cpx (12%) (14).*

*El período que abarcó los años de 1987 a 1990 trajo grandes esperanzas en el manejo clínico de los pacientes infectados con VIH-1, con el uso de la monoterapia con zidovudina (AZT) para el tratamiento del paciente. Más tarde, entre 1991 y 1994, se introducen otros compuestos de esta misma familia (análogos de nucleósidos) como la zalcitabina (DDC), didanosina (DDI) y estavudina (D4T). En febrero de 1996, durante la Tercera Conferencia sobre retrovirus e infecciones oportunistas, se reportaron los primeros datos de un estudio donde se mostraba que la sola adición de la solución oral de un nuevo medicamento, el inhibidor de la proteasa (IPR), podía reducir la frecuencia de muerte y de sida del 38% al 22%. La terapia antirretroviral altamente efectiva (TARVAE) nació a partir de este mismo año, provocando un cambio sustancial en la historia natural del VIH-1 (15). En la actualidad se encuentran disponibles cinco*

*clases de agentes antirretrovirales (ARVs) para el tratamiento de la infección por VIH-1 inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos y nucleótidos (ITIAN), inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos (ITINAN), IPR, inhibidores de la entrada (antagonistas de los co-receptores, inhibidores de fusión e inhibidores de posfijación), y los inhibidores de la integrasa (IIN) (16, 17).*

*A pesar de que a la integrasa (IN) se la consideró un blanco atractivo para el desarrollo de drogas antirretrovirales, al igual que la proteasa (PR) y la TI, no fue hasta hace pocos años que el primer IIN, el raltegravir (RAL), logró la aprobación regulatoria. A este le siguieron el elvitegravir (EVG), dolutegravir (DTG) y el bictegravir (BIC). Estos compuestos también son conocidos como inhibidores de la transferencia de la cadena (INSTIs), por su mecanismo de acción (17).*

*Los IIN son un nuevo grupo antiviral destinado a bloquear la acción de la IN, enzima que cataliza una serie de pasos en el ciclo de replicación viral, cuya finalidad es la inserción del genoma viral en el ácido desoxirribonucleico (ADN) de la célula que infecta (18).*

*Cuba tiene 31 264 personas diagnosticadas con VIH-1 (a finales del 2018) y viviendo con VIH-1, 25 494 (82%). El sexo masculino es el más afectado y representa el 80,5% (25 161/31 264) del total de casos de la epidemia. Los hombres que tienen sexo con otros hombres (HSH) representan el 74,6% del total de casos diagnosticados. El 86% de las personas viviendo con VIH-1 están recibiendo tratamiento antirretroviral (ARV) y la meta es llegar al 90% al cierre del 2020 (19).*

*Un número importante de pacientes en Cuba tienen, hoy en día, resistencia a una clase completa de una misma familia de drogas (resistencia a toda la familia, con excepción de una de las drogas) e incluso multirresistencia (resistencia a las tres familias (ITIAN+ITINAN IPR), lo que significa que sus opciones terapéuticas son reducidas y para su tratamiento se necesitan fármacos que no se producen en el país (20, 21). Para ello el país decidió adquirir a partir del 2017 nuevos medicamentos, entre los que se encuentran los IIN. Tras su introducción en los esquemas de primera línea en Cuba, y teniendo en cuenta que somos un país de bajos ingresos, se hace necesario conocer la utilidad de las terapias que se emplean, para poder concentrar los recursos en necesidades reales y solucionar los problemas que se presenten.*

## ***Objetivo General***

*Determinar la resistencia primaria y secundaria del VIH-1 a los inhibidores de la integrasa.*

## ***Objetivos Específicos***

*1. Normalizar un método de RCP-secuenciación casero para la detección de resistencia a los inhibidores de la integrasa del VIH-1.*

*2. Identificar las mutaciones virales y los niveles de resistencia a este grupo de fármacos.*

*3. Identificar los subtipos y formas recombinantes de VIH-1 de las muestras estudiadas.*

## *1. Revisión Bibliográfica*

### *1.1 Historia y Origen del VIH*

*En Estados Unidos y Europa a finales de la década del 70, se reportaron casos de individuos previamente saludables que mostraban síntomas de disfunción inmunológica. Este nuevo síndrome se caracterizaba por linfadenopatías generalizadas e infecciones oportunistas como neumonía por Pneumocystis carinii, encefalitis por Toxoplasma gondii, retinitis por Citomegalovirus y meningitis criptocóccica, así como una variedad de neoplasias malignas como Linfoma no-Hodgkin y Sarcoma de Kaposi. Como hallazgo de laboratorio se observaba que todos estos individuos mostraban una marcada depleción de Linfocitos T CD4+ (grupo de diferenciación celular (del inglés, cluster of differentiation) en sangre periférica. En junio de 1981 el CDC describió cinco hombres con una severa inmunodeficiencia en un reporte publicado en Morbidity and Mortality Weekly Report (2).*

*Dos años más tarde, en 1983, científicos del Instituto Pasteur aislaron un agente del ganglio linfático de un individuo quien se presentó con linfadenopatías generalizadas de origen desconocido (3). En 1984 el grupo de Robert Gallo (4) reportó, a partir de un paciente con sida, el aislamiento de un retrovirus al que denominaron HTLV-III, obteniendo las primeras evidencias serológicas que relacionaban al LAV (virus asociado a linfoadenopatía) con la inmunodeficiencia que padecían los individuos de estos grupos de riesgo (22, 23). Este nuevo retrovirus asociado al sida presentaba características genéticas típicas del género Lentivirus y fue llamado VIH, posteriormente VIH-1 (5). En 1986 otro retrovirus relacionado con el VIH-1, pero con características inmunológicas distintivas y menor patogenicidad, fue aislado de individuos residentes en el Oeste de África y se denominó VIH-2 (6)*

### *1.2 Clasificación*

*El VIH pertenece a la familia Retroviridae, género Lentivirus, integrado por virus exógenos no oncogénicos, que causan infecciones persistentes y enfermedades con períodos de incubación relativamente extensos. Exhibe una marcada predilección por el sistema inmune, infectando macrófagos, células dendríticas y LT CD4+. Tiene la capacidad de producir la formación de sincitios y la muerte de células permisivas y, a diferencia de otros retrovirus, puede infectar células que no estén en proceso de división. Las infecciones causadas por los Lentivirus no son restringidas por el sistema*

*inmune y los daños resultantes van acumulándose en el organismo a lo largo de los años (24).*

*1.3 Estructura del virión*

*El VIH-1 es un virus envuelto, al microscopio electrónico se observa una partícula icosaédrica, con un diámetro entre 100 y 120 nm, similar en talla y morfología a otros Retrovirus. En su estructura se pueden definir tres capas: la interna o nucleoide, de forma cónica, formada por la proteína p24, que empaqueta al genoma viral y las enzimas virales; la otra capa está integrada por la proteína p17 que forma la cápside; y la capa más externa compuesta por la envoltura, en la que se encuentran insertadas las glicoproteínas virales (gp120 y gp41), así como otras proteínas celulares como la ß-2 microglobulina y las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase I y II (Figura 1) (24).*

*La envoltura viral deriva de la membrana plasmática de la célula hospedera al salir por gemación. El lazo V3 de la glicoproteína gp120 interviene en la unión al correceptor y es un determinante crítico en la selección del mismo (25, 26).*

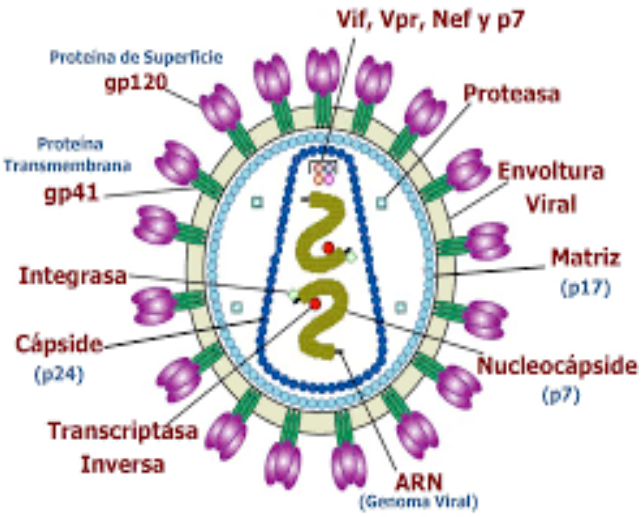



***Figura 1.*** *Estructura del VIH-1, que muestra las proteínas codificadas por los genes gag, pol y env.*
***Fuente:*** *Anticuerpos. Estructura y función (inmunojmvucv.files.wordpress.com).*

*1.4 Genoma*

*El genoma del VIH-1 está formado por dos hebras idénticas de ácido ribonucleico (ARN) de simple cadena, de polaridad positiva. Tiene una longitud de 9,8 kilobases (Kb), a partir de las que se sintetiza el ADN proviral. En los extremos 5´ y 3´ del genoma existen secuencias no codificadoras llamadas terminales largas repetidas (TLR). En el extremo 5´ de los TLR se localizan las secuencias promotoras para la*

*transcripción, mientras que en el 3´ se halla la señal necesaria para la poliadenilación. (24).*

*El genoma del VIH-1 posee tres regiones codificadoras, gag, pol y env, donde está contenida la información para las proteínas estructurales de la cápside y de la nucleocápside (gag), las enzimas virales encargadas de la replicación (pol) y las glicoproteínas estructurales de la envoltura (env) (24) (Figura 2).*

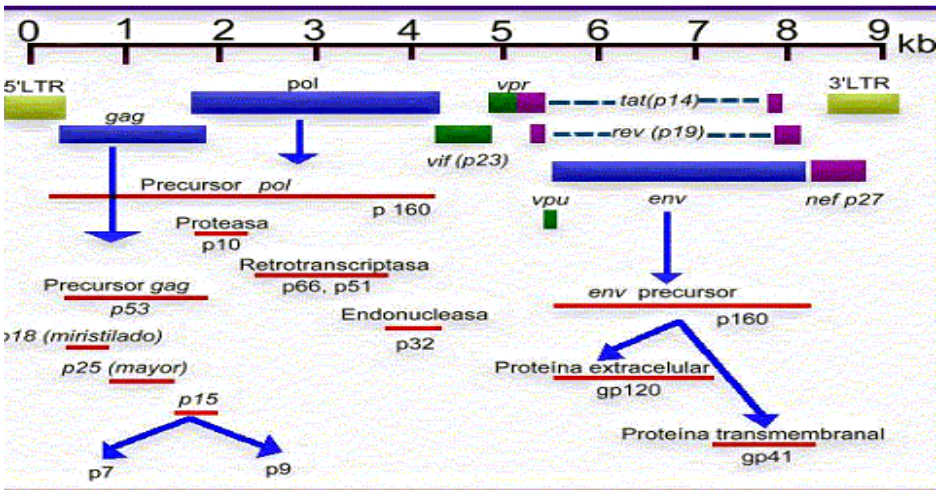



***Figura 2.*** *Organización del genoma del VIH-1.* ***Fuente****: (ejb.ucv.cl/…/Asparchivos/capitulo 011fig.htm).*

*El genoma del VIH-1 también codifica proteínas no estructurales, derivadas de las regiones codificadoras gag, pol y env contenidas en los genes vif, vpr, vpu, nef, tat y rev. Por su función, las proteínas derivadas de tat y rev son conocidas bajo el nombre de proteínas reguladoras y las de vif, vpr, vpu y nef como proteínas accesorias, aunque estas últimas también son esenciales para completar el ciclo de vida en el hospedero (24, 27). Los ácidos ribonucleicos mensajeros (ARNm) de gag y pol son transcriptos formando poliproteínas que son escindidas por la proteasa viral (codificadas por pol) para formar, entonces, proteínas funcionales individuales (Figura 2). El producto del gen env, gp160, es escindido por una proteasa celular en gp120 y gp41, las que son ensambladas en forma de trímeros en la envoltura viral (28).*

### *1.5 Ciclo de vida del VIH-1*

*La entrada del VIH-1 a los LT CD4+ se produce por una cascada de interacciones moleculares entre las glicoproteínas de la envoltura viral y dos receptores celulares específicos (29), la subunidad externa de la gp120 se une a la molécula CD4+ (receptor primario) y dicha unión induce cambios conformacionales en la gp120 que*

*expone los sitios específicos de unión (región V3) para los receptores de quimoquinas (30). Los co-receptores principales son CCR5 y CXCR4, a los que se une la gp120. Tras la unión con el co-receptor, ocurren una serie de cambios conformacionales en la glicoproteína de transmenbrana gp41, tras la cual se fusiona la envoltura viral con la membrana de la célula hospedera y con ello, la entrada de la cápside al citoplasma celular (24).*

*La unión de la membrana viral con la celular permite la liberación del genoma viral en el citoplasma celular formándose un complejo ribonúcleo/proteico para dar inicio a la transcripción inversa del genoma viral. Una vez concluido el transporte hacia este compartimento, sólo las moléculas de ADN lineal con TLR en cada extremo son integradas como provirus en sitios aleatorios del genoma celular, proceso mediado por la IN viral (24). Las moléculas de ADN circulares que alcanzan el núcleo pueden, en cambio, expresar proteínas. Una vez integrado al genoma celular, el virus puede permanecer latente, en cuyo caso evita su detección por el sistema inmune (24).*

*El provirus integrado se replica únicamente cuando el ADN celular se replica. En muchas células individuales el virus se encuentra en estado de latencia y en otras se expresa de forma continua, razón por la cual la infección por este virus se clasifica como crónicamente activa (31). No es hasta que ocurre la activación celular, por infecciones a repetición o exposición a antígenos alogénicos, que el virus se activa del estado quiescente. Otros factores esenciales en la activación del VIH-1 son la co-infección de las células hospederas con virus no relacionados con potencial para la activación de la expresión génica viral, la infección por más de una cepa del VIH-1 o por parásitos entéricos, el uso de drogas o diversos factores tóxicos y genéticos. El promotor del VIH-1 es altamente regulado por factores virales y celulares (24).*

*La transcripción del provirus por la ARN polimerasa II celular tiene como resultado un transcripto primario con dos funciones principales, por una parte, actuar como ARN genómico que se incorpora a la cápside nuevamente ensamblada y por otra, servir de precursor para la formación de los ARNm. Los ARNm largos son transportados al citoplasma y a partir de ellos se expresan de forma eficiente las proteínas víricas estructurales. La actividad cooperada de las proteínas reguladoras tat y rev permiten el control preciso de la replicación vírica (24).*

*1.6 <u>Historia natural de la enfermedad</u>*

*Hace algunos años se pensaba, que el período que existía entre la infección y la progresión a sida, conocido hasta ese momento como período de latencia clínica,*

*reflejaba un estado subyacente de latencia viral. Sin embargo, se ha corroborado la actividad progresiva del VIH-1 en el tejido linfoide, demostrando que la replicación viral persiste desde la infección a un ritmo asombroso (32, 33).*

*El síndrome viral agudo de la infección primaria por VIH-1 (que se define, por el período de tiempo transcurrido desde la infección inicial con VIH-1 hasta el desarrollo de la respuesta de anticuerpos) muestra síntomas que con frecuencia se parecen a los de la mononucleosis infecciosa producida por otros virus. Estos aparecen en los días o semanas posteriores a la exposición al VIH-1, no obstante, es probable que los signos clínicos y los síntomas no se presenten en todos los pacientes. Durante la infección aguda suele haber una viremia alta en plasma, que puede durar días y hasta semanas (32), con una disminución notoria de células T CD4+. El conteo de LT CD4+, posteriormente se eleva, normalmente hasta valores inferiores a los anteriores a la infección (Ver figura 3).*

*Después de la infección aguda, habitualmente se alcanza un equilibrio entre la replicación viral y la respuesta inmune del huésped, y es probable que muchas personas infectadas no presenten manifestaciones clínicas de la infección por VIH-1 durante años. Aún en ausencia de tratamiento ARV este período de latencia clínica puede durar de ocho a diez años o más (32). Sin embargo, este término puede llevar a conclusiones erróneas, por el elevado recambio del virus y la constante destrucción diaria de las células T CD4+. Al finalizar esta etapa pueden aparecer diversos síntomas o enfermedades que no se semejan con la definición de sida. Estos incluyen leves signos inmunológicos, dermatológicos, hematológicos y neurológicos. También pueden desarrollarse los síntomas generales tales como fiebre, pérdida de peso, sudoración nocturna y diarrea. Finalmente, ocurre la progresión de la enfermedad hacia el sida, que se caracteriza por un constante aumento de la viremia, la disminución del conteo de LT CD4+ y por último, una profunda inmunosupresión (34).*

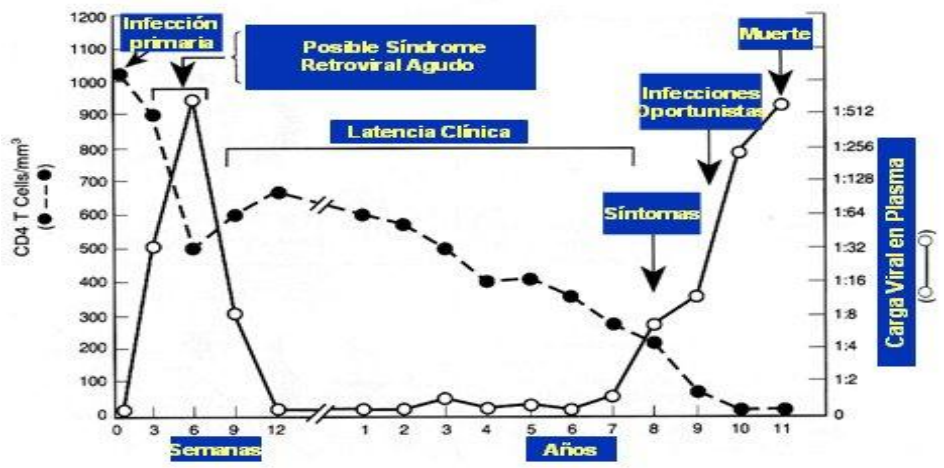



***Figura 3.*** *Historia natural de la infección por VIH-1.* ***Fuente:*** *epidem…medwave.cl.*

*1.7 Marcadores de la progresión de la enfermedad*

*El conteo de LT CD4+ es un marcador excelente del estado inmunológico del paciente y determina el riesgo inmediato de infecciones oportunistas y otras complicaciones relacionadas con la enfermedad (34). La carga viral (CV) es un marcador con valor pronóstico, no solo predice la progresión hacia la enfermedad, independiente del conteo de LT CD4+, sino también la trayectoria del conteo de LT CD4+. Por otro lado, la CV es el marcador más útil para evaluar la respuesta a la terapia y la posible emergencia de la resistencia (34).*

*1.8 Variabilidad genética del VIH-1*

*Las tasas de mutación de los virus ARN, incluidos los retrovirus, se ha estimado entre $10^{-3}$ a $10^{-5}$ sustituciones por nucleótido (s/nt) por ciclo de multiplicación (35, 36). La base bioquímica de esta alta tasa de mutación es la ausencia de la actividad correctora de errores (exonucleasa 3'- 5') en la TI, y la alta tasa de replicación viral (35).*

*La variación genética de los virus ARN no sólo puede ocurrir por mutaciones puntuales (transiciones y transversiones), sino también por inserciones y supresiones, por recombinación homóloga y no homóloga y por reordenamiento de segmentos en virus de genoma segmentado (37).*

*Las poblaciones de virus ARN se replican como distribuciones complejas de genomas diferentes pero genéticamente relacionados a los que se les denomina cuasi-especies (35). Otros autores las describen como distribuciones dinámicas de genomas víricos no idénticos pero genéticamente muy cercanos, sometidos a un continuo proceso de*

*variación, competición y selección (38). Las cuasi-especies constituyen un reservorio de variantes víricas, que presentan un amplio rango de fenotipos respecto a virulencia, tropismo, cinética de replicación y composición antigénica. El tamaño poblacional es de gran importancia en la heterogeneidad genética. En un individuo infectado por VIH-1 pueden existir de $10^9$ a $10^{12}$ viriones, con un recambio de virus y de células infectadas muy elevado (39).*

*Los análisis filogenéticos basados en las secuencias génicas del VIH-1, principalmente de los genes gag y env, han revelado cuatro grandes grupos (5): M (principal, del inglés main), O (externo, del inglés outlier), N (no M, no O, del inglés, non M, non O y P (8). A su vez, del grupo M se han identificado nueve subtipos que van del A al D, F, G, H, J y K. En los subtipos A y F se distinguen sub-subtipos designados como A1, A2, A3, A4 y F1, F2, respectivamente (40).*

*La recombinación constituye una fuente adicional de variación del VIH-1 y desempeña un papel esencial en su evolución y en la expansión geográfica de los subtipos. La generación de retrovirus recombinantes requiere que dos virus infecten una célula, simultáneamente, a través de un episodio único de transmisión, bien de forma secuencial, o en varios episodios. En el VIH-1, la recombinación se puede producir entre diferentes cepas del mismo subtipo (intra-subtipo), de distintos subtipos (inter-subtipo) o de diferentes grupos (inter-grupo) (41). La recombinación en los retrovirus requiere de la co-encapsidación en cada virión de los ARNs genómicos genéticamente distintos. La recombinación entre los genomas encapsidados en dos virus diferentes es posible solamente mediante la infección productiva de una única célula por ambos viriones, lo que permite la generación de partículas heterocigóticas. En un ciclo infectivo posterior, puede generarse un genoma recombinante mediante saltos alternativos de la TI entre ambos genomas co-encapsidados (42).*

*Las formas recombinantes (FRs) del VIH-1 están ampliamente distribuidas. Las CRFs, son definidas como FRs idénticas, detectadas en al menos tres individuos no relacionados desde el punto de vista epidemiológico, mientras que las URFs se encuentran en un único individuo o en individuos relacionados epidemiológicamente (43).*

*La recombinación in vitro puede ligar mutaciones en el VIH-1 y aumentar la resistencia a un determinado antirretroviral o generar virus multirresistentes (44). Este fenómeno puede darse también in vivo. La recombinación puede facilitar la adquisición de mutaciones que compensen la pérdida de la capacidad replicativa de estos virus,*

*producida por mutaciones previas que causan resistencia. La alta frecuencia de recombinantes encontrados en las zonas donde circulan múltiples formas genéticas nos advierte sobre el posible efecto negativo del uso incontrolado de las drogas ARVs. Esto podría potenciar la aparición y circulación generalizada de cepas multirresistentes generadas a partir de la recombinación (45).*

### *1.9 Epidemiología*

*A finales del 2017, aproximadamente 37 millones de personas vivían con VIH-1 en el mundo, de ellas dos millones eran nuevas infecciones y un millón de personas habían fallecido por enfermedades relacionadas con el sida. Cerca de 21,7 millones de personas tenían acceso a la terapia antirretroviral. Tres de cada cuatro personas que vivían con VIH-1 (75%) conocían su estado, entre las personas que conocían su estado serológico, cuatro de cada cinco (79%) tenían acceso al tratamiento y, entre las personas que tenían acceso al tratamiento, cuatro de cada cinco (81%) habían logrado la supresión viral. El 47% de los individuos que viven con VIH-1 tienen una CV indetectable (7).*

#### *1.9.1 Distribución mundial y regional de los subtipos del VIH-1*

*La distribución global de subtipos y FRs a nivel mundial se comportó de la siguiente manera: el subtipo C representó el 46,6% de todas las infecciones por VIH-1 en el período 2010-2015. El subtipo B fue responsable del 12,1% de las infecciones, seguido del subtipo A (10,3%), la CRF02_AG (7,7%), la CRF01_AE (5,3%), el subtipo G (4,6%) y el subtipo D (2,7%). Los subtipos F, H, J y K combinados representaron el 0,9 % de las infecciones. Otras CRF representaron el 3,7%, elevando la proporción de todas los CRF a 16,7%. Las URF constituyeron 6,1%, representando los recombinantes el 22,8% de todas las infecciones mundiales por VIH-1. La distribución de los subtipos y recombinantes del VIH-1 cambió con el tiempo en países, regiones y a nivel mundial. A nivel mundial durante 2005-2015, el subtipo B aumentó, los subtipos A y D se mantuvieron estables, y los subtipos C, G y CRF02_AG disminuyeron. La CRF01_AE, otros CRF y URF aumentaron, lo que condujo a un aumento constante en la proporción global de recombinantes a lo largo del tiempo (46).*

*En África Central se encuentra la mayor diversidad viral con la presencia de todos los subtipos, así como de CRFs y URFs. En África Occidental se detectan todos los subtipos, sin embargo, predominan la CRF02_AG y el subtipo G. La mayoría de la infecciones en África Oriental son debidas al subtipo A. En el sudeste de África, Etiopía y la India, la epidemia es exclusivamente causada por el subtipo C (47).*

*EL subtipo B predomina en América del Norte, el Caribe, América Latina, Europa Central, Europa Occidental y Australia. En Europa Central y Occidental son detectadas muchas CRFs y URFs. La epidemia en Europa Oriental y Asia Central es dominada por el subtipo A y B (47).*

*En el sur y sudeste de Asia la CRF01_AE es responsable de la mayoría de las infecciones. En el este de Asia la epidemia está dominada por la CRF07_BC, CRF08_BC, CRF01_ AE y el subtipo B. El norte y medio Oriente de África, está afectado mayoritariamente por el subtipo B y varias CRFs (47).*

*La diversidad mundial y regional del VIH-1 es compleja y evoluciona, y es un gran desafío para el desarrollo de la vacuna contra el VIH-1. La vigilancia de la epidemiología molecular global del VIH-1 sigue siendo crucial para el diseño, las pruebas y la implementación de las vacunas contra el VIH-1 (47).*

*1.9.2 Epidemiología en Cuba*

*Hasta el cierre del 2018 habían 31 264 personas con VIH-1, y 21 946 (86%) estaban recibiendo TARVAE. La transmisión sexual es el factor de riesgo más frecuente y a ella corresponden el 99% de los casos descritos. La transmisión vertical, parenteral y la exposición ocupacional, constituyen otras causas de infección, con mucha menor incidencia. El mayor número de casos son del sexo masculino con un 80,5%, y los HSH constituyen el 74,6%. La mayor incidencia de casos se reportan en individuos con edades entre los 15 y 49 años, según datos del Programa Nacional de Prevención y Control de las Infecciones de Transmisión Sexual VIH/sida del Ministerio de Salud Pública (MINSAP) (19).*

*Los diferentes estudios realizados de la epidemia cubana han identificado los subtipos A, B, C, D, F, G, H, J, CRF01_AE, CRF02_AG, CRFs_BG (20, 23 y 24) y las FRs complejas como la CRF18_cpx y la CRF19_cpx, así como recombinantes únicos, resultado de la circulación de los diferentes subtipos en el país (48-50). Algunos de estos subtipos fueron adquiridos en África en la década del 70 y del 80 (13, 51). Un estudio realizado por Machado y col en el 2019 refiere que las variantes genéticas predominantes en Cuba son el subtipo B (26,9%), CRF19_cpx (24,1%), CRF 20, 23, 24_BG (23,4%) y CRF18_cpx (12%) (14).*

*1.10 Terapia antirretroviral y resistencia viral*

*La TARVAE cambió la historia natural de la infección por VIH/sida, al retardar la evolución de la enfermedad y mejorar la calidad de vida de los individuos infectados.*

*La infección por VIH-1 ha dejado de ser una enfermedad mortal a corto plazo para convertirse en una enfermedad crónica que puede tratarse (52).*

*Hasta el momento se han descrito cinco clases de drogas antirretrovirales para el tratamiento de la infección por VIH-1: ITIANs (más un análogo de nucleótido), ITINANs, IPRs, inhibidores de la entrada e IINs (17).*

*El desarrollo de la TARVAE ha disminuido de forma significativa la morbi-mortalidad asociada a la infección por VIH-1, reduciendo la CV a niveles indetectables y restaurando el sistema inmune, evidenciado por el aumento del conteo de LT CD4+. La terapia combina tres agentes o más dirigidos al menos contra dos blancos/enzimas distintas que intervienen en la replicación viral. Desde los primeros días, las terapias han ido evolucionando, con la introducción de nuevos fármacos con mayor potencia y mayor barrera genética, para evitar el desarrollo de la resistencia viral (53).*

*Una buena adherencia al tratamiento puede suprimir la replicación viral por décadas; sin embargo la terapia no elimina la infección por VIH-1, que hoy en día es considerada una enfermedad crónica. Algunos de los problemas relacionados con la terapia pueden deberse a la mala adherencia, pobre tolerabilidad de la droga e interacciones entre los agentes ARVs y otros medicamentos que pueden disminuir los niveles óptimos de la droga en sangre (54).*

*El desarrollo de combinaciones altamente potentes para prevenir la resistencia a drogas es esencial para el impulso de terapias antirretrovirales exitosas, sin embargo la adquisición y transmisión de cepas resistentes constituye un obstáculo para el éxito terapéutico. Los pacientes que adquieren o son inicialmente infectados con virus resistentes tienen menos opciones terapéuticas y presentan un riesgo incrementado de morbi-mortalidad particularmente en países en vías de desarrollo, donde las opciones terapéuticas son limitadas (54).*

*Existen también un grupo de potenciadores farmacocinéticos, los cuales se utilizan en el tratamiento del VIH-1 para incrementar la eficacia de un medicamento contra el VIH-1 incluido en un régimen contra ese virus. Actualmente existen dos potenciadores el cobicistat (COBI) y el ritonavir (RTV), que aunque es un IPR, es usado para potenciar los niveles de los otros IPRs (17) .*

### *1.10.1 Resistencia viral a drogas por clases de antirretrovirales*

*La variabilidad genética del VIH-1 resulta de la alta tasa de errores de procesamiento de la TI del VIH-1, la recombinación cuando más de una variante viral infecta la misma*

*célula y la acumulación de variantes provirales durante el curso de la infección (55, 56). Aunque la mayoría de las infecciones por VIH-1 son iniciadas por una única variante viral (57), innumerables variantes (o cuasi-especies) relacionadas con el virus de transmisión inicial emergen dentro de las semanas posteriores a la infección (57).*

*La selección de variantes resistentes a los medicamentos depende del grado en que la replicación viral continúe durante la terapia supresora incompleta, la facilidad de adquisición de una mutación de resistencia a droga (MRD) particular y el efecto de estas MRD en la susceptibilidad a los medicamentos y la replicación del virus. Aunque los virus resistentes a los medicamentos que se presentan de forma natural surgen todos los días en pacientes no tratados (58), estas variantes rara vez alcanzan niveles detectables porque son menos aptos que los virus susceptibles a los medicamentos en ausencia de la presión selectiva de la droga. De hecho, casi todas las MRD clínicamente significativas surgen solo como resultado de la presión selectiva del fármaco y, por lo demás, no son polimórficas (58).*

*Esencialmente no hay resistencia cruzada entre las clases de drogas. Los virus que son altamente resistentes a las drogas de una clase de ARV son completamente susceptibles a los ARV de las clases no utilizadas (59). En contraste, la resistencia cruzada significativa dentro de una clase de droga es común porque la mayoría de las MRD reducen la susceptibilidad a múltiples ARV de la misma clase (54, 60-62). Sin embargo, hay excepciones importantes en el sentido de que varias MRD aumentan la susceptibilidad a otros ARVs de la misma clase (63). Por lo tanto, el conocimiento de los perfiles de resistencia cruzada de los ARVs es esencial cuando se usa más de un medicamento de la misma clase, ya sea en combinación o en secuencia (63).*

*La mayoría de los regímenes ART utilizados en los países desarrollados y las que pretenden implementarse en los países en vías de desarrollo, para la terapia de primera línea son lo suficientemente potentes como para bloquear completamente la replicación del VIH-1 y tienen una barrera genética lo suficientemente alta como para mantener la supresión virológica a largo plazo. Como resultado, la mayoría de los casos de fallo virológico y la resistencia viral a los medicamentos surgen de una adherencia incompleta, que expone el virus de un paciente a niveles de ARVs que causan una supresión incompleta y por ello son capaces de ejercer una presión selectiva al medicamento. Las tasas más bajas de resistencia a los ARVs también se ha asociado con programas de monitoreo de CV de rutina en los que la detección temprana del rebote virológico brinda la oportunidad de asesoramiento sobre*

*adherencia o modificación del régimen, según sea necesario, antes de la evolución de múltiples MRD (64, 65).*

*1.10.2 Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos/nucleótidos*

*Son administrados como pro-medicamentos, es decir, moléculas que requieren ser fosforiladas por quinasas celulares para convertirse en nucleótidos trifosfato, la forma activa del fármaco; son análogos de los nucleósidos modificados en el carbono 5' de la desoxirribosa. Se incorporan a la cadena de ADN en formación y previenen la formación del enlace con el próximo nucleótido, resultando en la terminación de la elongación del ADN proviral. Se han identificado dos mecanismos de resistencia: por mutaciones que permiten que la TI discrimine entre un ITIAN y un dNTP producido naturalmente por la célula, previniendo así que los ITIAN sean incorporados en la cadena creciente de ADN viral; y por mutaciones que median la escisión dependiente de ATP del ITIAN que ya se encuentra incorporado a la cadena creciente de ADN, permitiendo que la enzima reinicie la síntesis del ADN proviral. Estas mutaciones se conocen como mutaciones de análogos de timidina (TAM, por su nombre en inglés) pues son seleccionadas por análogos de timidina como AZT y D4T (66).*

*Dos mutaciones poco frecuentes, están asociadas con altos niveles de resistencia cruzada a los ITIANs: la inserción de dos aminoácidos en el codón 69 (T69ins) y el complejo Q151M (54). Actualmente los medicamentos que se usan en la TARVAE que pertenecen a esta familia son: abacavir (ABC), emtricitabina (FTC), lamivudina (3TC), tenofovir (TDF) y AZT (17).*

*1.10.3 Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos*

*Se unen a la TI induciendo un cambio conformacional en algunos residuos importantes y hacen más rígida la estructura de dicha enzima, bloqueando la síntesis del ADN. A diferencia de los primeros, estos no requieren del metabolismo celular para ejercer su actividad. Regularmente, las mutaciones que se asocian con resistencia a estos medicamentos afectan de manera específica la unión entre el inhibidor y la TI (66). Comúnmente se emplean cinco ITINANs: nevirapina (NVP), efavirenz (EFV), etravirina (ETR), rilpivirina (RPV) y un compuesto de reciente inclusión en esta familia, que fue aprobado en agosto del 2018, la doravirina (DRV) (17).*

*1.10.4 Inhibidores de proteasa*

*La inhibición de la actividad de la PR evita que se dé el procesamiento de las poli-proteínas Gag y Gag-Pol, necesario para convertir las nuevas partículas virales nacientes inmaduras no infecciosas, en partículas virales maduras e infecciosas. Se dividen en dos grupos: mutaciones primarias o mayores y mutaciones compensatorias o menores. Las primarias son aquellas que afectan directamente el sitio de unión del IPR a la enzima; aquí se encuentran, tanto las que se dan en el sitio activo de la PR, como las localizadas en regiones cercanas al sitio de corte, las poliproteínas Gag y Gag-Pol. Las mutaciones menores o compensatorias generalmente son seleccionadas después del tratamiento con los IPRs y se presentan en codones que codifican aminoácidos fuera del sitio activo de la enzima, permitiendo que el virus recupere la eficacia biológica que pudo haber sido comprometida por las mutaciones mayores, contribuyendo indirectamente con la resistencia a los IPR (66). Actualmente hay seis IPRs aprobados por la FDA estadounidense para el tratamiento del VIH-1, entre ellos están el atazanavir (ATV), DRV, fosamprenavir (FPV), el saquinavir (SQV), el tipranavir (TPV) y el RTV, que aunque es un IPR, por lo general es usado para potenciar los niveles de los otros IPRs (17).*

*1.10.5 Inhibidores de entrada*

*La entrada del VIH-1 a la célula no solo está mediada por la unión de la glicoproteína viral gp120 con el receptor celular CD4, es necesario que se genere una segunda interacción con un correceptor celular bien sea CCR5 o CXCR4. La elección del correceptor usado por el virus, es decir, el tropismo viral, está estrechamente relacionado con la adquisición y patogénesis de la enfermedad. En general, la mayoría de los virus transmitidos utilizan el correceptor CCR5 para entrar a las células, mientras que la aparición de virus con tropismo CXCR4 se ha asociado a una mayor velocidad de progresión a sida (66).*

*Los inhibidores de entrada pueden subdividirse en tres clases: inhibidores de fusión, bloqueadores del correceptor CCR5 y los inhibidores de pos-fijación. Los inhibidores de fusión se unen al dominio HR1 y HR2 de la glicoproteína viral gp41, generando un impedimento estérico, que impide la fusión de la envoltura viral con la membrana celular. La resistencia a estos fármacos se genera por mutaciones en HR1 y HR2 (66).*

*Los bloqueadores del correceptor interactúan con la molécula CCR5, generando un cambio conformacional que evita la unión con la gp120 viral. La resistencia a los bloqueadores de CCR5 se da a través del uso de un correceptor alterno CXCR4 debido al desarrollo de mutaciones en gp120 o por mutaciones en gp 41 que permiten eludir el bloqueo de la interacción entre estas glicoproteínas virales y el CCR5 celular (66).*

*Los inhibidores de posfijación bloquean los receptores CD4 en la superficie de ciertos inmunocitos (linfocito o células mononucleares) que el VIH-1 necesita para entrar a las células. El único medicamento de esta clase fue aprobado por la FDA en marzo del 2018, ibalizumab-uiyk (TNX-335) (17).*

*1.10.6 La integrasa viral*

*La IN es una proteína de 32 kDa que, al igual que las proteínas TI y PR, es codificada por el gen pol del VIH-1; está compuesta por 288 aminoácidos, posee tres dominios estructurales que son: amino- terminal, core catalítico y carboxi-terminal (Ver figura 4).*

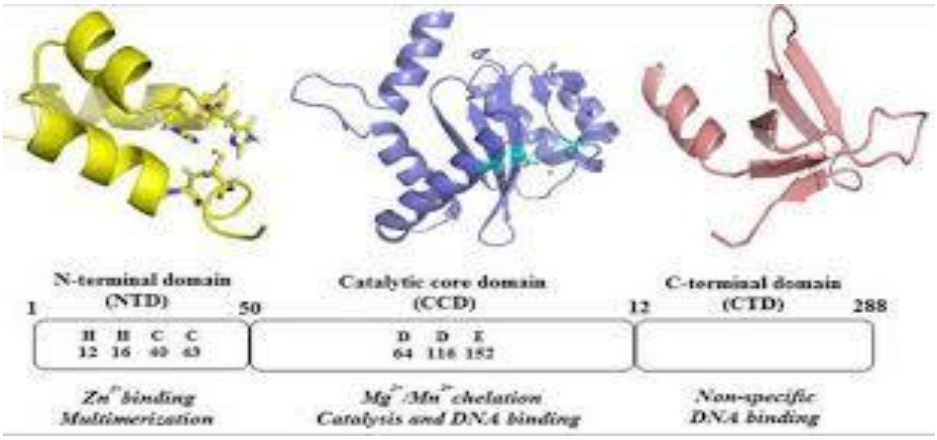



***Figura 4.*** *La proteína integrasa con sus tres dominios: Dominio N-terminal, Dominio Core catalítico y el dominio Carboxilo terminal.* ***Fuente:*** *infosida.nih.gov*

*La IN media la inserción o integración irreversible del ADN del VIH-1 en el ADN genómico del huésped. La integración se requiere para mantener al genoma del VIH-1 en la célula infectada y para que haya una expresión eficiente de todas las proteínas virales permitiendo la generación de nuevos virus. La IN participa en las tres etapas que se requieren para la integración (Ver figura 5). Inicialmente, ella ensambla en secuencias específicas dentro de la región TLR de cada uno de los extremos del ADN del VIH-1 que ha sido retotranscripto en su totalidad. En el contexto de este complejo (denominado complejo pre-integración o PIC), la IN cataliza entonces las subsiguientes reacciones enzimáticas: procesamiento final de 3', que elimina el*

*dinucleótido terminal 3' de cada uno de los extremos del ADN viral y la transferencia de cadenas que se produce por el acoplamiento covalente del ADN viral con el ADN del huésped. Hasta la fecha, todos los IIN en desarrollo clínico tienen como blanco específico la reacción de la transferencia de cadenas y, por ende, se les llama, alternativamente, IIN. En el contexto del proceso de infección viral, la inhibición de la integración trae aparejado un bloqueo irreversible a la replicación del VIH-1, ya que el ADN viral no integrado se ve sujeto al metabolismo de una diversidad de enzimas celulares (18).*

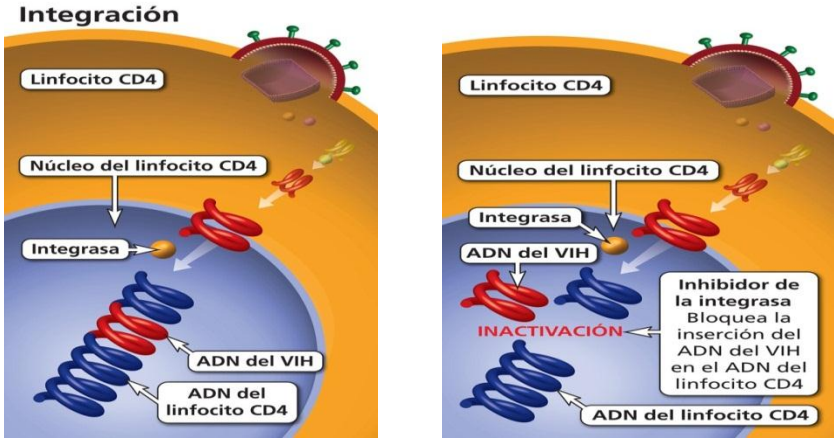



***Figura 5.*** *Etapas que se requieren para que ocurra la integración del VIH-1.* ***Fuente:*** *infosida.nih.gov*

### *1.10.7 Inhibidores de la integrasa viral*

*La IIN, son una nueva clase de medicamentos que bloquean la IN del VIH-1. Son moléculas estructuralmente diversas que contienen un motivo de unión a un catión metálico divalente como Mg2+ o Mn2+ y una región hidrofóbica para entrar en la cavidad formada por la IN y el extremo 3' del ADN viral que contiene el dinucleótido terminal CA (66).*

*En el año 2007 se aprobó el primer IIN bajo el nombre de RAL. Actualmente esta familia de medicamentos se divide en dos generaciones; de primera generación: RAL y EVG (2014) y de segunda generación DTG (2016), BIC (2018), y el Cabotegravir (CAB) (aún no ha sido aprobado por la FDA, porque está en fase III de ensayo clínico) (17). Los de segunda generación pese a compartir el mismo mecanismo de acción, presentan diferencias en su estructura que repercuten en la velocidad de disociación de la IN, lo que determina una mejor barrera genética (17).*

*Los IIN tienen un efecto mínimo sobre la integración del complejo ADN de la IN o sobre la reacción en el proceso final de 3'. Su efecto selectivo sobre la reacción de*

*transferencia de cadenas es el resultado directo de un mecanismo de acción ahora bien definido en el que el inhibidor: 1) se acopla solamente al complejo específico entre la IN y el ADN viral y no a la IN en ausencia del ADN; y 2) interactúa con los dos cofactores esenciales del ión magnesio en el sitio activo de la IN, post-ensamblaje. Por lo tanto, todos los IIN tienen dos componentes esenciales en su estructura química, un farmacóforo que secuestra al magnesio del sitio activo y un grupo hidrofóbico que interactúa con el ADN viral y con la enzima del complejo ( Ver Figura 5). La porción de unión al metal de estos compuestos es absolutamente esencial para la inhibición, mientras que el componente hidrofóbico de esta estructura química es el principal responsable de aumentar la afinidad y la especificidad del inhibidor en el complejo del ADN – IN (67).*

*1.10.7.1 <u>Resistencia a los INT por medicamentos</u>*

*La resistencia a los IIN es causada por mutaciones primarias y secundarias a través de tres mecanismos diferentes: el primero es mediado por mutaciones que generan cambios conformacionales dentro del bolsillo catalítico de la enzima, lo cual lleva a que los IIN se una a sitios adyacentes al sitio activo de la IN, disminuyendo su función significativamente por una inhibición alostérica parcial (66).*

*El segundo mecanismo es mediado por mutaciones generadas en respuesta al tratamiento con RAL, donde se da un cambio en dos aminoácidos ubicados cerca del sitio catalítico de la enzima que forman un puente de hidrógeno con un residuo ubicado dentro de éste, inhibiendo la unión del cofactor metálico necesario para la acción de la IN, lo que disminuye la eficacia biológica del virus. Finalmente, el tercer mecanismo es dirigido por mutaciones que disminuyen la unión entre el RAL y la IN, interfiriendo directamente con la actividad del IIN (66).*

*Actualmente, ya se ha documentado el desarrollo de resistencia a los IIN, estructuralmente diversos, tanto in vitro como in vivo. In vitro, se ha demostrado que la selección de resistencia requiere múltiples pases de los virus en cultivo celular, posiblemente como resultado tanto de la acumulación secuencial de mutaciones como de la reducida adaptabilidad de estos mutantes. Mientras que los diversos IIN pueden seleccionar distintas mutaciones, casi todos los residuos aminoacídicos relacionados con la resistencia a los IIN se localizan dentro del sitio activo de la IN cercano a los*

*residuos aminoacídicos que participan en la coordinación de los cofactores metálicos, lo que es consistente con un mecanismo común de secuestro de metales (18).*
*En los ensayos clínicos, se han observado tres vías mutacionales primarias que confieren un alto nivel de resistencia al RAL: 1) N155H en combinación con L74M, E92Q o G163R, 2) Q148H/R/K con E138K o G140S/A y 3) Y143R/C más otras mutaciones. Para el RAL, estos patrones generales se han confirmado en una diversidad de estudios de cohortes. En cuanto al EVG, en pacientes que experimentaron fallas en el tratamiento se seleccionaron también virus con mutaciones en E92Q, E138K, Q148H/R/K y N155H, así como otras mutaciones. In vitro, se ha demostrado que otros IIN seleccionan distintas mutaciones, incluyendo la S153Y (18).*

*Se ha demostrado que la resistencia al DTG en pacientes que no han sido expuestos previamente a IIN, se deriva principalmente de la aparición de la mutación R263K, la cual confiere muy baja resistencia al DTG, disminuye la capacidad replicativa del virus, ya que reduce la actividad enzimática de la IN y con esto la capacidad de integrar su ADN en la célula hospedera. A diferencia del RAL y ELV, se requieren múltiples MRD para la resistencia clínicamente significativa al DTG (Q148+E138+G140) (18).*

*1.11 <u>Resistencia transmitida</u>*

*La resistencia transmitida (RT) ocurre cuando la infección primaria por VIH-1 es causada por un virus con MRD. La prevalencia de RT es de aproximadamente del 12% al 24% en los EE. UU. y del 10% en Europa. Si bien los datos de los estudios de los países de bajos y medianos ingresos son limitados, sugieren que la prevalencia es inferior al 5% en la mayoría de ellos, en África subsahariana y Asia meridional/ sudoriental. Se han informado tasas de RT del 5 al 10% en América Latina, Europa del Este y países asiáticos de altos ingresos. Se siguen informando tendencias temporales ascendentes de RT en muchas regiones, en gran parte atribuibles a aumentos de la RT a los ITINAN (68, 69).*

*Si bien las mutaciones de resistencia usualmente reducen la capacidad replicativa viral, la mayoría de los virus transmitidos con resistencia revierten a la cepa salvaje gradualmente en el intervalo de algunos años. Esta lenta reversión ocurre, porque la mayoría de las nuevas infecciones son monoclonales y durante la expansión y diversificación de este clon, al inicio de la infección, ellas adquieren múltiples mutaciones de escape a los LT CD4+ citotóxicos, las que pueden proporcionar a los*

*virus resistentes una ventaja selectiva temporal contra los virus revertantes. Sin embargo, algunas mutaciones como la M184V/I y la T215Y parecen revertir al tipo salvaje más que otras. Las mutaciones de resistencia a los no análogos, como la K103N, parece que tienen una persistencia mayor (70).*

*Por ende, en regiones donde las pruebas para determinar la resistencia genotípica del VIH-1 inicialmente no estuvieron disponibles, es particularmente importante mantener una vigilancia de la resistencia primaria. Esto estaría encaminado a identificar poblaciones con alto riesgo de resistencia transmitida, así como realizar recomendaciones en los esquemas terapéuticos, ya sea para su modificación, o para considerar llevar a cabo estudios de resistencia de línea de base (71).*

*1.12 Ensayos para la determinación de la resistencia del VIH-1 a los antirretrovirales*

*Existen dos grandes grupos de técnicas para la detección de resistencia del VIH-1 al tratamiento antirretroviral: las fenotípicas y las genotípicas.*

*Los ensayos fenotípicos de susceptibilidad in vitro miden la susceptibilidad a los ARVs en cultivos celulares. La susceptibilidad generalmente se informa como la concentración de ARV que inhibe la replicación del VIH-1 en un 50% (IC50). La IC50 del virus de un paciente se compara con la de una cepa de referencia susceptible al fármaco, y se expresa como una relación, denominada cambio de pliegue, de la IC50 del virus del paciente en relación con el control de referencia. Casi todos los ensayos de susceptibilidad utilizan virus recombinantes creados mediante la inserción de segmentos de genes de virus de pacientes, amplificados por la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) (72). Debido al costo y al largo tiempo de respuesta, las pruebas de resistencia fenotípica generalmente se reservan para el desarrollo de medicamentos, la investigación de resistencia a los medicamentos o los casos clínicos complejos (72).*

*La importancia clínica de las reducciones en la susceptibilidad in vitro reportadas en las pruebas fenotípicas varía notablemente entre los ARVs, debido a factores farmacocinéticos y farmacodinámicos (73). Existen diferencias similares pero menos pronunciadas en los rangos de susceptibilidad dinámica dentro de las clases ITIAN, ITINAN, IPR (75).*

*La prueba estándar de resistencia genotípica del VIH-1 a los medicamentos ARVs implica el uso de la técnica de secuenciación utilizando el método de Sanger o del*

*dideoxi – terminador de los genes que codifican para la PR, TI y IN para identificar MRD clínicamente significativas. La prueba de resistencia genotípica se realiza en productos de RCP directamente amplificados a partir de ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) que se ha transcrito de forma inversa a partir de ARN de VIH-1 en el plasma. Debido a que la población de virus en un individuo es típicamente heterogénea, es común que más de un nucleótido (es decir, una mezcla) esté presente en una posición dada en los electroferogramas de secuencia de Sanger. La estandarización entre laboratorios para estudios de resistencia a medicamentos se ha facilitado mediante el uso de herramientas de software que aplican un enfoque consistente para identificar bases mixtas y para evaluar la calidad de la secuencia (74). De hecho, la información presente en un electroferograma proporciona datos intrínsecos de control de calidad que incluyen el nivel de "ruido" de fondo como lo indican las intensidades de señal bajas y numerosos picos mal definidos. Además, una gran cantidad de mezclas electroforéticas, mutaciones atípicas y mutaciones APOBEC observadas en una secuencia de nucleótidos pueden indicar problemas de control de calidad (74). Además, el análisis filogenético y las mediciones de distancia de las secuencias se pueden utilizar para detectar la posible contaminación de laboratorio o el etiquetado incorrecto de la muestra en el punto de recolección (75).*

*Aunque generalmente se acuerda que el límite inferior de detección de la prueba genotípica es de alrededor del 20%, tanto los ensayos de mutación puntual como las tecnologías de secuenciación profunda de próxima generación a menudo detectan variantes resistentes a los medicamentos a niveles muy por debajo del umbral del 20%. Sin embargo, la frecuencia con la que estos ensayos ultrasensibles detectan de manera confiable las variantes presentes en niveles de 20% varía ampliamente entre los estudios. Algunas de las MRD de baja abundancia detectadas por ensayos altamente sensibles pueden surgir de RCP o errores de secuenciación (76, 77). Las MRD con baja frecuencia se han asociado con una respuesta reducida a los regímenes de ART basados en ITINAN, y el efecto es mayor cuando las variantes con MRD están presentes en frecuencias ≥1%. A pesar de las posibles implicaciones clínicas de las MRD con baja frecuencia en pacientes que inician ciertos regímenes, todavía no se han desarrollado pautas para el uso de estas tecnologías más sensibles (68).*

## 2. Materiales y Métodos

*2.1 Definición del Universo de Estudio*

*2.1.1 Diseño del estudio*

*Se realizó un estudio analítico de cohorte a una muestra de pacientes infectados con VIH-1 de todo el país, con fallo terapéutico a los ITIAN, ITINAN, IPR, que recibieron DTG como terapia de rescate, en el período comprendido entre enero del 2017 a enero 2019.*

*2.1.2 Universo de estudio*

*El Universo de estudio estuvo conformado por pacientes infectados con VIH-1 del país con fallo terapéutico a los ITIAN, ITINAN e IPR, que recibieron DTG como terapia de rescate, en el período entre enero 2017 - enero 2019.*

*Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de cada paciente al momento de la toma de la muestra y se procedió al llenado de una encuesta realizada para colectar algunos datos epidemiológicos, demográficos y clínicos de los pacientes seleccionados (Ver Anexo I y II).*

*2.2. Criterios de Inclusión y Exclusión*

*Se estudiaron un grupo de pacientes que tuvieran un patrón de resistencia múltiple a las drogas empleadas en la terapia de primera y segunda línea cubana, que recibieron DTG, como terapia de rescate y que consintieron en participar en el estudio. Se excluyeron aquellos pacientes que no cumplieran con los criterios antes mencionados*

*Se elaboró una base de datos considerando las características demográficas y epidemiológicas, así como los datos obtenidos en el cuestionario.*

***Tabla 1.*** *Variables demográficas, epidemiológicas y clínicas de los pacientes incluidos en el estudio.*

| ***Variables*** | ***Tipo*** | ***Escala*** | ***Descripción*** |
|---|---|---|---|
| *Fecha de diagnóstico con VIH-1* | *Cualitativa nominal* | *Mes y año* | *Mes y año de la fecha en que fue confirmado el diagnóstico con VIH* |
| *Fecha de inicio del tratamiento ARV* | *Cualitativa nominal* | *Mes y año* | *Mes y año de la fecha en que iniciaron tratamiento ARV* |
| *Tiempo que llevan recibiendo terapia ARV* | *Cuantitativa Continua* | *Años* | *Años que llevan recibiendo terapia ARV* |
| *Fecha de inicio del tratamiento con DTG* | *Cualitativa nominal* | *Mes y año* | *Mes y año de la fecha en que iniciaron tratamiento con DTG.* |
| *Tiempo recibiendo terapia ARV con DTG* | *Cuantitativa Continua* | *Años* | *Años que llevan recibiendo terapia ARV con DTG.* |
| *Mutaciones que confieren resistencia a los IPR y ITI* | *Cualitativa nominal dicotómica* | *Si tiene*<br>*No tiene* | *Presencia de mutaciones asociadas a resistencia.* |
| *Mutaciones que confieren resistencia los IIN* | *Cualitativa nominal dicotómica* | *Si tiene*<br>*No tiene* | *Presencia de mutaciones asociadas a resistencia a los INT* |
| *Niveles de resistencia a los IIN* | *Cualitativa nominal* | *Alta, Media*<br>*Baja* | *Niveles de resistencia viral a los INT* |
| *Subtipo de VIH en PR, TI e IN* | *Cualitativa nominal* | *A, B, C, D, F, G, H, J, K ó CRF, ó URF* | *Subtipo del VIH-1 que infecta al paciente.* |
| *CV del VIH-1 al momento de la toma de la muestra, a los tres y a los seis meses de iniciado el tratamiento con DTG* | *Cuantitativa discontinua* | *≥ 1 000 UI/mL*<br>*Riesgo*<br>*<1 000 UI/mL*<br>*No riesgo* | *Valor de la CV al momento de la toma de la muestra, a los tres y a los seis meses de iniciado el tratamiento.* |
| *CD4 del VIH-1 al momento de la toma de la muestra* | *Cuantitativa discontinua* | *≤ 350cel/mm³*<br>*Riesgo*<br>*>350cel/mm³*<br>*No riesgo* | *Valor de linfocitos T CD4 al momento de la toma de la muestra.* |

***Variables de laboratorio:*** *valor de linfocitos T CD4+, CV del VIH-1 al momento de la toma de muestra, Subtipo Viral, mutaciones de resistencia a las drogas ARVs y niveles de resistencia.*

***Abreviaturas: UI-*** *Unidades internacionales, DTG: dolutegravir, IPR: inhibidor de proteasa, IIN: inhibidor de la integrasa, ITI: inhibidor de la transcriptasa inversa.*

*2.3 Definición de términos*

***Resistencia primaria o transmitida:*** *Es aquella que se presenta en pacientes que no han recibido aún tratamiento ARV. Se produce debido a la adquisición de un virus que posee mutaciones asociadas a resistencia, por lo cual en la actualidad se habla más bien de resistencia transmitida (78).*

***Resistencia secundaria:*** *Aparece en los pacientes que han sido sometidos a tratamiento antirretroviral, y se produce bajo la presión selectiva de las drogas ARVs (79).*

*2.4 Obtención del consentimiento informado*

*El contenido del consentimiento fue verbalmente explicado a los individuos que se incluyeron en el estudio, por personal calificado con un lenguaje claro y sencillo para facilitar su comprensión, haciendo hincapié en la voluntariedad. Tras conocer la aprobación se solicitó el consentimiento por escrito (Anexo I). Se incluyó el nombre y la firma de la persona que da su consentimiento, así como la fecha en que se emitió el documento. Se entregó una copia del consentimiento informado a cada participante para futuras referencias.*

*2.5 Introducción de un sistema casero para la determinación del genotipo del VIH-1 en el gen de la IN y la evaluación de la detección de las mutaciones que confieren resistencia a los IIN en pacientes cubanos infectados con VIH-1.*

*En el presente estudio se llevó a cabo un procedimiento para normalizar un método de RCP- secuenciación casero para la detección de resistencia a los IIN del VIH-1. Para la normalización se determinó el límite inferior de amplificación y se evaluó la exactitud del ensayo. Para la evaluación de la exactitud se determinó la repetitividad y reproducibilidad de la técnica. Para determinar el límite inferior de amplificación se seleccionaron 20 muestras clínicas de pacientes infectados con diferentes subtipos de VIH-1, en especial aquellos con mayor representatividad en la epidemia cubana (B, G, CRF18_cpx, CRF19_cpx y recombinantes BG). Se escogieron 5 muestras de cada subtipo con elevados valores de CV. A cada muestra se le realizó diluciones en base 10, con plasma de pacientes seronegativos a infección por VIH-1, hasta llegar a las 1*

*000 cop/mL; a partir de aquí se hicieron diluciones en base 2 hasta las 250 cop/mL. A cada dilución seriada se le realizó extracción de ARN, RT y Nested RCP.*

*El límite inferior de amplificación se definió como la menor CV a la cual las muestras podían ser amplificadas. El procedimiento fue considerado exitoso si el producto amplificado podía ser visualizado en el equipo QIAxcel Advanced System (Casa Comercial QIAGEN), utilizando como cartucho el QIAxcel DNA Screening Kit (2 400).*

*Para evaluar la precisión del ensayo, se determinó la repetitividad y la reproducibilidad. Para la repetitividad se emplearon 10 muestras clínicas de pacientes infectados con los subtipos de VIH-1 más representativos de la epidemia cubana (B, C, BG, CRF18_cpx y CRF19_cpx). Se escogieron dos muestras por cada subtipo. La selección de estas se basó en los resultados previamente obtenidas de la RCP - secuencia casero empleado para la amplificación de la PR y TI viral (99 aa de PR y 335 de TI) en el laboratorio de Infecciones de Transmisión sexual (ITS), del IPK.*

*La variabilidad intraensayo (repetitividad) fue evaluada generando tres réplicas por cada muestra en una misma corrida, por el mismo operador. Se realizó este ensayo por dos ocasiones (seis réplicas por muestra, al final). La variabilidad interensayo (reproducibilidad) también fue estimada realizando tres réplicas por muestra en corridas separadas y por diferentes técnicos (nueve réplicas por muestra, al final). Ambos ensayos se realizaron bajo condiciones similares y, a cada uno, se le realizó extracción, RT y Nested RCP y secuencia.*

*El grado de identidad de la secuencia nucleotídica y aminoacídica fue definida como el porcentaje de identidad nucleotídica resultante de la comparación en pares de las secuencias nucleotídicas. Las bases mezcladas fueron consideradas discordantes respecto a las no mezcladas. El grado de identidad aminoacídica también se determinó en las posiciones asociadas a MRD y en las posiciones asociadas a vigilancia de mutaciones de resistencia (VMRD). El grado de identidad nucleotídica y aminoacídica fue determinada utilizando la herramienta de alineamiento en pares EMBOSS (https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_matcher/).*

*El criterio de validez del ensayo de repetitividad y reproducibilidad se definió como una identidad nucleotídica mayor que 98% en más del 90% de las comparaciones.*

*Las posiciones de MRD se definieron como las posiciones en las cuales los cambios aminoacídicos son incluidos en los algoritmos de interpretación de resistencia de Rega*

*v9.1.0 y HIVDB v8.8 (89 posiciones de MRD). Las posiciones de VMRD fueron definidas de acuerdo a las publicadas por la base de Stanford (12 posiciones asociadas a VMRD) (80).*

*La interpretación de la resistencia a las drogas se llevó a cabo utilizando el sitio web de Stanford y los algoritmos de interpretación de resistencia de Rega v9.1.0 y HIVDB v8.8 (https://hivdb.stanford.edu/hivdb/by-mutations).*

*Para la evaluación de la aplicabilidad de este ensayo en la práctica clínica se estudiaron un grupo de pacientes con fallo terapéutico, que recibirían o estaban recibiendo IIN en el período enero 2017- enero 2019. Los pacientes incluidos en el estudio fueron monitoreados mediante la determinación de la CV plasmática a los tres y seis meses para confirmar la efectividad de la terapia.*

*2.6 Espécimen para el estudio*

*2.6.1 Extracción del ARN viral*

*Se centrifugó 1 mL de plasma de cada paciente a 14 000 rpm durante 1 hora a 4$^{o}$C. El sobrenadante fue descartado, dejando solo 140 µL, que se emplearon para disolver el sedimento mediante vórtex por 15 segundos. A partir de los 140 µL, se realizó la extracción manual del ARN viral, siguiendo el protocolo descrito por el fabricante, utilizando el estuche comercial QIAamp Viral RNA Mini Kit. El ARN extraído fue conservado a -80$^{o}$C hasta su posterior utilización.*

*2.6.2 Síntesis del ADNc y amplificación*

*Se siguió el protocolo descrito por Kristel Van Laethema en el 2008 para la síntesis de ADNc, RCP anidada y la secuenciación. Se emplearon los cebadores descritos en esta misma publicación (81).*

*Se sintetizó y amplificó un fragmento de ADN complementario de 2 128 pb del gen pol, utilizando el estuche comercial Super Script TM One-Step RT-RCP SystemwithPlatinum® Taq High Fidelity (InvitrogenTM, EU) bajo las siguientes condiciones:*

- *25 µL de Buffer 2X Reaction Mix, (0,4mM de cada dNTP y 2,4mM de MgSO4).*
- *20uM de cada cebador: kvl 068 y kvl 069 (Tabla 6).*
- *50mM de MgSO4.*

- *1 µL de enzima SuperScript TM III RT/Platinum® Taq High Fidelity.*
- *40U/uL de Protector de RNasa (Roche, Alemania).*

*Finalmente, a esta mezcla se le agregó 10 µL del ARN extraído obteniendo un volumen final de reacción de 50 µL. La trascripción inversa se realizó bajo las siguientes condiciones:*

***Tabla 2.** Condiciones en que se desarrolló la TI-RCP*

| ***Temperatura*** | ***Tiempo*** | ***Descripción*** |
|---|---|---|
| ***55°C*** | *30 minutos* | *Transcripción reversa* |
| ***94°C*** | *2 minutos* | *Desnaturalización inicial* |
| ***40 veces*** | | |
| ***94°C*** | *15 segundos* | *Desnaturalización* |
| ***53°C*** | *30 segundos* | *Hibridación de los cebadores* |
| ***68°C*** | *2:30 minutos* | *Elongación* |
| ***Fin del ciclaje*** | | |
| ***68°C*** | *5 minutos* | *Elongación final* |
| ***4°C*** | *12 horas* | *Almacenamiento* |

*Para la RCP anidada se utilizó el estuche comercial Expand High Fidelity RCP System (Roche, Alemania) obteniéndose un fragmento interno de 1 254 pb. Este sistema tiene un componente con actividad exonucleasa 3´- 5´, por tanto es necesario preparar la mezcla de RCP en dos tubos separados para prevenir la degradación de los cebadores. A un primer tubo se le adicionó:*

- *10 mM de cada dNTPs.*
- *20uM de cada cebador, KVL 070 y KVL 084*
- *Completándose esta primera mezcla con agua hasta un volumen de 24 µL.*

*La segunda mezcla se preparó con:*

- *5 µL de 10X Expand Buffer.*
- *25mM de MgCl2.*
- *3.5U/uL de Expand HF Enzyme (Roche, Alemania).*

*Finalmente se le adicionó 1 µL del ADNc amplificado al tubo que contiene 24 µL de la mezcla uno. Luego se añadió 25 µL de la segunda mezcla a cada tubo de reacción para obtener un volumen final de 50 µL.*

*Se utilizó un control negativo constituido por agua en lugar de ADN. Este se incluyó en cada ensayo desde el paso de extracción del ARN con el objetivo de descartar posibles inhibiciones o contaminaciones en la RCP. Esta reacción se sometió al siguiente ciclaje:*

***Tabla 3.** Condiciones en que se desarrolló la RCP anidada:*

| ***Temperatura*** | ***Tiempo*** | ***Descripción*** |
|---|---|---|
| ***94°C*** | *2 minutos* | *Desnaturalización inicial* |
| ***10 ciclos*** | | |
| ***94°C*** | *15 segundos* | *Desnaturalización* |
| ***53°C*** | *30 segundos* | *Hibridación de los cebadores* |
| ***72°C*** | *1:30 minutos* | *Elongación* |
| ***Fin del ciclaje*** | | |
| ***72°C*** | *5 segundos* | *Elongación final* |
| ***30 ciclos*** | | |
| ***94°C*** | *15 segundos* | *Desnaturalización* |
| ***53°C*** | *30 segundos* | *Hibridación de los cebadores* |
| ***72°C*** | *1:30 minutos* | *Elongación* |
| ***Fin del ciclaje*** | | |
| ***72°C*** | *5 segundos* | *Elongación* |
| ***72°C*** | *7 minutos* | *Elongación final* |
| ***4°C*** | *12 horas* | *Almacenamiento* |

*2.6.3 Análisis de los productos de la RCP anidada*

*Para analizar los productos de la RCP anidada se tomaron 10 uL de la muestra y se analizaron en el QIAxcel Advanced System (Casa Comercial QIAGEN), utilizando como cartucho el QIAxcel DNA Screening Kit (2 400), con el patrón de alineamiento QX 15bp-3kb, y el patrón de peso molecular de 50bp-1,5kb. El análisis de los productos de la RCP se realizó siguiendo el protocolo descrito por la casa comercial.*

*2.6.4 Purificación de los productos de la RCP anidada*

*Los productos de la RCP anidada se purificaron utilizando el estuche comercial QIAquick® RCP Purification Kit (QIAGEN, Alemania), siguiendo el protocolo indicado por los fabricantes.*

*2.6.5 Secuenciación de ácidos nucleicos*

*Se realizó la secuenciación nucleotídica a un fragmento de 1 254 pb del gen pol. Este fragmento abarcó 866 nucleótidos (289 aminoácidos) de la IN del VIH-1. Se realizaron cuatro reacciones de secuencia por cada producto de RCP anidada purificado, con el objetivo de solapar el mismo fragmento con varias secuencias.*

***Tabla 4.** Secuencias de los cebadores empleados en las reacciones de TI-RCP, RCP anidada y en la secuenciación:*

| Nombre | Secuencia | Posición | Descripción |
|---|---|---|---|
| **KVL 068** | AGGAGCAGAAACTTWCTATGTAGATGG | 3854-3880 | Cebador externo en el sentido de la amplificación |
| **KVL 069** | TTCTTCCTGCCATAGGARATGCCTAAG | 5955-5981 | Cebador externo en el sentido negativo de la amplificación |
| **KVL 070** | TTCRGGATYAGAAGTAAAYATAGTAACAG | 4013-4042 | Cebador interno en el sentido positivo de la amplificación |
| **KVL 084** | TCCTGTATGCARACCCCAATATG | 5243-5266 | Cebador interno en el sentido negativo de la amplificación y la secuenciación |
| **KVL 076** | GCACAYAAAGGRATTGGAGGAAATGAAC | 4161-4188 | Cebador en el sentido positivo de la secuenciación |
| **KVL 082** | GGVATTCCCTACAATCCCCAAAG | 4647-4669 | Cebador en el sentido de la secuenciación |
| **KVL 083** | GAATACTGCCATTTGTACTGCTG | 4750-4772 | Cebador en el sentido negativo de la secuenciación |

*Se hicieron mezclas para cada reacción de secuenciación que consisten en: 8 µL de la mezcla de secuencia DTCS Quick Star Master Mix (Dye Terminador Cycle Sequencing (DTCS) Quick Start Kit, de Beckman Coulter, EUA), 6 µL de H2O, 1 µL de cada uno de*

*los cebadores y 5 µL de ADN purificado, obteniéndose un volumen final de reacción de 20 µL. Para esta reacción se realizaron 50 ciclos de 96°C por 30 segundos, 50°C durante 20 segundos y 60°C por 4 min.*

*2.6.6 Edición de las secuencias*

*Las secuencias obtenidas se ensamblaron y editaron utilizando la herramienta informática Sequencher TM Version 4.10.1 (Genes Codes Corporation, USA). Como secuencia nucleotídica de referencia se utilizó la correspondiente al gen de la IN de la cepa de VIH-1 B.FR.83.HXB2_LAI_IIIB_BRU.K03455.*

*2.6.7 Análisis de las mutaciones de resistencia*

*Las mutaciones que confieren resistencia a los IIN, así como los niveles de resistencia se identificaron mediante el algoritmo de interpretación de resistencia genotípica de Regadb, versión 9.0.1, de la Universidad Católica de Leuven, Bélgica (http://regadb:8080/regadb/regadb) y HIVDB v8.8 de la Universidad de Stanford (https://hivdb.stanford.edu/hivdb/by-mutations).*

*2.6.8 Determinación del subtipo*

*La determinación del subtipo de VIH-1 se realizó utilizando la herramienta Rega subtyping tool version 3 (82) y se confirmó por análisis filogenético manual usando CLUSTAL-X y el método de unión por vecindad en MEGA versión 5 (Kimura's 2-parameter correction, bootstrap 1 000) (83). La asignación de las FRs se hizó usando Simplot versión 2.5 (84). Las secuencias de referencia incluyeron los subtipos A (Número de acceso a Genbank AM000055, AM000053), B (AY037269, DQ383746, K03455), C (AY563170, AY727522), D (K03454, M27323), F (DQ189088, AF077336), G (AF084936, AY371121), H (AF190127, AF190128, AF005496), J (EF614151, AF082394, AF082395), K (AJ249235, AJ249239), FRs que contienen regiones no clasificadas (AF286236, AF457101), CRF01_AE (AF197340, U51188), CRF02_AG (AY371122, AY371123), CRF18_cpx (AF377959, AY586541, AY894993, AY586540), CRF19_cpx (AY588971, AY588970, AY894994), CRF20_BG (AY586545, AY586544), CRF23_BG (AY900571, AY900572) y CRF24_BG (AY900574, AY900575).*

*2.6.9 Control de Calidad*

*En cada corrida se incluyó un control negativo para chequear la contaminación cruzada. Además, para confirmar la ausencia de contaminación cruzada o confusión con las muestras, se comprobaron las alteraciones de las secuencias utilizando Calibrated Population Resistance tool versión 6.0 (http://cpr.stanford.edu/cpr.cgi) y se realizaron reconstrucciones filogenéticas de todas las secuencias generadas. Se incluyeron los subtipos y CRF del 2008 de la base de datos de Los Álamos (http://www.hiv.lanl.gov/content/ sequence/NEWALIGN/align.html). Las secuencias fueron alineadas utilizando CLUSTAL-X y el método de unión por vecindad en MEGA versión 5 (Kimura's 2-parameter correction, bootstrap 1 000). Se evaluó la robustez de la topología del árbol mediante un análisis de bootstrap de 1 000 réplicas. La representación gráfica del árbol filogenético fue trazada utilizando FigTree v1.4.0.*

*2.7 Aplicación del RCP-secuencia casero para la determinación de la resistencia del VIH-1 a los IIN en la práctica clínica*

*2.7.1 Población de estudio*

*Para la evaluación de la aplicabilidad del ensayo en la práctica clínica se procesaron un total de 32 plasmas de pacientes que deberían recibir o recibían en el momento de la toma de la muestra, como terapia de rescate, IIN; entre enero del 2017 y enero 2019. Se incluyeron 26 pacientes vírgenes a los IIN y seis que ya habían sido tratados con este grupo farmacológico con anterioridad al período de estudio. Se analizó una muestra por cada paciente con el objetivo de detectar mutaciones que confieren resistencia a los IIN.*

*2.7.2 Ensayos de resistencia genotípica*

*Para la genotipificación del VIH-1 se centrifugó 1 mL de plasma y el sedimento fue resuspendido y extraído utilizando el estuche QIAamp Viral RNA Kit (QIAGEN, Alemania). La extracción de ARN viral se realizó manualmente siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. La transcripción inversa del ARN del VIH-1, la amplificación y la secuenciación bidireccional (basada en el método de Sanger) de los fragmentos del gen pol se llevó a cabo usando el ensayo casero normalizado en el presente*

*estudio. Las secuencias obtenidas cubrían un fragmento de 1 254 pb. Estas fueron editadas y ensambladas usando Sequencher version 4.10 (Gene Codes Corporation, EE.UU.).*

*2.7.3 Análisis de los datos*

*El subtipo del VIH-1 se determinó utilizando la herramienta Rega version 3 (http://regatools.med.kuleuven.be/typing/v3/hiv/typingtool/). La incidencia de mutaciones de resistencia a fármacos en pacientes no tratados se analizó mediante Calibrated Population Resistance (CPR) tool version 8.0 (http://cpr.stanford.edu/cpr.cgi) y se basó en la lista de mutaciones para la vigilancia de la resistencia a las drogas (MRD) publicadas en la base de datos de Stanford (85).*

*La interpretación de la resistencia a los medicamentos se llevó a cabo mediante el algoritmo Rega version 9.0.1 (http://regadb:8080/regadb/regadb) y HIVDB v8.8 de la Universidad de Stanford (https://hivdb.stanford.edu/hivdb/by-mutations). Los niveles de resistencia a los IIN fue calculado promediando el porcentaje de resistencia alta (R) y de resistencia intermedia (I) que pertenece a un medicamento en particular.*

## *3. Resultados y Discusión*

*A finales del 2017 había en el mundo 37 millones de personas infectadas con VIH-1, de las cuales 21,7 millones de personas estaban recibiendo algún tratamiento ARV (7). Esta cifra expone los avances realizados en la ampliación del acceso al tratamiento, pero también subraya el esfuerzo que todavía se necesita para aplicar plenamente la recomendación de la Organización Mundial de la Salud (OMS). La OMS y el Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/sida (ONUSIDA) han establecido una meta conocida como 90-90-90, cuya finalidad es disminuir la transmisión del VIH-1 y abrir un camino hacia la eliminación de la infección. Para el 2020 se espera que el 90% de las personas infectadas con VIH-1 que reciben tratamiento ARV alcancen la supresión virológica, y que este porcentaje se eleve en un 95% para el 2030 (86).*

*La eliminación del sida como amenaza para la salud pública requiere acelerar los esfuerzos para ampliar la cobertura y la calidad del tratamiento. Esta ampliación debe equilibrarse para que el tratamiento ARV siga siendo efectivo y que los riesgos y el impacto de la resistencia del VIH-1 se reduzcan al mínimo (86).*

*La resistencia del VIH-1 previa al tratamiento ha aumentado en los países de medianos y bajos ingresos. En África meridional y África oriental, la resistencia a los ITINAN es de un 23% y 29%, respectivamente (86).*

*Con el propósito de obtener la máxima eficacia a largo plazo de los regímenes de TARVAE de primera línea y asegurar la sostenibilidad de los programas de tratamiento, es esencial reducir al mínimo la propagación de la resistencia Incluso en los entornos que cuentan con una gestión óptima del programa de TARVAE, cabe prever que surja cierto grado de resistencia en las poblaciones que reciben fármacos ARVs y que se transmitan virus resistentes a las personas sin infección previa (87).*

*Cuba logró la cobertura completa del tratamiento ARV en el año 2003, con la producción de una serie de compuestos genéricos dirigidos contra la PR y la TR. La combinación de estos medicamentos formó parte de las terapias de primera y segunda línea utilizadas en el país. A través de un Proyecto con el Fondo Mundial en el año 2004 se adquirieron otros medicamentos que permitieron diversificar la terapia y emplearla en esquemas de rescate en aquellos pacientes con fallos a la primera y segunda línea de ARVs y con altos niveles de resistencia. En el año 2009 se comenzó el monitoreo de la resistencia antirretroviral (88).*

*Kourí y col., en el 2012 planteaban la existencia de elevados niveles de resistencia a las terapias que se empleaban, debido a: una exposición prolongada a terapias fallidas (se contaba con opciones limitadas para las sustituciones de los antivirales), y durante un largo período de tiempo se emplearon regímenes sub-óptimos que utilizaban IPRs (regímenes no potenciados con RTV (88).*

*Además, desde el año 2011 se viene observando un incremento de la RT alcanzando valores hasta la fecha de un 21,5%; lo que ha traído como resultado el cambio de las terapias de primera línea (89). Por ello, desde principios del año 2018 los nuevos esquemas que se emplean en Cuba incluyen a los IIN, un nuevo grupo farmacológico con una elevada eficacia, demostrada en los diferentes ensayos clínicos publicados (90).*

*3.1 Normalización de un método de RCP-secuenciación casero para la detección de resistencia a los inhibidores de la integrasa del VIH-1*

*A pesar de que está disponible un sistema comercial para detectar la resistencia del VIH-1 frente a los IIN viral (ViroSeq™ HIV-1 Integrase RUO Genotyping Kit, Celera, EU), el mismo tiene el inconveniente del alto costo y por ende no es accesible para la mayoría de los países de bajos y medianos ingresos. Esto ha conllevado a que los países busquen alternativas de métodos caseros para detectar la resistencia viral y facilitar el manejo adecuado del tratamiento ARV (91).*

*En la presente investigación con el objetivo de normalizar un método de RCP-secuenciación casero para la detección de resistencia a los IIN del VIH-1, se determinó el límite inferior de amplificación y se evaluó la precisión del ensayo (Repetitividad y reproducibilidad).*

*Se seleccionaron muestras de VIH-1 que tenían subtipos previamente determinados conocidos en el gen de la polimerasa viral (PR +TI), y que se correspondieran con aquellas variantes más representativos de la epidemia cubana (92). Las muestras elegidas tuvieron altos valores de CV (997- 88 000 000 copias de ARN/mL), lo que permitió, realizar las diluciones seriadas de los plasmas con un amplio rango amplio de (CVs) y determinar el límite inferior de detección del ensayo.*

*El límite inferior de amplificación del ensayo genotípico casero estuvo, de manera general, en el rango entre 246 y 725 000 copias de ARN/mL y la mediana fue de 5 000 copias de ARN/mL (Ver Tabla 5). El límite inferior de amplificación para el subtipo B*

*fue de 250 copias/mL, para los recombinantes BG de 5 000 copias/mL, CRF18_cpx de 12 000 copias/mL, CRF19_cpx de 1 220 copias/mL y el subtipo C de 246 copias/mL.*

***Tabla 5.*** *Límite inferior de amplificación del fragmento correspondiente a la integrasa viral obtenido en el ensayo de RCP- secuencia casero según subtipos del VIH-1*

| ***Subtipo determinado en PR+TI*** | ***Muestras estudiadas*** | ***Carga Viral inicial (copias de ARN/mL)*** | ***Límite inferior de amplificación (copias de ARN/mL)*** |
|---|---|---|---|
| ***B*** | ***1*** | *1 000 000* | *250* |
| | ***2*** | *1 600 000* | *400* |
| | ***3*** | *390 000* | *390* |
| | ***4*** | *790 000* | *395* |
| | ***5*** | *530 000* | *265* |
| ***BG*** | ***6*** | *1 200 000* | *12 000* |
| | ***7*** | *850 000* | *8 500* |
| | ***8*** | *1 300 000* | *13 000* |
| | ***9*** | *500 000* | *5 000* |
| | ***10*** | *120 000* | *12 000* |
| ***CRF18_cpx*** | ***11*** | *725 000* | *725 000* |
| | ***12*** | *120 000* | *12 000* |
| | ***13*** | *2 070 000* | *207 000* |
| | ***14*** | *88 000 000* | *88 000* |
| | ***15*** | *1 800 000* | *180 000* |
| ***CRF19_cpx*** | ***16*** | *6 020 000* | *6 020* |
| | ***17*** | *1 220 000* | *1 220* |
| | ***18*** | *850 000* | *8 500* |
| | ***19*** | *120 000* | *1 500* |
| | ***20*** | *90 000* | *4 500* |
| ***C*** | ***21*** | *997* | *249* |
| | ***22*** | *1 100* | *275* |
| | ***23*** | *7 900* | *246* |

***Abreviaturas:*** *TI: transcriptasa inversa, PR: proteasa*

*El fragmento del gen pol que codifica para la IN del VIH-1 (p31), comienza en la posición 4 230 de la cepa HXB2, utilizada como prototipo en el compendio de secuencias de la base de datos de Los Álamos del 2018 (http://www.hiv.lanl.gov/content/ sequence/NEWALIGN/align.html) y termina en la posición 5 096. Sin embargo como se aprecia en la (Tabla 4 de materiales y métodos) el segmento que se amplificó va de la posición (3 854 - 5 981).*

*Para los recombinantes BG cubanos, esta región alterna los subtipos B, y G (CRF20_BG y CRF24_BG) y B, G y B (CRF23_BG) en la secuencia en cuestión, siendo mayoritario subtipo G. Para el CRF19_cpx este fragmento tiene secuencias de los subtipos D, A, G, A, G en ese orden, siendo mayoritario el subtipo G; mientras que para la CRF18_cpx, este segmento tiene H, U, G, AG, K, según reporta el autor que describió esta FRC (49, 50, 93).*

*El menor valor de CV obtenido en la determinación del límite inferior de amplificación se observó para los subtipos puros B y C, siendo estos subtipos los que mostraron mejores resultados. A continuación, con valores por encima de las 1 000 copias y por debajo de las 10 000 estuvieron los recombinantes BG y la CRF19_cpx y por último con valores de CV altos en el límite de detección del ensayo (por encima de las 10 000 copias), estuvo la CRF18_cpx, como se aprecia en la tabla 5.*

*Los resultados obtenidos en el presente trabajo para los subtipos puros B y C concuerdan con los de Van Laethem y col., en el 2008, cuyos valores de detección fueron desde valores muy bajos de CV, 250 y 246, hasta más de 1 000 000 y 7 900 copias, respectivamente (81).*

*Lo observado para los recombinantes cubanos BG, coincidió con lo descrito por esta autora, pero para el subtipo G, subtipo que es mayoritario en este segmento en el recombinante cubano. En el segmento Van Laethem obtuvo límites inferiores alrededor de las 1 000 copias (81), mientras que RCP casero fue capaz de detectar hasta 5 000 copias, lo que pudo deberse a que la zona de reconocimiento de los cebadores de esta CRF, es de subtipos B y G como se puede observar en la figura 6 (93).*

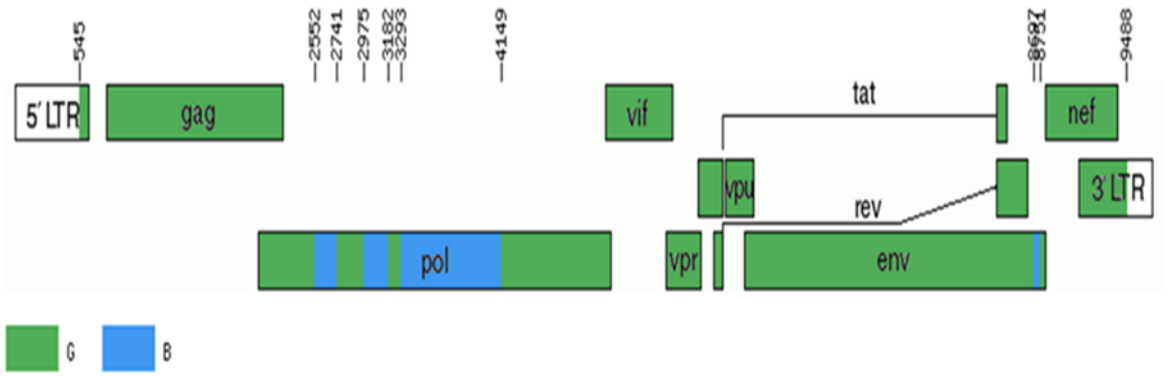



***Figura 6.*** *Mapa del recombinante CRF20_BG.* ***Fuente:*** *Base de datos de Los Álamos (http://www.hiv.lanl.gov/content/ sequence/NEWALIGN/align.html).*

*Sin embargo lo encontrado en el recombinante 18 es imposible de comparar, no solo porque este circula casi exclusivamente en Cuba, sino también porque parte del segmento que codifica para el gen de la IN es de origen desconocido. Además en las zonas de reconocimiento de los cebadores se aprecian los subtipos H, K y un recombinante A/G, ver figura 7 de los recombinantes (49), razón de más para que los cebadores empleados, que no fueron diseñados tomando en cuenta estos subtipos, no funcionen adecuadamente y se requieran de CVs más altas para lograr una amplificación exitosa de la proteína en cuestión.*

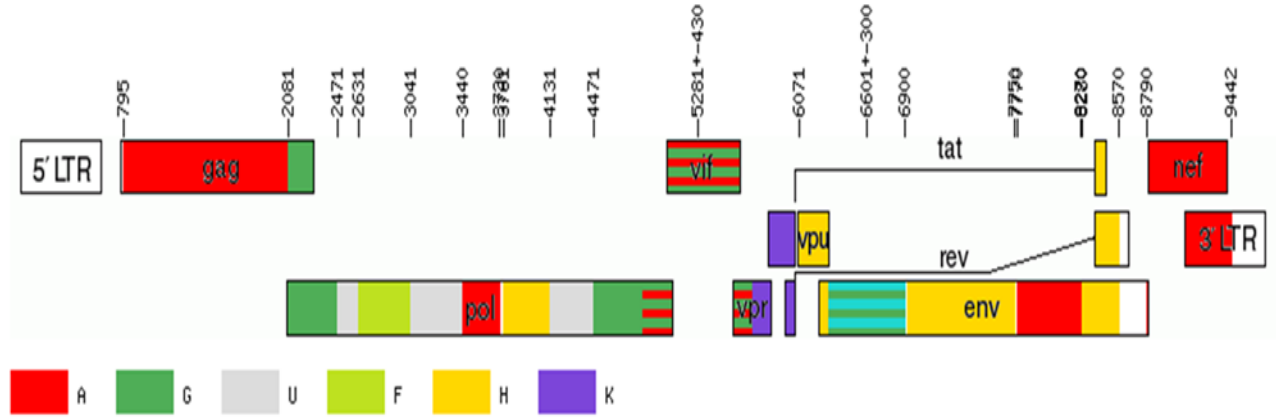



***Figura 7.*** *Mapa del recombinante CRF18_cpx.* ***Fuente:*** *Base de datos de Los Álamos (http://www.hiv.lanl.gov/content/ sequence/NEWALIGN/align.html).*

*Con la CRF19_cpx ocurre algo similar que con la 18, ella circula de forma epidémica en Cuba y tiene múltiples subtipos en el fragmento que codifica para la IN. En el segmento a amplificar este recombinante es mayoritariamente subtipo G (50), sin*

*embargo el cebador reconoce zonas que son de subtipo D y G como se puede apreciar en la figura 8.*

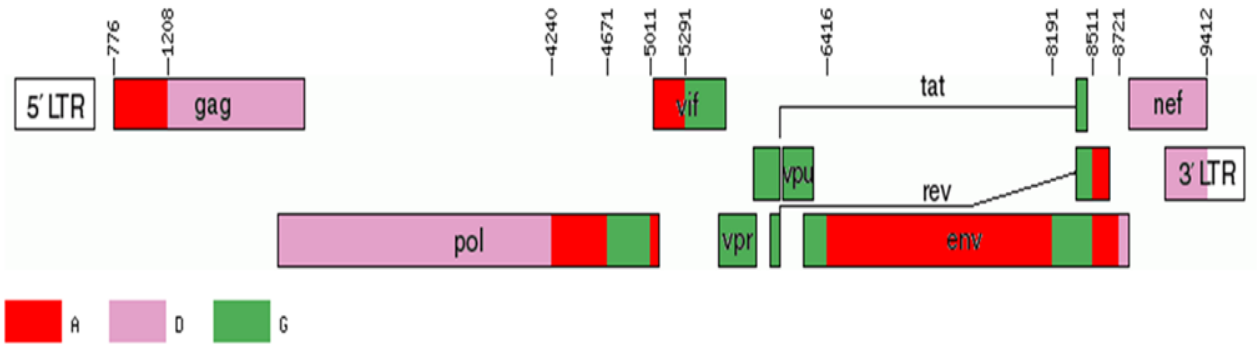



***Figura 8.*** *Mapa del recombinante CRF19_cpx.* ***Fuente:*** *Base de datos de Los Álamos (http://www.hiv.lanl.gov/content/ sequence/NEWALIGN/align.html).*

*Hasta la fecha, la mayoría de los trabajos para la detección de resistencia a los IIN se han centrado en el subtipo B de VIH-1. Sin embargo, los subtipos que circulan en los países en desarrollo, como el nuestro, donde la necesidad de tratamiento es mayor, porque el número de personas infectadas es mayor, generalmente no son del subtipo B. Los subtipos que predominan en los países en desarrollo incluyen el A, C, D, F y varias FRs. Las variaciones de secuencias en los sitios de unión para los cebadores que se emplean en las RCP, así como los de la secuenciación, son un obstáculo importante para el desarrollo de ensayos que tengan como blancos de amplificación proteínas virales de alguno de estos subtipos (81).*

*3.1.2 Precisión del ensayo de RCP casero para la amplificación del segmento del gen correspondiente a la integrasa viral. Varibilidad intraensayo (repetitividad) e interensayo (reproducibilidad)*

*En la tabla 6 se pueden observar los valores obtenidos de la prueba de repetitividad del ensayo. Se generaron todas las réplicas que estaban previstas. La identidad nucleotídica se encontró en el rango entre 98,2% - 99,8%; y la identidad aminoacídica entre 98,8% -100%. Para este ensayo, el 100% de las comparaciones en pares (30/30) fueron idénticas en más de un 98% a nivel nucleotídica y en más de un 99% a nivel aminoacídico.*

*En la prueba de reproducibilidad, el ensayo casero mostró también buenos resultados como se puede apreciar en tabla 6. Se generaron todas las réplicas que estaban previstas. La identidad nucleotídica de las secuencias estuvo en el rango de 98,2% - 99,9%; mientras que la identidad aminoacídica de las secuencias estuvo entre 99,2% - 100%.*

*El control negativo adicionado en cada RCP fue negativo, sugiriendo que no hubo contaminación cruzada. El análisis filogenético confirmó los subtipos virales asignados por la base de datos de Los Álamos y reafirmó la ausencia de contaminaciones.*

*Sin embargo, en la construcción del árbol filogenético (Anexo III) se aprecia que en la muestra 4955-18 (Subtipo C) se amplificaron y secuenciaron diferentes variantes virales. Esta muestra es la que, a su vez, arrojó menores valores de identidad nucleotídica y aminoacídica, a pesar de que todos ellos estuvieron por encima del 98%. Suponemos que esta divergencia podría deberse a que el paciente se encontraba en un recambio viral y a que la prueba empleada para la secuenciación, nos permite detectar todas las poblaciones virales presentes que se encuentran en la muestra, en una frecuencia superior al 20% (68).*

***Tabla 6.*** *Identidad nucleotídica y aminoacídica en el fragmento del gen que codifica para la integrasa viral de las muestras utilizadas para los ensayos de repetitividad y reproducibilidad.*

| ***Subtipo/código de la muestra (n=10)*** | | ***REPETITIVIDAD*** | | | | | | ***REPRODUCIBILIDAD*** | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | ***Primer operador (Primera tirada) (n=3) Media*** | | ***Primer Operador (Segunda tirada) (n=3) Media*** | | ***Identidad nucleotídica (n=6) Media ±DS*** | ***Identidad aminoacídica (n=6) Media ±DS*** | ***Segundo operador (n=3) Media*** | | ***Identidad nucleotídica (n=9) Media ±DS*** | ***Identidad aminoacídica (n=9) Media ±DS*** |
| | | ***NT*** | ***AA*** | ***NT*** | ***AA*** | ***NT*** | ***AA*** | ***NT*** | ***AA*** | ***NT*** | ***AA*** |
| ***B*** | *4924* | *99,9* | *100* | *99,8* | *100* | *99,8±0,1* | *100±0* | *99,2* | *99,8* | *99,6±0,5* | *99,9±0,13* |
| | *5241* | *100* | *100* | *99,6* | *100* | *99,8±0,2* | *100±0* | *99,7* | *100* | *99,8±0,17* | *100±0* |
| ***CRF19_cpx*** | *5027* | *98,7* | *100* | *99,2* | *100* | *98,9±0,4* | *100±0* | *99,3* | *100* | *99,1±0,3* | *100±0* |
| | *5029* | *99,9* | *99,8* | *98,5* | *99,3* | *99,2±0,9* | *99,5±0,4* | *99,6* | *99,8* | *99,3±0,7* | *99,6±0,4* |
| ***CRF18_cpx*** | *5028* | *99,1* | *99,8* | *99,2* | *99,5* | *99,1±0,3* | *99,6±0,3* | *98,8* | *99,6* | *99,0±0,5* | *99,6±0,3* |
| | *5546* | *99,5* | *99,5* | *99,8* | *99,9* | *99,7±0,2* | *99,8±0,3* | *99,8* | *99,9* | *99,7±0,2* | *99,8±0,3* |
| ***CRF_BG*** | *4883* | *99,9* | *99,5* | *99,9* | *100* | *99,9±0,05* | *99,8±0,4* | *99,9* | *99,8* | *99,9±0,06* | *99,8±0,3* |
| | *5243* | *98,2* | *98,9* | *98,3* | *98,9* | *98,2±0,5* | *98,9±0,6* | *98,9* | *100* | *98,5±0,5* | *99,2±0,7* |
| ***C*** | *3760* | *99,5* | *100* | *99,6* | *100* | *99,5±0,3* | *100±0* | *100* | *100* | *99,7±0,3* | *100±0* |
| | *4955* | *98,8* | *98,6* | *97,9* | *99,1* | *98,3±0,6* | *98,8±0,3* | *97,9* | *99,1* | *98,2±0,6* | *98,9±0,4* |

*Carthel C. y col., en el 2002, al comprar la variabilidad de la secuencia que codifica para la IN entre los diferentes grupos y subtipos del VIH-1, comentan su alto grado de conservación. Dentro de un mismo subtipo, la proteína es conservada en más del 94% y en más del 91% entre ellos. La mayor divergencia la encontró entre el grupo M y O, siendo de un 19% (94).*

*En el presente estudio se examinaron todos los cambios aminoacídicos, y las posiciones de MRD y de VMRD. No se encontraron mutaciones relacionadas con resistencia al antiviral en ninguna de las muestras, ni en las réplicas. Los cambios aminoacídicos que se encontraron no estaban incluidos en los algoritmos de interpretación de resistencia a drogas o no producían ningún cambio en la interpretación (80, 85).*

*Hay que destacar que los pacientes seleccionados no habían sido sometidos a tratamiento con el antiviral en cuestión (IIN). Las muestras fueron seleccionadas de aquellas que llegan al laboratorio por supuestos fallos a la terapia con ITI o IPR. Ello explicaría el hecho de que no hayamos encontrado mutaciones de resistencia en el gen que codifica para la IN viral, además del hecho de que este grupo farmacológico es de reciente empleo en las terapias cubanas y por ello tampoco deberíamos encontrar mutaciones asociadas con resistencia transmitida.*

***3.2*** *Detección de resistencia a los inhibidores de la integrasa. Implementación del ensayo genotípico de resistencia para los inhibidores de la integrasa. Aplicación del ensayo casero a la práctica clínica*

*3.2.1 Pacientes no tratados con inhibidores de la integrasa*

*El ensayo casero se validó en un conjunto de 32 muestras clínicas que se recibieron en el laboratorio de ITS, del IPK, en el período comprendido entre enero 2017 - enero 2019. Del total, 26 (81,25%) eran pacientes vírgenes a los IIN en el momento de la toma de la muestra. Los seis restantes (18,75%) recibían DTG en el momento que la muestra llegó al laboratorio. Todos los pacientes, cuyas muestras fueron procesadas, recibían tratamiento con IPR e ITI, medicamentos que son empleados en la terapia de primera y segunda línea en el país.*

*Del total (32), 15 (46,9%) portaban virus con resistencia completa a los ITIAN y a los ITINAN y 13 (40,6%) a los IPR. Además 12 (37,5%) virus eran multidrogo - resistentes,*

*es decir, tenían resistencia completa a las tres familias (ITIAN, ITINAN e IPR). Solamente dos pacientes eran susceptibles, y de otros dos no se conocía su perfil de resistencia. En el segmento del gen que codifica para las enzimas TI y PR los virus mostraban una amplia gama de subtipos, entre los que podemos citar: B, C, G, CRF18_cpx, CRF19_cpx, CRF20_BG.*

*La amplificación fue exitosa para 29 muestras (90,6%). El 9,4% (3/32) de las muestras no amplificaron. Una de las muestras, se envió al laboratorio en dos ocasiones diferentes y ninguna de las dos muestras se pudo amplificar, a pesar de que su CV estaba por encima de las 10 000 copias. Esta muestra había sido clasificada como CRF19_cpx en el segmento de la TI + PR. Las otras dos muestras negativas, fueron del subtipo C y de un virus recombinante A1DHK (PR y TI), respectivamente, según la base de datos de Los Álamos (http://www.hiv.lanl.gov/content/ sequence/NEWALIGN/align.html). Ambas muestras se repitieron en dos ocasiones desde el paso de extracción de ácidos nucleicos y a pesar de que las CVs estaban por encima de las 1 000 copias de ARN/mL, se obtuvo el mismo resultado. La imposibilidad de amplificar la región de IN podría deberse a las diferencias entre la secuencia blanco y la secuencia del cebador, así como a la conservación y almacenamiento de las muestras. Además, como se explicó con anterioridad, el recombinante CRF19_cpx en este segmento tiene los subtipos A, D, G, A, en este orden, siendo mayoritario el subtipo A, lo que podría hacer más difícil el reconocimiento del cebador de la región a amplificar en cuestión (58). Esto mismo pudo suceder con el recombinante complejo A1DHK. Debemos adicionar, además, que en la RCP fueron empleados los cebadores diseñados por Van Laethem K. y col., en cuyo trabajo no se tuvieron en cuenta los recombinantes de VIH-1 que circulan en Cuba (81).*

***Tabla 7.*** *Características clínicas de los pacientes incluidos en el estudio*

| ***Características de los pacientes*** | ***No tratados (23)*** | ***Tratados (6)*** |
|---|---|---|
| ***Pacientes n (%)*** | *29 (100%)* | |
| ***Conteo de linfocitos T CD4$^{+}$ a la toma de la muestra (cel/mm$^{3}$, mediana (rangos intercuartiles))[a]*** | *119,5 (69,5-186,5)* | *194 (54-218)* |
| ***Carga viral de VIH-1 al momento de la toma de la muestra (copias de ARN/mL, mediana (rangos intercuartiles))[b].*** | *121 000 (61 000-280 000)* | *20 000 (12 000-20 621)* |
| ***Años de diagnóstico (año–mes, mediana (rango intercuartiles ))[c].*** | *13,5 (8,3-17,3)* | *17,4 (12,7- 20,02)* |
| ***Años que llevan con tratamiento (año-mes, mediana (rango intercuartiles ))[d].*** | *11,2 (7,95-14,05)* | *14,35 (10,95-15,42)* |
| ***Días tomando DTG (año-mes, mediana (rango intercuartiles ))[e].*** | *0* | *0,35 (0,22-0,47)* |
| ***Carga viral a los tres meses de iniciado el tratamiento (copias de ARN/mL, mediana (rangos intercuartiles))[f].*** | *35 (0-210)* | *27 450 (9 922- 101 225)* |
| ***Carga viral a los seis meses de iniciado el tratamiento (copias de ARN/mL, mediana (rangos intercuartiles))[g].*** | *0 (0-210)* | *390 000 (390 000-1 130 000)* |

[a]: *Mediana del conteo de linfocitos T CD4+ en el momento de la toma de la muestra de 18 pacientes no tratados y de cinco pacientes tratados.*

[b:] *Mediana de la CV en el momento de la toma de la muestra de 21 pacientes no tratados y cinco tratados.*

[C:] *Mediana de los años de diagnóstico de los 29 pacientes que amplificaron.*

[d:] *Mediana de los años de tratamiento de los 29 pacientes que amplificaron.*

[e:] *Mediana del tiempo de tratamiento con DTG, escogiendo como referencia la fecha de toma de la muestra, de los seis pacientes tratados.*

[f:] *Mediana de la CV a los tres meses de iniciado el tratamiento con DTG de los 20 pacientes no tratados y de los seis tratados.*

[g:] *Mediana de la CV a los seis meses de iniciado el tratamiento con DTG de 14 pacientes tratados y de cinco tratados.*

*Como se puede observar en la tabla 8, la mediana del conteo de LT CD4+ para los pacientes no tratados con IIN, en el momento de la toma de la muestra fue de 119,5 células/mm$^3$ y la CV de 121 000 copias/mL. La mediana del tiempo transcurrido desde el diagnóstico hasta la toma de la muestra fue de 13,5 años y la del tiempo de tratamiento fue de 11,2 años.*

*El conteo de linfocitos T CD4+ y la CV son los dos marcadores pronóstico más utilizados en la progresión clínica de la infección por VIH-1. En la etapa crónica de la infección, el nivel de replicación viral, que se mide por la concentración de ARN en sangre, determina en gran medida el tiempo desde la infección inicial hasta el desarrollo del sida y la muerte: una alta CV inicial mantenida es un marcador de progresión rápida, y en todos los individuos la progresión clínica está precedida por un incremento en la CV (34).*

*Cuando la infección progresa, el conteo de LT CD4+ disminuye y se plantea, en principio, que este puede ser también un marcador pronóstico de la evolución hacia el desarrollo del sida o la muerte del paciente. A pesar de existir un amplio consenso sobre esto, se ha observado una mala correlación entre los valores de CV y la declinación de los LT CD4+ en pacientes adultos, lo que ha llevado a un renovado debate sobre los méritos relativos de ambos parámetros como indicadores pronósticos en ausencia y presencia del tratamiento antirretroviral (34).*

*Los bajos valores de CD4+ y los altos valores de CV que se observan en la tabla 7 están relacionados con el hecho de que la mayoría de los pacientes tenían muchos años diagnosticados con infección por VIH-1 (14 años), solamente un paciente había sido diagnosticado recientemente. Además, como también hemos descrito, estos pacientes se incorporaron a esquemas de rescate por tener resistencia a diversos ARVs, lo que implica una mayor replicación viral y con ello una disminución de los LT CD4+ (34).*

*El primer objetivo del presente estudio fue normalizar un ensayo casero para la amplificación de la IN viral con vistas a detectar mutaciones de resistencia a este ARV, de reciente inclusión en la terapia cubana en pacientes con múltiples fallos terapéuticos.*

*Todos los pacientes que en el momento de la toma de la muestra eran vírgenes a IIN, se incluyeron posteriormente en un esquema con IIN.*

*Una vez comenzado el tratamiento, se realizó un monitoreo de la respuesta a la terapia, con cuantificaciones de la CV a los tres y seis meses de iniciada la misma. Se esperaba que la CV alcanzara la indetectabilidad en este período de tiempo. De persistir los valores de CV se indicaría un segundo ensayo de resistencia a los IIN.*

*La mediana de la CV a los tres meses de iniciado el tratamiento fue de 35 copias de ARN/mL. Hubo tres pacientes sin determinación de la CV en este tiempo y de ellos, dos comenzaron con DTG a principios del 2019, por lo que el valor de la CV no estaba disponible. A los tres meses encontramos 7 pacientes con valores indetectables de CV (35%) y 11 con valores por debajo de las 1 000 copias de ARN/mL (55%). Sin embargo, en dos pacientes (10%) persistieron valores por encima de las 40 000 copias de ARN/mL. Estos dos pacientes iniciaron el tratamiento con DTG con valores de CV por encima de las 100 000 copias, lo que hizo más difícil el descenso en tan corto período de tiempo.*

*La mediana de la CV a los seis meses de iniciado el tratamiento fue de 0 copias de ARN/mL (14/23; 60,9%). No tuvimos este dato en nueve pacientes (9/23; 39,1%) y de ellos, dos fallecieron durante el período de estudio. La CV de los pacientes fallecidos era no detectable a los tres meses de iniciado el tratamiento, por lo que suponemos que no fallecieron por una falla terapéutica. Ocho (8/14; 57,1%) pacientes mantuvieron valores indetectables de CV y seis (6/14; 42,8%) tuvieron CVs por debajo de las 1 000 copias.*

*Estos resultados preliminares muestran la eficacia del DTG como terapia de rescate (103). El DTG es un medicamento relativamente nuevo que tiene características novedosas como: un perfil farmacocinético favorable, una vida media intracelular prolongada, lo que hace posible una dosis una vez al día sin necesidad de refuerzo farmacocinético y sin tener en cuenta los horarios de comida. También ofrece un perfil de resistencia favorable, mostrando una mayor barrera genética a la resistencia en comparación con los otros IIN (RAL y ELV) (95).*

*El ensayo SAILING (96) demostró la eficacia del DTG como tratamiento de rescate. El objetivo principal de este ensayo clínico fue determinar la no inferioridad del DTG frente al RAL en el tratamiento de rescate de pacientes con fracaso virológico y resistencia a dos clases de ARVs (excluyendo los IIN). La variable principal del estudio fue medir el porcentaje de pacientes que a las 48 semanas lograban una CV plasmática inferior a 50 copias por mL. El porcentaje de sujetos con ARN viral < 50 copias/mL a la semana 48, tratados con DTG, fue del 71% (251/354) (96).*

*3.2.2 Detección de subtipos en la región de la integrasa del VIH-1 y análisis del subtipo global*

*La diversidad del VIH-1 juega un papel fundamental en la diseminación de esta pandemia; por esta razón, es imprescindible continuar con la vigilancia de la epidemiología molecular y mejorar el uso de estrategias rigurosas de muestreo (97). El estudio de los subtipos no-B se ha convertido en un hecho obligado en la actualidad debido a las posibles implicaciones de estas variantes en: la respuesta a la terapia ARV, la progresión de la enfermedad y el diseño de vacunas. Todo ello, no sólo porque el tratamiento antirretroviral se ha introducido en los países donde las formas no-B son mayoritarios en las epidemias, sino también, porque el número de infecciones con estas variantes está aumentando en áreas donde antes primaba el subtipo B, como Europa y América del Norte (97).*

*Se estima que entre el 10 y el 50% de los virus que circulan en África son recombinantes de subtipos (94). Como es conocido en la epidemia de VIH-1 cubana están presentes todos los subtipos puros que circulan en África y algunas CRF y URF, cuya prevalencia en los últimos años ha ido en aumento, hasta convertirse en mayoría si se comparan con los subtipos puros (92).*

*Como se comentó en el acápite dos de Materiales y Métodos a las muestras seleccionadas se les conocía el subtipo viral en el fragmento del gen que codifica para la PR y la TI (desde el aa uno de la PR hasta el aa 335 de la TI). Teniendo en cuenta la alta diversidad viral de la epidemia cubana, nos propusimos determinar el subtipo viral en el segmento del gen que codifica para la IN y el subtipo final incluyendo las tres proteínas (PR-TI-IN).*

*Los subtipos encontrados en el fragmento estudiado fueron: subtipo B (12/29; 41,4%) seguidos por la CRF19_cpx (7/29; 24,1%), la CRF18_cpx y el subtipo C (ambos, 4/29; 13,8%), y el subtipo G (2/29; 6,9%) como se puede observar en la tabla 8.*

*Los subtipos encontrados en PR-TI, coincidieron con el subtipo detectado en el fragmento amplificado de la IN viral, excepto para dos recombinante BG (CRF20_BG). Uno de ellos resultó subtipo G y el otro B, en el gen en cuestión.*

***Tabla 8.*** *Subtipos detectados mediante secuenciación parcial de dos regiones del VIH-1 en las muestras analizadas.*

| Subtipo VIH-1 | Subtipo viral en PR+TI (%) | Subtipo viral en IN (%) | Subtipo viral global (%) |
|---|---|---|---|
| **B** | 10 (34,5%) | 12 (41,4%) | 10 (34,5%) |
| **CRF 18_cpx** | 3 (10,3%) | 4 (13,8%) | 3 (10,3%) |
| **CRF 19_cpx** | 6 (20,7%) | 7 (24,1%) | 6 (20,7%) |
| **CRF 20_BG** | 2 (6,9%) | 0 (0,0) | 0 (0,0) |
| **C** | 4 (13,8%) | 4 (13,8%) | 4 (13,8%) |
| **G** | 1 (3,5%) | 2 (6,9%) | 1 (3,5%) |
| **URF** | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 2 (6,9%) |
| **Sin subtipo** | 3 (10,3) | 0 (0,0) | 3 (10,3%) |
| **Total** | 29 (100%) | 29 (100%) | 29 (100%) |

*La forma recombinante 20_BG cubana, tienen en la región que codifica para la IN, subtipo G; lo que se corresponde con lo observado. En el caso del segundo recombinante BG que resultó B en la IN, pudiera también tratarse de un recombinante único, fenómeno muy común observado en áreas geográficas donde circulan diferentes subtipos, como es el caso de Cuba (93).*

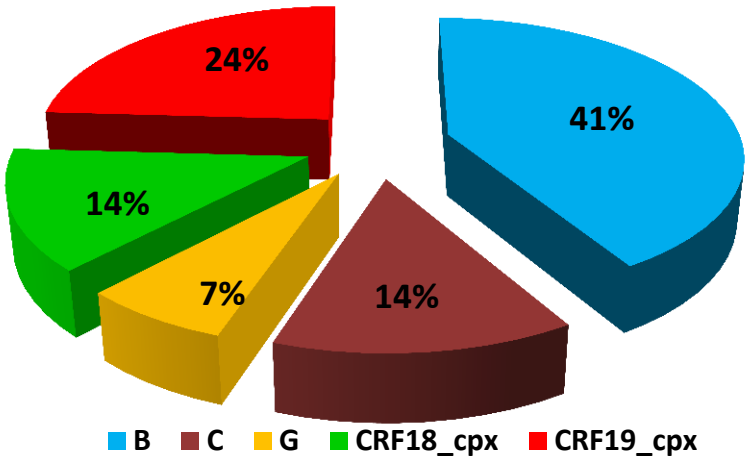



***Figura 9.*** *Distribución de los subtipos VIH-1 encontrados en el fragmento del gen amplificado que codifica para la integrasa viral.*

*3.2.3 Variabilidad de la región que codifica para la IN del VIH-1*

*La IN es una proteína que es codificada por el gen pol del VIH-1. Está compuesta por 288 aminoácidos y posee tres dominios estructurales que son: el amino- terminal que va desde el aminoácido uno hasta el 49, el núcleo catalítico, que se extiende desde el aa 50 hasta el 211; y el carboxilo-terminal ubicado desde el aa 212 hasta el 288 (18).*

*En general, el alto grado de conservación de las secuencias de aminoácidos de IN sugiere que existen fuertes restricciones estructurales en la proteína para mantener la actividad enzimática, lo que tiene implicaciones importantes para el diseño del fármaco. Los diferentes estudios de variantes del VIH-1 sugieren que los IIN podrían ser activos contra todos los subtipos de VIH-1 (94).*

*La aparición de cepas de VIH-1 que son resistentes a los ARVs no es un problema nuevo, pero recientemente ha recibido una mayor atención. La preocupación sobre el aumento observado en la transmisión de cepas de VIH-1 resistentes a los medicamentos surge como consecuencia del esfuerzo internacional conjunto para proporcionar un tratamiento adecuado a millones de personas que viven con VIH/sida en países con recursos limitados. Si los ARVs no se administran eficazmente, la resistencia del VIH-1 a las drogas podría generalizarse, lo que llevaría a un aumento de los fracasos terapéuticos, la transmisión de virus resistentes y una disminución de las opciones terapéuticas, la efectividad del programa de tratamiento y la supervivencia de los pacientes (71).*

*Hasta la fecha se ha reportado un solo caso de fracaso virológico en pacientes vírgenes con esquemas ARVs que incluyan DTG en terapia combinada, lo cual puede ser explicado por el bajo efecto ejercido por las mutaciones seleccionadas por este y por el efecto antagónico con respecto a la aparición de mutaciones en la TI. Sin embargo, se ha demostrado que los virus resistentes al DTG se transmiten de célula a célula y mantienen la capacidad de establecer reservorios y reactivarse (96). En estudios donde los pacientes han sido sometidos a monoterapia con DTG se describe falla virológica asociada a la presencia de mutaciones de resistencia a través de diferentes vías; G118R, T97A, E92Q, Y143C, E138K, G140S, Q148X, N155H (96).*

*El análisis de las 23 secuencias virales (pacientes no tratados) en el gen de la IN reveló variaciones (polimorfismos) en 85 aa de los 288 que codifican para la misma (85/288; 29,5%) (Ver figura 10). Las posiciones más variables (presentes en más de un 20%) en el dominio amino terminal fueron la 11 (43,4%) y la 31 (47,8%). En el núcleo catalítico fueron la 112 y la 119, ambas con un (73,9%), 125 (69,5%) y 201 (78,2%). En el carboxilo terminal fueron la 234 (69,6%) y la 283 (60,9%). Ninguna de las posiciones polimórficas, con mayores frecuencias, están asociadas a resistencia a los IIN (91).*

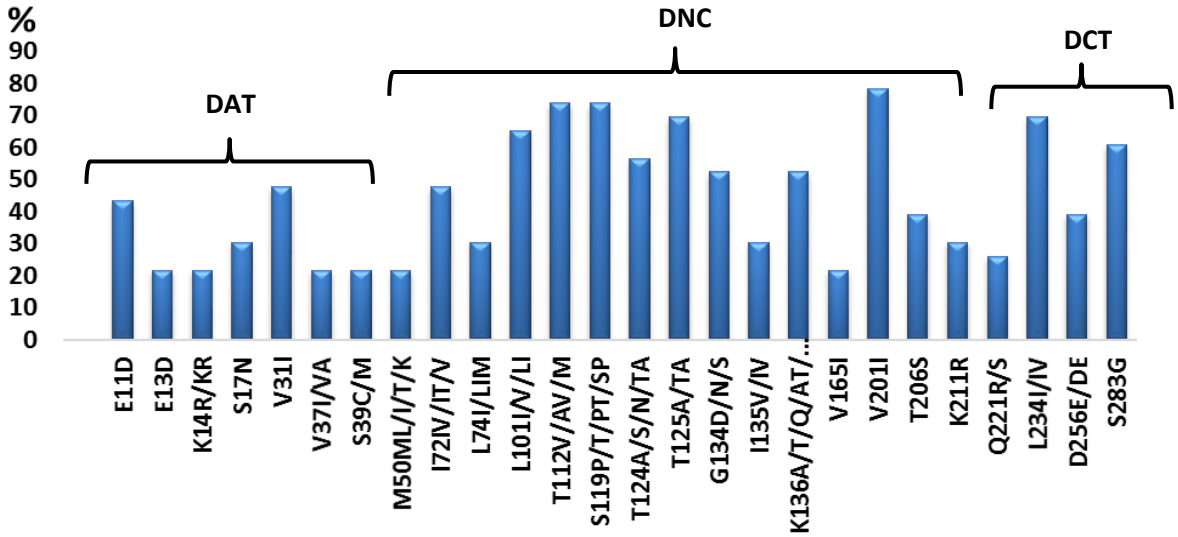



***Figura 10.*** *Posiciones polimórficas más frecuentes en la región que codifica para la IN del VIH-1.* ***Abreviaturas.*** *DAT: Dominio amino terminal; DNC: Dominio del núcleo catalítico; DCT: Dominio Carboxilo terminal.*

*En el dominio amino terminal (figura 11) se detectaron variaciones en todos los subtipos en las posiciones 11 y 31. Los cambios en la posición 6, 22 y 23 solo estuvieron presentes en la CRF18_cpx, mientras que los cambios en la posición 20 y la 41 solo fueron para la CRF19_cpx. Fueron exclusivos del subtipo C, los que se encontraron en la posición 30 y en el G, los que ocurrieron en la posición 42 (Ver Anexo IV).*

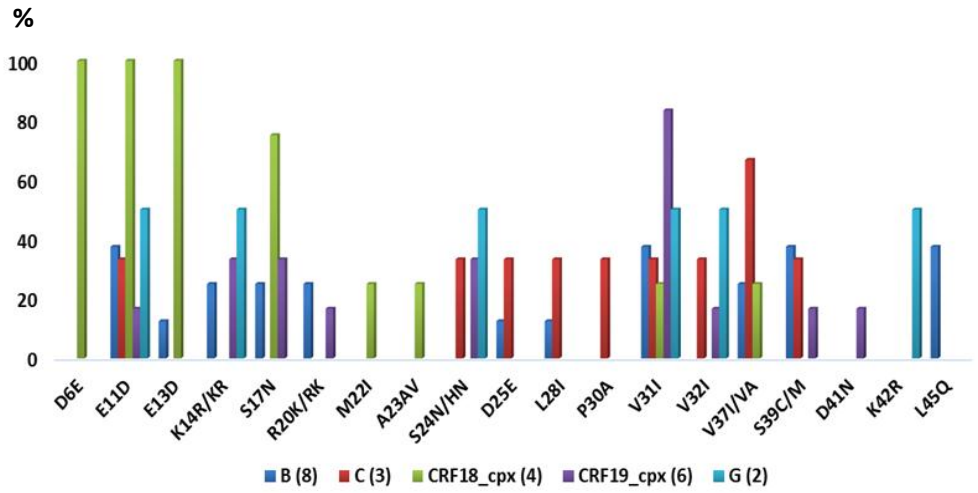



***Figura 11.*** *Frecuencia de los polimorfismos en el dominio amino terminal de la integrasa viral por subtipos.*

*Según el estudio de Leonard Rogers y col., las variaciones en las posiciones 25 (D por E) y 31 (V por I) se observaron en pacientes sudafricanos infectados con subtipo C de VIH-1 (98). El cambio del aa V por I se presenta entre un 75-85% de las secuencias de virus no B (106), lo que coincide con nuestros resultados. La 31I se encontró en un 50% (1/2) del subtipo G. A pesar de contar con solo dos muestras esta frecuencia coincide con las frecuencias reportadas por la base de Stanford (59%) en esta variante viral (80).*

*En el extremo carboxilo terminal se detectaron variaciones en todos los subtipos, en la posición 234 y 283 de la enzima. La posición 227 fue polimórfica en el subtipo G, mientras fueron exclusivos los cambios en la 219 y 278 del subtipo C. Cambios en la 256 ocurrieron en todos los subtipos, menos en C (figura 12). (Ver Anexo IV).*

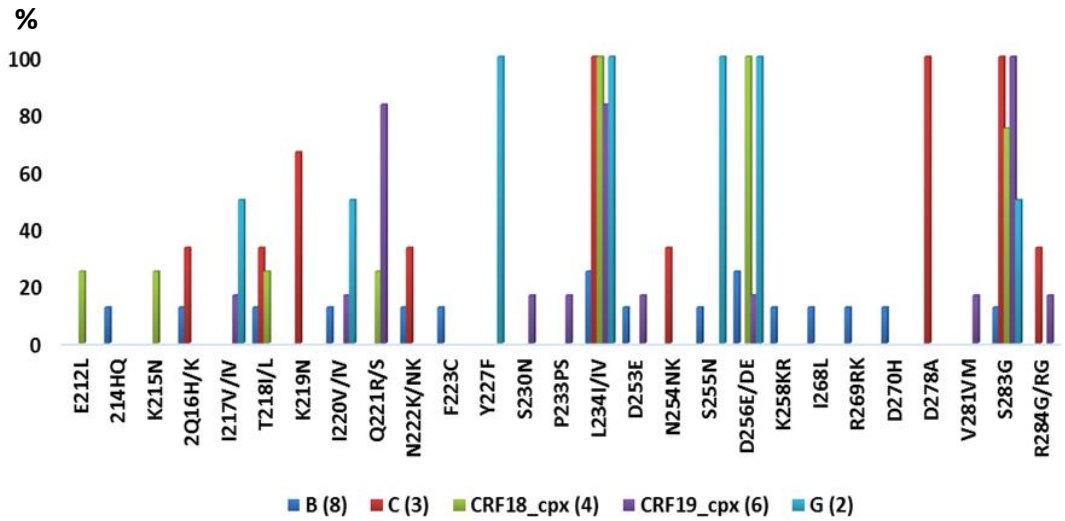



***Figura 12.*** *Frecuencia de los polimorfismos en el domino carboxilo terminal de la integrasa viral.*

*El cambio del aa L/V en la posición 234 se detectó en todos los subtipos, siendo más prevalente en subtipos no B. La base de Stanford describe que esta mutación es más frecuente en el subtipo C (89%) y en el G (96%). El aa A en la posición 278 se encontró exclusivamente en el subtipo C (100%, 3/3). Aunque en nuestro estudio contábamos con un número limitado de muestras en este subtipo, la frecuencia de este cambio coincidió con la descrita en la base de Stanford para el mismo (92%) (80).*

*En la posición 283, encontramos el aa G en todos los subtipos, siendo menos prevalente en el subtipo B, solamente se observó este cambio en un paciente (1/8, 12,5%). La base de Stanford refiere que esta mutación puede estar presente en un 82% en virus del subtipo C (87). Rogers y col, en el 2018, en su estudio plantean que las posiciones 234 y 283, son altamente polimórficas en virus con subtipos no B, lo que coincide con nuestros resultados (98).*

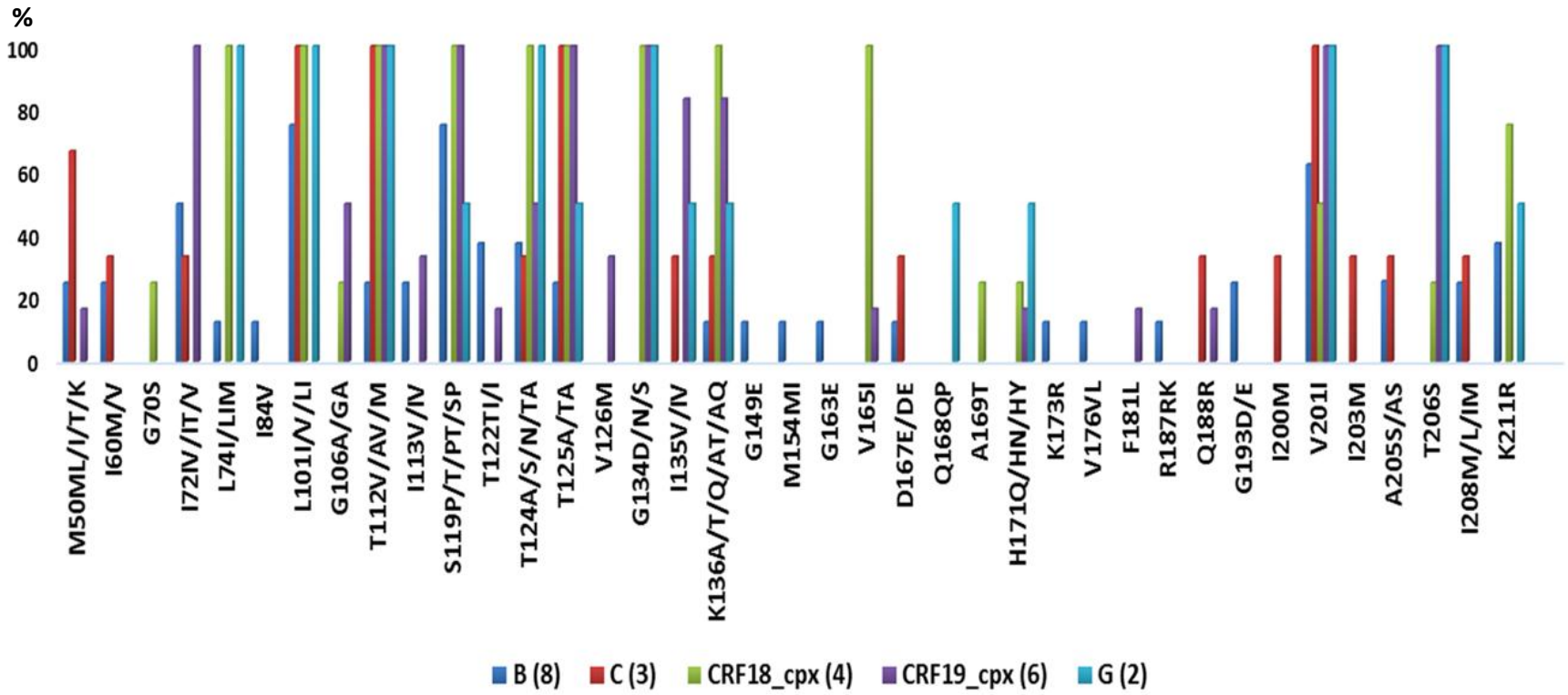



***Figura 13.*** *Frecuencia de los polimorfismos en el dominio del núcleo catalítico de la integrasa viral*

*En el dominio del núcleo catalítico están descritas la mayoría de las mutaciones que confieren resistencia a los IIN. Como se aprecia en la figura 13 es la región más extensa y variable (Ver Anexo IV). El cambio aa de la T por I/V/LI en la posición 101 se cuantificó en todos los subtipos virales con frecuencias por encima del 75%, menos en la CRF19_cpx; mientras que el aa V en la 112, que presenta el aa L en la cepa salvaje del subtipo B (HXB2), se observó en todos los subtipos no B, con frecuencias del 100%.*

*Numerosos cambios aa se constataron en la posición 124 de la IN (T por A/N/S/TA) (figura 13). En un estudio llevado a cabo por Saladini en el 2012, el cambio de T por A en la 124 fue altamente prevalente en pacientes vírgenes a los IIN (99).*

*Con una frecuencia variable entre los subtipos, encontramos el cambio de T por A en la posición 125 de la enzima. En el 25% de los virus del subtipo B, mientras este cambio se vió en el 100% de la CRF19_cpx, el subtipo C y la CRF18_cpx. En el subtipo G solo se encontró en una de las dos muestras, para un 50%. La base de Stanford refiere que este cambio se presenta en el subtipo C en un 86% (80).*

*Por último, y coincidiendo con lo comentado por Rogers y col., fue encontrado con una frecuencia alta, en todos los subtipos de VIH-1 de las muestras estudiadas, el cambio de V por I en la posición 201 de la IN. Roger también plantea que esta mutación es altamente polimórfica tanto en subtipos B como en no B (98).*

*A pesar de que la IN es una proteína muy conservada, algunos de los polimorfismos detectados tienen frecuencias altas en las formas recombinantes cubanas, lo que sugiere un seguimiento estrecho de ellas por la implicación que pudieran tener en el desarrollo de resistencia viral de algunas de estas formas genéticas.*

### *3.2.4 Pacientes tratados con DTG*

*De las 32 muestras de pacientes infectados con VIH-1 que entraron a nuestro laboratorio para formar parte de este estudio, seis pacientes estaban siendo tratados con DTG, en el momento en que se recibió la muestra.*

*Como se puede apreciar en la tabla 9 estos pacientes llegaron al estudio con bajos valores de CD4+ (mediana de 194 cel./mm$^3$) y altos valores de CV (mediana de 20 000 copias de ARN/mL). La mediana de los años de infección con VIH-1 y tratamiento era de 17,4 y 14,35, respectivamente.*

*Los ensayos de resistencia ARV realizados a estos pacientes en PR y TI, detectaron virus resistentes a las familias que se emplean en la TARVAE (ITIAN, ITINAN e IPR) y que bloquean estas enzimas virales. Tres de cuatro pacientes tenían además virus multidrogo resistentes (tabla 9).*

*A los pacientes estudiados se les realizó un monitoreo de la terapia mediante la cuantificación de la CV a los tres y a los seis meses de iniciado el mismo (Ver tabla 7). La mediana de la cuantificación de la CV a los tres meses fue de 27 450 copias de ARN/mL. La CV fue indetectable solamente en un paciente. A los seis meses la mediana de la CV fue de 390 000 copias de ARN/mL. No se contó con este valor en un paciente; que coincidentemente era el mismo que a los tres meses tenía una CV indetectable.*

***Tabla 9.*** *Características clínicas, epidemiológicas y virológicas de los pacientes con resistencia a los inhibidores de la integrasa*

| ***Muestras de Pacientes*** | ***Resistencia a PR+TI*** | ***Fecha de entrada al laboratorio*** | ***Fecha en que comenzaron con DTG*** | ***Esquema actual con DTG*** | ***Mutaciones Encontradas en IN*** | ***Subtipo en IN*** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ***1*** | *No se conoce* | *7/11/2017* | *20/10/2017* | *3TC+TDF+DTG* | *Y143YC+V151I+N155H* | *B* |
| ***2*** | *MDR* | *21/3/2018* | *24/10/2017* | *TRUVADA+DTG* | *G140GA+Q148QR+N155H* | *C* |
| ***3*** | *MDR* | *5/4/2018* | *15/10/2017* | *3TC+TDF+DTG* | *T97* +E138K+G140S+Q148H* | *B* |
| ***4*** | *MDR* | *15/5/2018* | *24/8/2016* | *TRUVADA+DTG+DRV/RTV* | *E157Q* +E138K+G140A+Q148K* | *B* |

** La 97A y la 157Q son mutaciones de resistencia a los IIN accesorias*

***Aminoácidos.*** *Y: Tirosina; C: Cisteina; V: Valina; I: Isoleucina; N: Asparagina; H: Histidina; Q: Glutamina; A: Alanina; R: Serina; G: Glicina; T: Treonina; E: Ácido glutámico; K: Lisina.*

*Truvada: TDF+FTC (ITIAN); ITIAN: 3TC, TDF; IPR: DRV/RTV; IIN: DTG*

*De los pacientes que presentaron resistencia a los IIN, uno comenzó el tratamiento con DTG en el año 2016, mientras que los restantes empezaron con este tratamiento en octubre del 2017, como se puede apreciar en la tabla 9. Uno de los que inició tratamiento en el 2017, había recibido con anterioridad RAL. Tres de los pacientes (multirresistentes) fueron tratados con DTG en dosis de 50 mg/día. No conocemos el perfil de resistencia en PR y RT de uno de ellos (ver tabla 9).*

*El ensayo para la detección de resistencia genotípica mostró que de los pacientes que estaban siendo tratados con IIN, cuatro (4/6; 66,7%) portaban virus con mutaciones que confieren resistencia a los inhibidores de la integrasa (figura 14).*

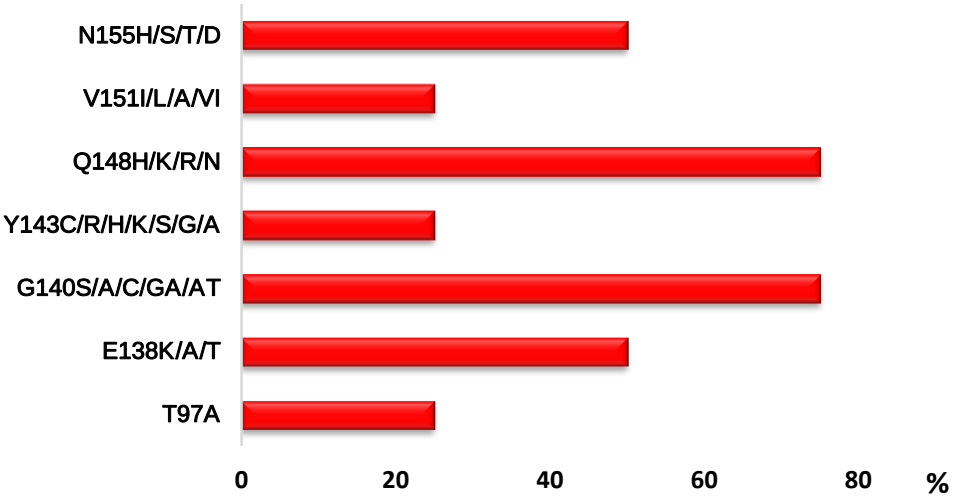



***Figura 14.*** *Frecuencia de las mutaciones virales que confieren resistencia a los inhibidores de la integrasa. Referido según la base de datos Stanford(85)*

*Las mutaciones de resistencia a los IIN detectadas en los pacientes coinciden con las descritas en la literatura por diferentes autores (18, 91) y por las publicadas por la base de Stanford (85). En dos de los cuatro virus aparecen las mutaciones 148K/H, 138K y la 140S/AT (subtipo B), mientras que en otro fue la combinación de la 140GA, 155H y la 138QR (subtipo C) (ver figura 14 y tabla 9). En un último paciente se detectan las mutaciones 155H y la 143YC (subtipo B). Además, encontramos la mutación accesoria 97A, en un paciente.*

*El número de pacientes tratados en nuestro estudio con los IIN era muy pequeño, por lo cual no hacemos comparaciones, en cuanto a frecuencia, con la literatura. Sin embargo, podemos comentar que el paciente que estuvo tratado con RAL (paciente 1), presentó el patrón mutacional característico de este ARV, mientras que los demás presentaron el característico de los que reciben tratamientos con DTG (18). En cuanto*

*a este hecho, nuestros resultados coinciden con los de Sui Yuan y col., los que estudiaron 30 secuencias de pacientes que recibían RAL, como IIN. Diecisiete virus albergaban la mutación Q148H/K/R, ocho la N155H y seis la Y143C/R (100).*

*Al analizar la resistencia por medicamento, encontramos tres pacientes con virus con resistencia alta a los cuatro IIN (Paciente 2, 3 y 4), mientras que otro paciente (paciente 1) tenía resistencia alta al ELV y al RAL y baja al DTG y al BIC, como se observa en la figura 15.*

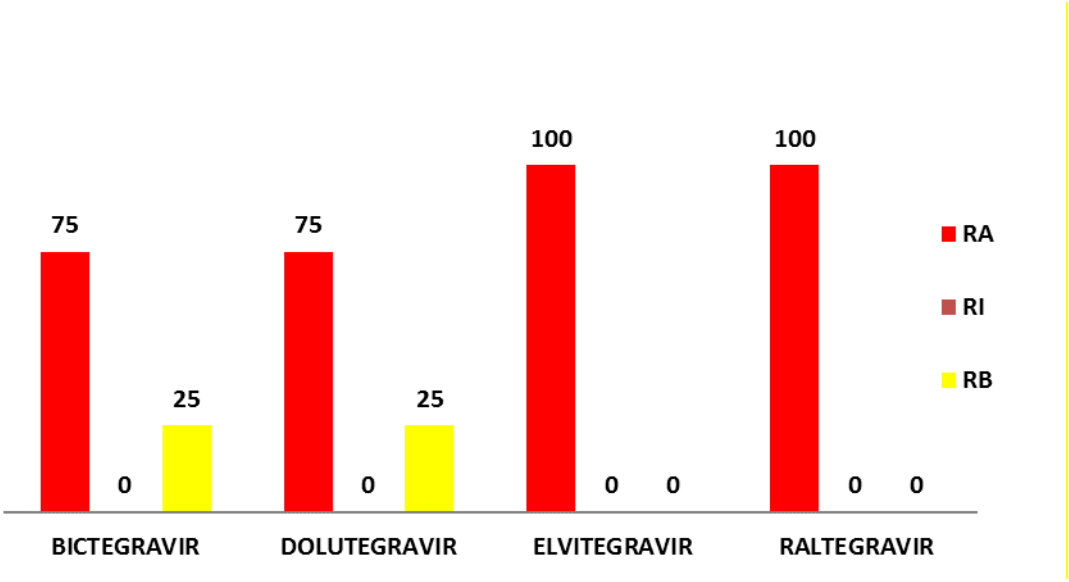



***Figura 15.*** *Frecuencia de los niveles de resistencia a los IIN por medicamentos. Resistencia genotípica a los IIN de acuerdo a la base de Stanford (https://hivdb.stanford.edu/hivdb/by-mutations).*
***Abreviaturas:*** *RB: Resistencia baja. RI: resistencia intermedia. RA: resistencia alta.*

*Como se aprecia en la tabla 9 el paciente uno (1), infectado con el subtipo B de VIH-1 muestra resistencia alta al RAL y al ELV, conferida por la presencia de la mutación Y143C, que se selecciona en pacientes que reciben terapias con RAL. Esta mutación reduce la susceptibilidad al RAL, sin embargo, tiene efectos mínimos sobre la susceptibilidad a EVG. Ella no afecta al DTG o BIC. La N155H es una mutación seleccionada en pacientes que reciben RAL, EVG y rara vez DTG (101).*

*Según lo reportado en la literatura la resistencia al RAL está relacionada con la aparición de mutaciones de forma combinada en tres patrones diferentes: N155H-E92Q o Q148H/R/K-G140S/A o la Y143C/R. El EVG comparte dos rutas de mutaciones con el RAL: N155H- E92Q y la Q148H/R/K-G140S/A. A diferencia del RAL y ELV se requieren de múltiples mutaciones para observar una resistencia clínicamente significativa a DTG: 148H/K/R/N+138K/A/T+140S/A/C. La resistencia*

*cruzada entre RAL y EVG se observa sobre la base de mutaciones en las posiciones 155 y 148. El DTG no suele verse comprometido por mutaciones en la posición 155, pero se ve afectado por mutaciones en la posición 148 (18).*

*En pacientes con fracaso virológico, previamente tratados con IIN de primera generación, la actividad del DTG dependerá de la vía de resistencia tomada por el virus. El mayor impacto en la efectividad del DTG se presenta por la mutación Q148X, en asociación con una o más mutaciones adicionales. En pacientes que presentan fracaso virológico al tratamiento con RAL se han encontrado virus con resistencia a DTG, del 13,9% a 35% de los pacientes, principalmente por la presencia de la Q148H/R/K en combinación con mutaciones adicionales, más frecuentemente la G140S (18).*

*Por esta razón y teniendo en cuenta que la resistencia alta al DTG requiere de la aparición de múltiples mutaciones a los IIN de primera generación, la pronta modificación de un esquema en fracaso con estos ARV podría prevenir la acumulación de mutaciones adicionales con el fin de mantener la actividad del DTG (102).*

*El segundo paciente estaba infectado con un virus del subtipo C y tiene resistencia alta a toda la familia de los IIN. Presenta la combinación de las mutaciones 140GA, 148QR y la 155H, coincidiendo con los resultados publicados por el estudio VIKING (96).*

*Las sustituciones en la posición 148 de la enzima se pueden presentar tempranamente en el tratamiento y de forma aislada, impactando de manera importante en la capacidad replicativa viral, por lo cual es rápidamente compensado con mutaciones de resistencia secundarias (102).*

*La sustitución de N por H en la posición 155 de la IN viral parece tener un efecto menos nocivo en términos de la replicación viral y como tal, se observa conjuntamente con una o dos sustituciones secundarias adicionales. Estas mutaciones secundarias son, por ejemplo, L74M, E92Q, T97A, Y143H, G163K/R, V151I y D232N, sin definir un patrón predominante. Las mutaciones en la posición 155 a menudo se seleccionan tempranamente durante la terapia y luego son reemplazadas gradualmente por cambios en las posiciones Y143 o Q148. Esto puede deberse a los altos niveles de resistencia conferidos por las mutaciones 143/148 en comparación con N155H. In vitro se ha observado en pacientes vírgenes de tratamiento, menos frecuentemente (<1%), la sustitución N155S/T que reducen la susceptibilidad a RAL y EVG, lo que*

*probablemente implica mejor transmisibilidad que los virus que presentan la N155H (102).*

*El tercer y cuarto paciente, ambos con virus del subtipo B en el gen de interés, tienen resistencia alta a todos los IIN. En uno de ellos (Paciente 3), además se encontró la T97A, mutación accesoria polimórfica que, según el subtipo, se puede presentar en los virus de pacientes no tratados entre el 1% y el 5%. Aparece en pacientes tratados con RAL y EVG. Sola, tiene efectos mínimos sobre la susceptibilidad a los IIN pero en combinación con otras mutaciones de resistencia, reduce sinérgicamente la susceptibilidad a EVG, RAL, DTG y posiblemente al BIC (102).*

*La E138K es una mutación que se desarrolla en pacientes que reciben RAL, EVG y DTG. Suelen aparecer en combinación con la mutación 148H/K/R/N. Sola no reduce la susceptibilidad a los IIN. Sin embargo, cuando ocurren en combinación con los cambios aa descritos en esta posición con la mutación Q148, provoca resistencia alta al RAL y EVG e intermedia al DTG y BIC (102).*

*En nuestro estudio encontramos tres virus con resistencia al BIC, último medicamento de esta familia en aparecer en el mercado. Un estudio in vitro se demostró la disminución de la susceptibilidad tras la aparición de las mutaciones M50I/R263K. Así mismo, en estudios in vitro se ha observado resistencia cruzada entre los IIN, en virus con una sola sustitución de resistencia en las posiciones E92Q, T97A, Y143C/R, Q148R y N155H y se encontró susceptibilidad reducida al BIC. Las sustituciones de G140A/C/S y Q148H/R/K usualmente asociadas a otras mutaciones adicionales como L74M, T97A o E138A/K, mostraron reducción de la susceptibilidad al BIC (102).*

*La mayoría de los autores recomiendan el uso de DTG a dosis de 50 mg diarios en adultos que no han estado expuestos previamente a otros IIN y no requiere el uso de un agente de refuerzo para mantener concentraciones diarias duraderas y eficaces. Deben considerarse dos escenarios con respecto a las personas con experiencia en el tratamiento y la ocurrencia de resistencia contra DTG. Primero, personas que han sido expuestas a otros IIN y han pasado a un segundo esquema en el que está incluido el DTG. En este caso después de fallar previamente RAL o EVG, han desarrollado nuevas mutaciones de resistencia relacionadas con IIN. Se plantea que a pesar de que en estos casos la dosis del DTG se duplicó, ocurrió el fracaso terapéutico, debido a la preexistencia de mutaciones a los IIN que confieren resistencia cruzada entre cada uno de los IIN (DTG, RAL y EVG) (102).*

*El segundo escenario en el que DTG se ha utilizado para tratar a personas con experiencia en el tratamiento ha involucrado a pacientes que habían fallado a múltiples medicamentos pero que nunca antes habían sido tratados con un IIN. En este escenario, la probabilidad de éxito terapéutico con DTG es mayor que en pacientes con experiencia en RAL o EVG, probablemente porque no se esperaría que estos pacientes posean mutaciones relacionadas con IIN (103).*

*El trabajo desarrollado permitió la normalización de un ensayo de RCP casero para detección de resistencia a los IIN, el que logró la amplificación de algunos de los subtipos puros que circulan en la epidemia cubana con bajos valores de CV y así como algunos de los recombinantes en el orden de las 1 000 copias de ARN/mL. Sin embargo, se necesita mejorar el reconocimiento de la región a amplificar por el cebador en los recombinantes 18 cubanos. Su empleo en la práctica clínica nos permitió la detección de polimorfismos en el gen que codifica para la IN viral, los que se cuantificaron con altas frecuencias en algunos de los subtipos virales, por lo cual deben ser cuidadosamente estudiados, en cuanto a posibles implicaciones en el éxito de las terapias que combinen esta nueva familia de ARVs. La resistencia observada en pacientes tratados estuvo relacionada con el empleo de combinaciones sub óptimas.*

## ***Conclusiones***

*El método de RCP-secuenciación casero para determinar resistencia a los inhibidores de la integrasa del VIH-1, fue capaz de detectar todos los subtipos virales que circulan en la epidemia cubana, siendo más eficiente para subtipos puros que para los recombinantes.*

*Los subtipos encontrados en la región de integrasa coincidieron en su mayoría con los subtipos de la región de proteasa y transcriptasa inversa.*

*El Dolutegravir puede ser empleado como terapia de rescate, debido a que en población no tratada con esta familia no se detectaron mutaciones de resistencia a los inhibidores de la integrasa.*

*El empleo de esquemas sup-óptimos con Dolutegravir en pacientes con resistencia múltiple pudiera inducir un fallo terapéutico temprano.*

## ***Recomendaciones***

*Diseñar nuevos cebadores que permitan mejorar el límite inferir de amplificación de la variante cubana CRF18_cpx, haciendo la RCP más eficiente para la detección de la misma.*

*Continuar el monitoreo de los pacientes con multifallo y tratados con DTG como terapia de rescate.*

*Monitorear a los pacientes que inician DTG como terapia de primera línea para conocer los perfiles de mutaciones de resistencia en esta población.*

## ***Bibliografía***


1. Kuritzkes DR, A.Koup R. HIV-1: Pathogenesis, Clinical, Manifestations, and Treatment. In: Knipe DM, Howley PM, editors. Fields Virology. II. 5th ed: Lippincott Williams & Wilkins; 2014. p. 2108-85.
2. CDC CfDCaP. Pneumocystis pneumonia--Los Angeles. MMWR Morbidity and mortality weekly report. 1981;40:250-2.
3. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science (New York, NY). 1983;220(4599):868-71.
4. Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, Shearer GM, Kaplan M, Haynes BF, et al. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. Science (New York, NY). 1984;224(4648):500-3.
5. Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA, Carr JK, Foley B, Funkhouser RK, et al. HIV-1 nomenclature proposal. Science (New York, NY). 2000;288(5463):55-6.
6. Clavel F, Guyader M, Guetard D, Salle M, Montagnier L, Alizon M. Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2. Nature. 1986;324(6098):691-5.
7. ONUSIDA. El SIDA en cifras. 2017.
8. Plantier JC, Djemai M, Lemee V, Reggiani A, Leoz M, Burc L, et al. Census and analysis of persistent false-negative results in serological diagnosis of human immunodeficiency virus type 1 group O infections. Journal of clinical microbiology. 2009;47(9):2906-11.
9. Kuiken C, Korber B, Shafer RW. HIV sequence databases. AIDS reviews. 2003;5(1):52-61.
10. Taylor BS, Sobieszczyk ME, McCutchan FE, Hammer SM. The challenge of HIV-1 subtype diversity. The New England journal of medicine. 2008;358(15):1590-602.
11. Rolo FM, Miranda L, Wainberg MA, Gu Z, Lobaina L, Noa E, et al. Envelope V3 region sequences of Cuban HIV-1 isolates. Journal of acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology : official publication of the International Retrovirology Association. 1995;9(2):123-5.
12. Gomez CE, Iglesias E, Perdomo W, Rolo F, Blanco M, Lobaina L, et al. Isolates from four different HIV type 1 clades circulating in Cuba identified by DNA sequence of the C2-V3 region. AIDS research and human retroviruses. 2001;17(1):55-8.
13. Cuevas MT, Ruibal I, Villahermosa ML, Diaz H, Delgado E, Parga EV, et al. High HIV-1 genetic diversity in Cuba. AIDS (London, England). 2002;16(12):1643-53.
14. Machado LY, Blanco M, Lo´pez çLS, Dı´az HcM, Dubed M, Valde´s N, et al. National survey of pre-treatment HIV drug resistance in Cuban patients. PloS one. 2019; 14(9).
15. Friedland G. FDA approves d4T as alternative to AZT, ddI, or ddC. Food and Drug Administration. AIDS clinical care. 1995;7(1):4, 10.
16. Gupta RK, Jordan MR, Sultan BJ, Hill A, Davis DH, Gregson J, et al. Global trends in antiretroviral resistance in treatment-naive individuals with HIV after rollout of antiretroviral treatment in resource-limited settings: a global collaborative study and meta-regression analysis. Lancet. 2012;380(9849):1250-8.
17. InfoSida. https://infosida.nih.gov/understanding-hiv-aids2019 [updated 18/9/2019; cited 2019 Septiembre 2019].
18. Hazuda DJ. Resistencia a los inhibidores de la integración del Virus de la Inmunodeficiencia Humana Tipo I. Actualizaciones EN SIDA. 2010;18(70):135-41.
19. Dirección Nacional de Epidemiología M. Base Nacional de Datos de la Infección por VIH. 2018.
20. Alemán-Campos Y, Kourí-Cardellá V, Pérez-Santos L, Fonseca-Gómez C, Pérez-Avila J, Ortega-Gonzáles LM, et al. HIV-1 Antiretroviral Resistance in Cuba, 2009–2014

MEDICC review. 2018;20(3).
21. V K, Y A, L P, Y M, J P, M F, et al. Surveillance of HIV-1 subtype and antiretroviral resistance in Cuban individuals failing therapy during 2009-2016. Journal of the International AIDS Society 2017. 2017;20((Supl 2)
): 41-2.
22. Popovic M, Sarngadharan MG, Read E, Gallo RC. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. Science (New York, NY). 1984;224(4648):497-500.
23. Sarngadharan MG, DeVico AL, Bruch L, Schupbach J, Gallo RC. HTLV-III: the etiologic agent of AIDS. Princess Takamatsu symposia. 1984;15:301-8.
24. Freed EO, Martin A. HIVs and Their Replication. In: Knipe D, Howley P, editors. Fields Virology. II. 5th ed. Filadelfia: Lippincott Williams & Wilkins; 2014. p. 2108-87.
25. Speck RF, Wehrly K, Platt EJ, Atchison RE, Charo IF, Kabat D, et al. Selective employment of chemokine receptors as human immunodeficiency virus type 1 coreceptors determined by individual amino acids within the envelope V3 loop. Journal of virology. 1997;71(9):7136-9.
26. Nelson JAE, Baribaud F, Edwards T, Swanstrom R. Patterns of Changes in Human Immunodeficiency Virus Type 1 V3 Sequence Populations Late in Infection. Journal of virology. 2000;74(18):8494-501.
27. Haseltine WA, Wong-Staal F. The molecular biology of the AIDS virus. Scientific American. 1988;259(4):52-62.
28. Coffin JM. HIV viral dynamics. AIDS (London, England). 1996;10 Suppl 3:S75-84.
29. Lawson VA, Oelrichs R, Guillon C, Imrie AA, Cooper DA, Deacon NJ, et al. Adaptive changes after human immunodeficiency virus type 1 transmission. AIDS research and human retroviruses. 2002;18(8):545-56.
30. Farber JM, Berger EA. HIV's response to a CCR5 inhibitor: I'd rather tighten than switch! Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2002;99(4):1749-51.
31. Pantaleo G, Graziosi C, Demarest JF, Butini L, Montroni M, Fox CH, et al. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. Nature. 1993;362(6418):355-8.
32. Wei X, Ghosh SK, Taylor ME, Johnson VA, Emini EA, Deutsch P, et al. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. Nature. 1995;373(6510):117-22.
33. Ho DD. Therapy of HIV infections: problems and prospects. Bulletin of the New York Academy of Medicine. 1996;73(1):37-45.
34. Korenromp EL, Williams BG, Schmid GP, Dye C. Clinical prognostic value of RNA viral load and CD4 cell counts during untreated HIV-1 infection--a quantitative review. PloS one. 2009;4(6):e5950.
35. Holland JJ, De La Torre JC, Steinhauer DA. RNA virus populations as quasispecies. Curr Top Microbiol Immunol. 1992;176:1-20.
36. Domingo E, Holland JJ. RNA virus mutations and fitness for survival. Annu Rev Microbiol. 1997;51:151-78.
37. Najera R, Delgado E, Perez-Alvarez L, Thomson MM. Genetic recombination and its role in the development of the HIV-1 pandemic. AIDS (London, England). 2002;16 Suppl 4:S3-16.
38. 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. Progress in drug research Fortschritte der Arzneimittelforschung Progres des recherches pharmaceutiques. 2001;57:77-115.
39. Suzuki Y. [HIV pathogenesis and intrinsic cellular defense mechanisms]. Nippon rinsho Japanese journal of clinical medicine. 2010;68(3):415-21.
40. Taylor BS, Hammer SM. The challenge of HIV-1 subtype diversity. N Engl J Med. 2008;359(18):1965-6.

41. Clavel F, Hoggan MD, Willey RL, Strebel K, Martin MA, Repaske R. Genetic recombination of human immunodeficiency virus. Journal of virology. 1989;63(3):1455-9.
42. Thomson MM, Najera R. Molecular epidemiology of HIV-1 variants in the global AIDS pandemic: an update. AIDS reviews. 2005;7(4):210-24.
43. Osmanov S, Pattou C, Walker N, Schwardlander B, Esparza J. Estimated global distribution and regional spread of HIV-1 genetic subtypes in the year 2000. Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999). 2002;29(2):184-90.
44. Moutouh L, Corbeil J, Richman DD. Recombination leads to the rapid emergence of HIV-1 dually resistant mutants under selective drug pressure. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1996;93(12):6106-11.
45. Carvajal-Rodriguez A, Crandall KA, Posada D. Recombination favors the evolution of drug resistance in HIV-1 during antiretroviral therapy. Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases. 2007;7(4):476-83.
46. Hemelaar J, Elangovan R, Yun J, Dickson-Tetteh L, Fleminger I, Kirtley S, et al. Global and regional molecular epidemiology of HIV-1, 1990-2015: a systematic review, global survey, and trend analysis. The Lancet infectious diseases. 2019;19(2):143-55.
47. Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S. Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000–2007. AIDS. 2011;25(5):679-89.
48. Blanco M, Rolo F, Martínez N, Gessa A, Díaz HM, Lubian AL. Aplicación del ensayo de Movilidad del Heteroduplex en los estudios de epidemiología molecular del VIH-1 en Cuba. Biotecnología Aplicada. 2001;18:149-53.
49. Thomson MM, Casado G, Posada D, Sierra M, Najera R. Identification of a novel HIV-1 complex circulating recombinant form (CRF18_cpx) of Central African origin in Cuba. AIDS. 2005;19(11):1155-63.
50. Casado G, Thomson MM, Sierra M, Najera R. Identification of a novel HIV-1 circulating ADG intersubtype recombinant form (CRF19_cpx) in Cuba. Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999). 2005;40(5):532-7.
51. Perez L, Thomson MM, Bleda MJ, Aragones C, Gonzalez Z, Perez J, et al. HIV Type 1 molecular epidemiology in cuba: high genetic diversity, frequent mosaicism, and recent expansion of BG intersubtype recombinant forms. AIDS research and human retroviruses. 2006;22(8):724-33.
52. Arts EJ, Hazuda DJ. HIV-1 Antiretroviral Drug Therapy. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. 2012;2(4).
53. Conan K. Woods CJB, Tommy F. Liu, Celia K. S. Chui, Anna L. Chu, Brian Wynhoven, Tom A. Hall, Christina Trevino, Robert W. Shafer and P. Richard Harrigana. Automating HIV Drug Resistance Genotyping with RECall, a Freely Accessible Sequence Analysis Tool. Journal of Clinical Microbiology. 2012;50:1936–42.
54. Tang MW, Shafer RW. HIV-1 Antiretroviral Resistance: Scientific Principles and Clinical Applications. Drugs. 2012;72(9):e1-e25.
55. Coffin JM. HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. Science (New York, NY). 1995;267(5197):483-9.
56. Levy DN, Aldrovandi GM, Kutsch O, Shaw GM. Dynamics of HIV-1 recombination in its natural target cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2004;101(12):4204-9.
57. Keele BF, Giorgi EE, Salazar-Gonzalez JF, Decker JM, Pham KT, Salazar MG, et al. Identification and characterization of transmitted and early founder virus envelopes in primary HIV-1 infection. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2008;105(21):7552-7.
58. Perelson AS, Ribeiro RM. Modeling the within-host dynamics of HIV infection. BMC Biology. 2013;11:96.

59. Larder BA. Interactions between drug resistance mutations in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. The Journal of general virology. 1994;75 ( Pt 5):951-7.
60. Melikian GL, Rhee SY, Taylor J, Fessel WJ, Kaufman D, Towner W, et al. Standardized comparison of the relative impacts of HIV-1 reverse transcriptase (RT) mutations on nucleoside RT inhibitor susceptibility. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2012;56(5):2305-13.
61. Melikian GL, Rhee SY, Varghese V, Porter D, White K, Taylor J, et al. Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI) cross-resistance: implications for preclinical evaluation of novel NNRTIs and clinical genotypic resistance testing. The Journal of antimicrobial chemotherapy. 2014;69(1):12-20.
62. Rhee SY, Taylor J, Fessel WJ, Kaufman D, Towner W, Troia P, et al. HIV-1 protease mutations and protease inhibitor cross-resistance. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2010;54(10):4253-61.
63. Whitcomb JM, Huang W, Limoli K, Paxinos E, Wrin T, Skowron G, et al. Hypersusceptibility to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors in HIV-1: clinical, phenotypic and genotypic correlates. AIDS (London, England). 2002;16(15):F41-7.
64. Charest H, Doualla-Bell F, Cantin R, Murphy DG, Lemieux L, Brenner B, et al. A significant reduction in the frequency of HIV-1 drug resistance in Quebec from 2001 to 2011 is associated with a decrease in the monitored viral load. PloS one. 2014;9(10):e109420.
65. Gupta RK, Hill A, Sawyer AW, Cozzi-Lepri A, von Wyl V, Yerly S, et al. Virological monitoring and resistance to first-line highly active antiretroviral therapy in adults infected with HIV-1 treated under WHO guidelines: a systematic review and meta-analysis. The Lancet infectious diseases. 2009;9(7):409-17.
66. VANEGAS-OTÁLVARO D, ACEVEDO-SÁENZ L, DÍAZ-CASTRILLÓN FJ, VELILLA-HERNÁNDEZ PA. Resistencia a antirretrovirales: bases moleculares e implicaciones farmacológicas. CES MEDICINA. 2014;28(1).
67. Hazuda DJ. Resistance to inhibitors of the human immunodeficiency virus type 1 integration. The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases. 2010;14(5):513-8.
68. Clutter DS, Jordan MR, Bertagnolio S, Shafer RW. HIV-1 drug resistance and resistance testing. Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases. 2016.
69. Rhee SY, Blanco JL, Jordan MR, Taylor J, Lemey P, Varghese V, et al. Geographic and temporal trends in the molecular epidemiology and genetic mechanisms of transmitted HIV-1 drug resistance: an individual-patient- and sequence-level meta-analysis. PLoS medicine. 2015;12(4):e1001810.
70. Cortez KJ, Maldarelli F. Clinical Management of HIV Drug Resistance. Viruses. 2011;3(4):347-78.
71. ONUSIDA. VIGILANCIA DE LA FARMACORRESISTENCIA DEL VIH EN ADULTOS QUE RECIBEN TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL (FARMACORRESISTENCIA ADQUIRIDA DEL VIH). 2014.
72. Petropoulos CJ, Parkin NT, Limoli KL, Lie YS, Wrin T, Huang W, et al. A novel phenotypic drug susceptibility assay for human immunodeficiency virus type 1. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2000;44(4):920-8.
73. Whitcomb JM, Parkin NT, Chappey C, Hellmann NS, Petropoulos CJ. Broad nucleoside reverse-transcriptase inhibitor cross-resistance in human immunodeficiency virus type 1 clinical isolates. The Journal of infectious diseases. 2003;188(7):992-1000.
74. Shafer RW, Jung DR, Betts BJ, Xi Y, Gonzales MJ. Human immunodeficiency virus reverse transcriptase and protease sequence database. Nucleic acids research. 2000;28(1):346-8.
75. Rhee SY, Sankaran K, Varghese V, Winters MA, Hurt CB, Eron JJ, et al. HIV-1 Protease, Reverse Transcriptase, and Integrase Variation. Journal of virology. 2016;90(13):6058-70.

76. Jabara CB, Jones CD, Roach J, Anderson JA, Swanstrom R. Accurate sampling and deep sequencing of the HIV-1 protease gene using a Primer ID. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2011;108(50):20166-71.
77. Zhou S, Jones C, Mieczkowski P, Swanstrom R. Primer ID Validates Template Sampling Depth and Greatly Reduces the Error Rate of Next-Generation Sequencing of HIV-1 Genomic RNA Populations. Journal of virology. 2015;89(16):8540-55.
78. A A, M A, A M, R C, W A. Resistencia primaria a terapia antirretroviral en pacientes con infeccion por VIH/SIDA en Chile. Revista medica de Chile. 2005;133(3):295-301.
79. SA A, OA G. Resistencia a la terapia antiretroviral en la infeccion por virus de inmunodeficiencia humana. Revista chilena de infectología. 2011;28(5):461-9(5):461-9.
80. DATABASE S. Mutation Prevalence According to Subtype and Treatment 2019 [cited 2019].
81. Laethema KV, Schrootena Y, Covensa K, Dekeersmaekera N, Munterc PD, Wijngaerdenc EV, et al. A genotypic assay for the amplification and sequencing of integrase from diverse HIV-1 group M subtypes. Journal of virological methods. 2008;153 176–81.
82. Pineda-Pena AC, Faria NR, Imbrechts S, Libin P, Abecasis AB, Deforche K, et al. Automated subtyping of HIV-1 genetic sequences for clinical and surveillance purposes: performance evaluation of the new REGA version 3 and seven other tools. Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases. 2013;19:337-48.
83. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular biology and evolution. 2011;28(10):2731-9.
84. Lole KS, Bollinger RC, Paranjape RS, Gadkari D, Kulkarni SS, Novak NG, et al. Full-Length Human Immunodeficiency Virus Type 1 Genomes from Subtype C-Infected Seroconverters in India, with Evidence of Intersubtype Recombination. Journal of virology. 1999;73(1):152-60.
85. DATABASE S. Major Integrase Inhibitor (INSTI) Resistance Mutations 2019 [cited 2019].
86. ONUSIDA. ABORDAJE DE LA FARMACORRESISTENCIA DEL VIH: TENDENCIAS, DIRECTRICES Y ACCIÓN MUNDIAL. 2017.
87. Salud OMdl. VIGILANCIA DE LA FARMACORRESISTENCIA DEL VIH EN ADULTOS QUE RECIBEN TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL (FARMACORRESISTENCIA ADQUIRIDA DEL VIH). 2014.
88. Kouri V, Aleman Y, Perez L, Perez J, Fonseca C, Correa C, et al. High frequency of antiviral drug resistance and non-B subtypes in HIV-1 patients failing antiviral therapy in Cuba. Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology. 2012;55(4):348-55.
89. Machado LY, Dubed M, Diaz H, Ruiz N, Romay D, Valdes N, et al. Transmitted HIV type 1 drug resistance in newly diagnosed Cuban patients. AIDS research and human retroviruses. 2013;29(2):411-4.
90. Snedecor SJ, Radford M, Kratochvil D, Grove R, Punekar YS. Comparative efficacy and safety of dolutegravir relative to common core agents in treatment-naive patients infected with HIV-1: a systematic review and network meta-analysis. 2019;19(1):484.
91. Wallis CL, Viana RV, Saravanan S, Silva de Jesus C, Zeh C, Halvas EK, et al. Performance of Celera RUO integrase resistance assay across multiple HIV-1 subtypes. Journal of virological methods. 2017;241:41-5.
92. Machado LY, Pintos Y, Díaz HM, Pérez L, Blanco M, Kourí V, et al. Increase of Recombinant forms CRF20, 23, 24_BG and Several URF of HIV-1 among Newly Diagnosed Cuban Patients: 2013-2014. ARC Journal of AIDS. 2017;2(1):24-31.
93. Sierra M, Thomson MM, Posada D, Perez L, Aragones C, Gonzalez Z, et al. Identification of 3 phylogenetically related HIV-1 BG intersubtype circulating recombinant forms in Cuba. Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999). 2007;45(2):151-60.

94. Burns CC, Gleason LM, Mozaffarian A, Giachetti C, Carr JK, Overbaugh J. Sequence variability of the integrase protein from a diverse collection of HIV type 1 isolates representing several subtypes. AIDS research and human retroviruses. 2002;18(14):1031-41.
95. Fantauzzi A, Mezzaroma I. Dolutegravir: clinical efficacy and role in HIV therapy. Therapeutic Advances in Chronic Disease. 2014;5(4):164-77.
96. Taha H, Das A, Das S. Clinical effectiveness of dolutegravir in the treatment of HIV/AIDS. Infection and Drug Resistance 2015:8 339–352. 2015;8:339-52.
97. Santoro MM, Perno CF. HIV-1 Genetic Variability and Clinical Implications. ISRN Microbiology. 2013;2013.
98. Rogers L, Obasa AE, Jacobs GB, Sarafianos SG, Sönnerborg A, Neogi U, et al. Structutal implications of genotypic variations in HIV-1 integrase from diverse subtypes. Frontiers in microbiology. 2018;9.
99. Saladini F, Meini G, Bianco C, Monno L, Punzi G, Pecorari M, et al. Prevalence of HIV-1 integrase mutations related to resistance to dolutegravir in raltegravir naive and pretreated patients. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2012;18(10):E428-30.
100. Chang SY, Lin PH, Cheng CL, Chen MY, Sun HY, Hsieh SM, et al. Prevalence of Integrase Strand Transfer Inhibitors (INSTI) Resistance Mutations in Taiwan. Scientific reports. 2016;6:35779.
101. Doyle T, Dunn DT, Ceccherini-Silberstein F, De Mendoza C, Garcia F, Smit E, et al. Integrase inhibitor (INI) genotypic resistance in treatment-naive and raltegravir-experienced patients infected with diverse HIV-1 clades. The Journal of antimicrobial chemotherapy. 2015;70(11):3080-6.
102. Anstett K, Brenner B, Mesplede T, Wainberg MA. HIV drug resistance against strand transfer integrase inhibitors. Retrovirology. 2017.
103. Mesplède T, Raffi F, Wainberg MA. Es posible que se genere resistencia al dolutegravir cuando se utiliza este agente en el tratamiento de primera líne. Actualizaciones EN SIDA E INFECTOLOGÍA. 2014;22(85):47-52.

**ANEXO I**

**FORMA DE CONSENTIMIENTO**

*Este formato consta de 2 partes:*

1. *Hoja Informativa (para compartir información del estudio)*
2. *Certificado de Consentimiento (para ser firmado si desea participar)*

## PARTE I: HOJA INFORMATIVA

**(Propósito):** *La OMS, ONUSIDA, así como las Guías clínicas sobre el uso de medicamentos contra la infección por VIH, en adultos y adolescentes, recomiendan que las personas seropositivas comiencen el tratamiento antirretroviral desde su diagnóstico. Sin embargo, debido a que la terapia no es capaz de erradicar el virus del organismo, se necesita que el tratamiento sea de por vida. Existen muchos factores que pueden producir un impacto negativo en el éxito del tratamiento a corto o largo plazo, como son: la adherencia imperfecta, el uso de regímenes de tratamiento con dosis subóptimas, debido a interacciones farmacológicas entre las drogas o la pre-existencia de resistencia viral frente a la droga (debido a transmision de un virus resistente). El fallo de la terapia resultará en un incremento en la carga viral y desarrollo de resistencia ARV, una de las principales causas de fallo de los regímenes de tratamiento. Es una necesidad para los países de bajos ingresos conocer la utilidad de las terapias que emplea, el poder concentrar sus recursos en necesidades reales y en poder solucionar sus problemas.*

*La TARVAE comenzó en Cuba en el año 2001, empleando medicamentos genéricos cubanos. Estudios realizados 2 años después del inicio de la misma, demostraron bajos niveles de resistencia, así como la circulación de diferentes formas genéticas recombinantes de VIH-1 en Cuba, las cuáles han ido aumentando progresivamente. Sin embargo, los estudios realizados actualmente en población no tratada cubana refuerzan la necesidad de mantener estudios de vigilancia de resistencia, y exponen el comprometimiento de las terapias de primera línea que se emplean en el país. Los estudios en pacientes tratados, mostraron altos nivel de resistencia y de multiresistencia a todas las familias de ARVs (MDR) y a cada una de ellas por separado (FCR). Para este grupo de pacientes, en los que se ve comprometida la respuesta a la terapia de primera y segunda línea que utiliza Cuba, el país decidió comprar antivirales de última generación, como los inhibidores de la integrasa y los antagonistas de los correceptores; que no forman parte de nuestros esquemas y que se adquiere a través del Fondo Mundial. El objetivo del presente proyecto es determinar la prevalencia de resistencia primaria y secundaria a los inhibidores de la integrasa en una muestra de pacientes cubanos infectados con el virus de inmunodeficiencia humana.*

**(Beneficios):** *Teniendo en cuenta que una de las prioridades del Sistema de Salud cubano es la atención integral al PVVIH, el presente estudio posibilitará el seguimiento adecuado de este grupo de pacientes que se incorporan a una nueva línea terapéutica. Por otro lado, el médico deberá contar con un nuevo soporte de laboratorio que le permitirá el seguimiento adecuado del paciente. Nos permitirá conocer la prevalencia de resistencia viral a esta nueva familia y su frecuencia de distribución en los diferentes subtipos virales que circulan en la epidemia cubana. Además, permitirá elevar el nivel científico de nuestras instituciones, al contar con el equipamiento adecuado y con el personal entrenado en el análisis de las pruebas de resistencia a este nuevo grupo farmacológico.*

**(Procedimiento***): A todo paciente que cumpla con los criterios de inclusión, se le realizará una toma de sangre venosa en tubos de 10 mL con anticoagulante al tiempo cero (sin haber comenzado la terapia con inhibidores de la integrasa) y de ser necesario una segunda extracción (carga viral detectable a los 3 o 6 meses de iniciado en tratamiento).*

*(***Quienes están incluidos en el estudio):** *Pacientes con diagnósticos de infección por VIH-1, mayores de 18 años al momento del estudio, en el período de tiempo comprendido entre enero del 2018 a enero del 2020; que hayan consentido en participar en el estudio, cuya carga viral al momento de la toma de muestra sea mayor de 1000 copias/mL y que hayan sido tributarios de recibir inhibidores de la integrasa (tener en patrón de resistencia múltiple a las drogas empeladas en la terapia de primera y segunda línea cubana). La toma de la muestra será única, antes del comienzo de la terapia con inhibidores de la integrasa y en el momento que se sospeche una falla terapéutica.*

*Los pacientes incluidos en el estudio deberán ser monitoreados mediante la determinación de la carga viral plasmática y el conteo de linfocitos T CD4 cada tres o seis meses para garantizar el correcto accionar de la terapia o su fallo.*

*Los criterios para ser excluidos:*

*No voluntariedad*

*Pacientes cuyas muestras no hayan sido extraídas y conservadas inadecuadamente (sangre coagulada o cantidad insuficiente).*

*(***Confidencialidad y privacidad)***: Los médicos de asistencia de cada paciente tendrán acceso a los datos personales y registros de los resultados de la investigación de los pacientes que cada uno atiende, no al resto. Toda la información referida a usted, aunque puede ser revisada por otros investigadores, autoridades hospitalarias y regulatorias estatales, no se hará pública en ningún caso. Su identidad no será revelada en ninguna publicación científica y se identificará a través de un código de identificación.*

*Las encuestas se guardarán en la oficina del Responsable principal del proyecto y se destruirán después de cinco años de concluido el mismo por el personal del equipo.*

*(***Cuáles son sus derechos como participantes)**

*Ud. debe recibir periódicamente información acerca de sus resultados y la conducta a seguir. Además de las conclusiones a las que se arriben al final de estudio.*

*Le reiteramos que puede abandonar el estudio cuando lo desee, sin dar explicaciones por ello, y sin afectar los cuidados posteriores que deba recibir.*

*¿Tiene alguna duda o pregunta hasta aquí?*

*(***Participación voluntaria)** *Su participación es voluntaria; pero si no quiere participar en este estudio puede detener la entrevista en cualquier momento. Si tiene alguna pregunta puede realizarla ahora o en cualquier momento también. Al finalizar la entrevista responderé a todas sus preguntas. Si quiere saber más del estudio después de que nos vayamos, puede contactar a las siguientes personas:*

*1. Responsable: __Lissette Pérez Santos_(Investigador principal del proyecto)_____*

*Teléfono y dirección: 255-3551. Instituto Pedro Kourí. Autopista Novia del Mediodía km 6 ½. La Lisa*

*2. Co-Responsable: ___Yanet Pintos Saavedra (Investigador del proyecto)_____*

*Teléfono y dirección: 255-3551. Instituto Pedro Kourí. Autopista Novia del Mediodía km 6 ½. La Lisa*

**PARTE II: CERTIFICADO DE CONSENTIMIENTO**

*Se me ha informado que el propósito de la investigación titulada "Prevalencia de resistencia primaria y secundaria del VIH-1 a los Inhibidores de la integrasa", es la determinación de las mutaciones en el segmento del gen que codifica para la integrasa viral, así como la determinación de la resistencia a los inhibidores de la integrasa. El estudio será llevado a cabo en un periodo de tres años y para ello se necesitará de una a dos extracciones de sangre. Se realizará una extracción inicial (antes de comenzar el tratamiento con inhibidores de la integrasa viral) de cada paciente y de sospecharse una falla terapéutica, se llevará a cabo la segunda extracción. Este procedimiento se hará en presencia de monitoreo médico. La extracción de la sangre será realizada en el laboratorio clínico de nuestra Institución, por personal autorizado y con experiencia en ese menester, y cumpliendo todas las normas éticas y de bioseguridad. La muestra de sangre obtenida para el estudio no será empleada para realizar ningún otro estudio, ni prueba que no sea lo estrictamente estipulado en el presente proyecto.*

*Se me ha informado que los riesgos de participar en el estudio son mínimos y se refieren a aquellas situaciones incomodas que resultan de la toma de la muestra de sangre, tales como un poquito de dolor en el sitio del pinchazo, la aparición de un morado pequeño en la piel, que desaparece en una semana y más raro aun, una mínima posibilidad de que se infecte el lugar del pinchazo.*

*Se me ha informado que los beneficios para mí serán el seguimiento adecuado del esquema terapéutico al que me incorporo, nueva línea terapéutica que incluyen a los inhibidores de la integrasa. Por otro lado, el médico de asistencia contará con un nuevo soporte de laboratorio que le permitirá el manejo de este nuevo esquema terapéutico. Le permitirá al sistema de salud conocer la prevalencia de resistencia viral a esta nueva familia y su frecuencia de distribución en los diferentes subtipos virales que circulan en la epidemia cubana. Elevará el nivel científico de nuestras instituciones, al contar con el equipamiento adecuado y con el personal entrenado en el análisis de las pruebas de resistencia a este nuevo grupo farmacológico.*

*Se me ha informado que mi participación es totalmente voluntaria y estoy en todo mi derecho de decidir si deseo o no colaborar con el estudio y una vez en él, puedo solicitar mi exclusión en cualquier etapa del mismo, si así lo deseara. Se me ha informado que esta decisión será respetada y no conllevará a ninguna penalidad o pérdida de los beneficios, a los cuales tengo derecho, incluido recibir la terapia adecuada en el momento que la requiera. Se me ha informado que podre conocer el resultado del estudio en las diferentes fases del proyecto hasta la conclusión final, y que me serán explicados, de desearlo.*

*Se me ha informado que la información ofrecida se mantendrá bajo estricta confidencialidad y que no se utilizará mi nombre o cualquier otra información que pueda identificarme.*

*Si en algún momento deseo obtener información adicional sobre este proyecto puedo contactar a las Lic. Lissette Pérez santos o Lic. Yanet Pintos Saavedra, al teléfono 7 2553551.*

*He leído el contenido de esta hoja de consentimiento y he escuchado la explicación dada por el Investigador. Se me ha dado la oportunidad de hacer preguntas acerca de este proyecto y las mismas me han sido contestadas a mi satisfacción. Se me ha dado una copia de esta hoja de consentimiento. Mi firma en este documento certifica que soy mayor de edad, que tengo capacidad legal para consentir y que consiento a participar.*

*Nombre del participante*_____

*Firma* _____ *Fecha (día/mes/año)* _____

*Soy testigo de la correcta lectura de esta forma de consentimiento al participante de la entrevista (muestreo) y de que ha tenido la oportunidad de hacer las preguntas pertinentes al caso. Confirmo que el individuo otorga su consentimiento libre y voluntariamente.*

*Nombre del testigo* _____

*Firma* _____ *Fecha (día/mes/año)* _____

*Atestiguo la lectura correcta de esta forma de consentimiento al participante potencial, y de que ha tenido la oportunidad de hacer las preguntas pertinentes al caso. Confirmo que el individuo otorga su consentimiento libre y voluntariamente.*

*Nombre del Investigador*_____

*Firma* _____*Fecha (día/mes/año)* _____

*ANEXO II*

*ENCUESTA*

*Código de muestra asignado por IPK _____*

*Fecha de toma de la muestra _____*

*I- Datos generales y variables sociodemográficas:*

*1-Nombre y apellidos _____*

*2- Caso Índice _____*

*3-Fecha de diagnóstico de VIH _____/_____/_____*

*4-Provincia _____ 5-Municipio _____ 6-Nivel de escolaridad _____*

*7-Edad al diagnóstico _____ 8-Edad Actual_____ 9-Sexo _____*

*II-Variables epidemiológicas:*

*10- Explique la forma de detección de la infección por VIH*
_____
_____

*11- Pruebas de detección de VIH anteriores a la primera positiva*

*Si_____ Fecha_____ Motivo por el que se hizo la prueba_____ No_____*

*12- Fecha probable de contagio _____*

*13- Forma de contagio: Sexual: ____ Parenteral: ____ Vertical: _____*

*14- Orientación sexual _____*

*III- Variables Clínicas y de Laboratorio*

*15-Hallazgos al Examen Físico:*

_____
_____
_____

*16-SIDA_____ No SIDA_____ Fecha SIDA_____*

*17-Carga Viral al diagnóstico de VIH_____*

*Carga Viral de la muestra_____*

*18-Conteo de CD4 al diagnóstico de VIH_____*

*Conteo de CD4 de la muestra_____*

*IV-Historia de Terapia*

*19-Tratado_____No Tratado_____*

*Observaciones:*

*ANEXO III*

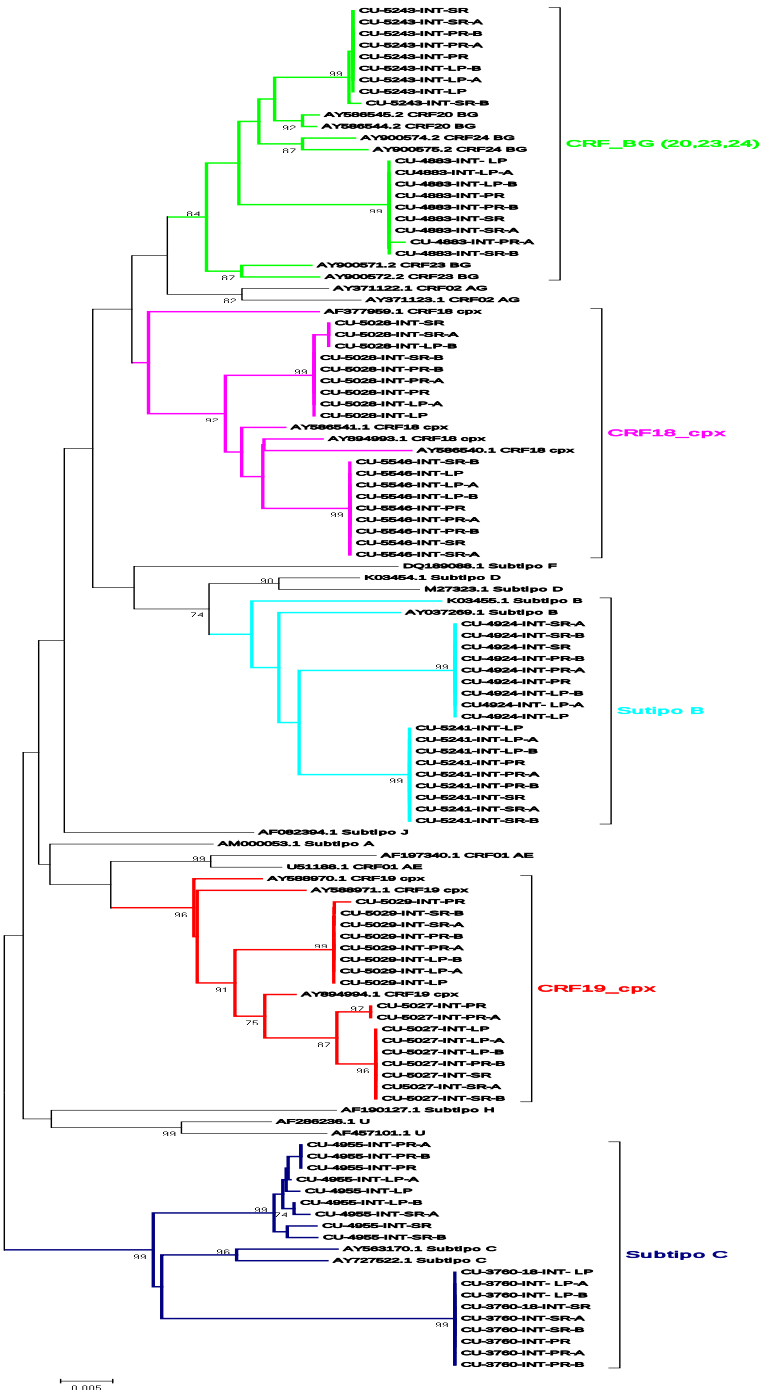



*Figura 1 Árbol filogenético del fragmento del gen pol que codifica para la integrasa de VIH-1.*
*El análisis incluyó 90 secuencias nucleotídicas del ensayo de repetitividad y reproducibilidad. La historia evolutiva se infirió utilizando el método de unión por vecindad, basado en el modelo de Kimura-2 parámetros del programa Mega 7. El árbol consenso, inferido a partir de 1000 réplicas, se utilizó para representar la historia evolutiva de las secuencias analizadas. Los diferentes subtipos se muestran en ramas con diferentes colores: Azul, subtipo C; Rosado, CRF18_cpx; Rojo: CRF19_cpx; Verde, CRF_BG (20, 23, 24); Azul acua, Subtipo B. Las muestras cubanas secuenciadas para la normalización del ensayo están marcadas con un triángulo negro, el resto son secuencias de referencia de los diferentes subtipos de VIH-1, incluidos en este estudio. en este estudio.*

*ANEXO III*

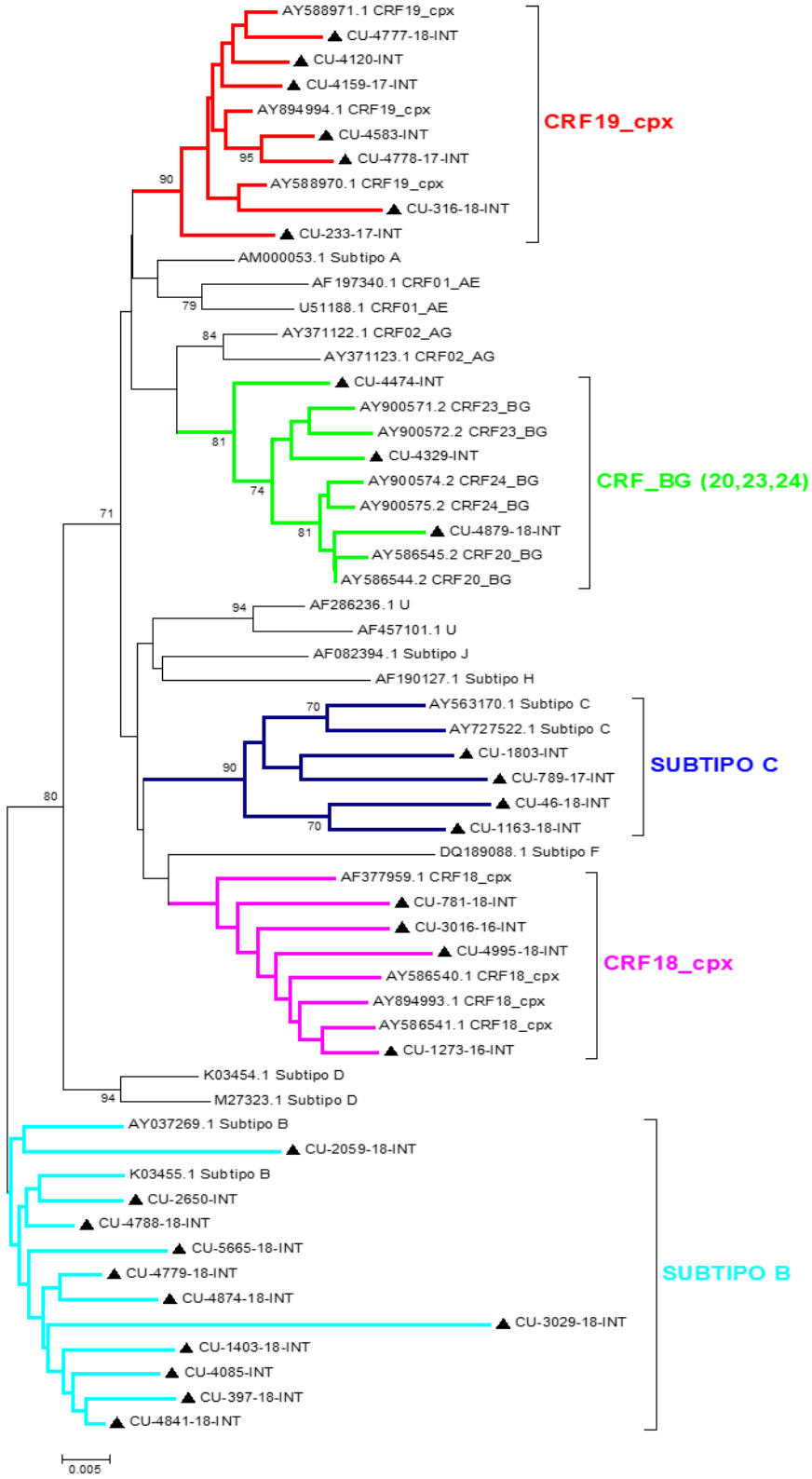



*Figura 1 Árbol filogenético del fragmento del gen pol que codifica para la integrasa de VIH-1.*
*El análisis incluyó 26 secuencias nucleotídicas, La historia evolutiva se infirió utilizando el método de unión por vecindad, basado en el modelo de Kimura-2 parámetros del programa Mega 7. El árbol consenso, inferido a partir de 1000 réplicas, se utilizó para representar la historia evolutiva de las secuencias analizadas. Los diferentes subtipos se muestran en ramas con diferentes colores: Azul, subtipo C; Rosado, CRF18_cpx; Rojo: CRF19_cpx; Verde, CRF_BG (20, 23, 24); Azul acua, Subtipo B. Las muestras cubanas secuenciadas en el presente estudio se encuentran marcadas con un triángulo negro, el resto son secuencias de referencia de los diferentes subtipos de VIH-1, incluidos*

**Tabla 1**. *Frecuencia de los polimorfismos en el dominio amino terminal de la integrasa viral por subtipos.*

| ***MUTACIONES*** | ***B (8)*** | ***C (3)*** | ***CRF18_cpx (4)*** | ***CRF19_cpx (6)*** | ***G (2)*** | ***Total*** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ***D6E*** | | | *4(100)* | | | *4 (17,4%)* |
| ***E11D*** | *3(37,5)* | *1(33,3)* | *4(100)* | *1(16,7)* | *1(50)* | *10 (43,4%)* |
| ***E13D*** | *1(12,5)* | | *4(100)* | | | *5 (21,7%)* |
| ***K14R/KR*** | *2(25)* | | | *2(33,3)* | *1(50)* | *5 (21,7%)* |
| ***S17N*** | *2(25)* | | *3(75)* | *2(33,3)* | | *7 (30,4%)* |
| ***R20K/RK*** | *2(25)* | | | *1(16,7)* | | *3(13%)* |
| ***M22I*** | | | *1 (25)* | | | *1(4,3%)* |
| ***A23AV*** | | | *1(25)* | | | *1(4,3%)* |
| ***S24N/HN*** | | *1(33,3)* | | *2(33,3)* | *1(50)* | *4 (17,4%)* |
| ***D25E*** | *1(12,5)* | *1(33,3)* | | | | *2(8,7%)* |
| ***L28I*** | *1(12,5)* | *1(33,3)* | | | | *2(8,7%)* |
| ***P30A*** | | *1(33,3)* | | | | *1(4,3%)* |
| ***V31I*** | *3(37,5)* | *1(33,3)* | *1(25)* | *5(83,3)* | *1(50)* | *11(47,8%)* |
| ***V32I*** | | *1(33,3)* | | *1(16,7)* | *1(50)* | *3(13%)* |
| ***V37I/VA*** | *2(25)* | *2(66,7)* | *1(25)* | | | *5(21,7%)* |
| ***S39C/M*** | *3(37,5)* | *1(33,3)* | | *1(16,7)* | | *5 (21,7%)* |
| ***D41N*** | | | | *1(16,7)* | | *1(4,3%)* |
| ***K42R*** | | | | | *1(50)* | *1(4,3%)* |
| ***L45Q*** | *3(37,5)* | | | | | *3 (13%)* |

**Tabla 2.** *Frecuencia de los polimorfismos en el domino carboxilo terminal de la integrasa viral*

| MUTACIONES | B (8) | C (3) | CRF18_cpx (4) | CRF19_cpx (6) | G (2) | Total |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 212L | | | 1(25%) | | | 1(4,3%) |
| 214H | 1(12,5%) | | | | | 1(4,3%) |
| 215N | | | 1(25%) | | | 1(4,3%) |
| 216H/K | 1(12,5%) | 1(33,3%) | | | | 2(8,7%) |
| 217V/IV | | | | 1(16,7%) | 1(50%) | 2(8,7%) |
| 218I/L | 1(12,5%) | 1(33,3%) | 1(25%) | | | 3(13%) |
| 219N | | 2(66,7%) | | | | 2(8,7%) |
| 220V/IV | 1(12,5%) | | | 1(16,7%) | 1(50%) | 3(13%) |
| 221R/S | | | 1(25%) | 5(83,3%) | | 6(26,1%) |
| 222K/NK | 1(12,5%) | 1(33,3%) | | | | 2(8,7%) |
| 223C | 1(12,5%) | | | | | 1(4,3%) |
| 227F | | | | | 4(100%) | 2(8,7%) |
| 230N | | | | 1(16,7%) | | 1(4,3%) |
| 233PS | | | | 1(16,7%) | | 1(4,3%) |
| 234I/IV | 2(25%) | 4(100%) | 4(100%) | 5(83,3%) | 4(100%) | 16 (69,6%) |
| 253E | 1(12,5%) | | | 1(16,7%) | | 2(8,7%) |
| 254NK | | 1(33,3%) | | | | 1(4,3%) |
| 255N | 1(12,5%) | | | | 4(100%) | 3(13%) |
| 256E/DE | 2(25%) | | 4(100%) | 1(16,7%) | 4(100%) | 9(39,1%) |
| 258KR | 1(12,5%) | | | | | 1(4,3%) |
| 268L | 1(12,5%) | | | | | 1(4,3%) |
| 269RK | 1(12,5%) | | | | | 1(4,3%) |
| 270H | 1(12,5%) | | | | | 1(4,3%) |
| 278A | | 4(100%) | | | | 3(13%) |
| 281VM | | | | 1(16,7%) | | 1(4,3%) |
| 283G | 1(12,5%) | 4(100%) | 3(75%) | 6(100%) | 1(50%) | 14 (60,9%) |
| 284G/RG | | 1(33,3%) | | 1(16,7%) | | 2(8,7%) |

**Tabla 3.** *Frecuencia de los polimorfismos en el domino del núcleo catalítico de la integrasa viral*

| MUTACIONES | B (8) | C (3) | CRF18_cpx (4) | CRF19_cpx (6) | G (2) | TOTAL |
|---|---|---|---|---|---|---|
| M50ML/I/T/K | 2(25%) | 2(66,7%) | | 1(16,7%) | | 5 (21,7%) |
| I60M/V | 2(25%) | 1 (33,3%) | | | | 3(13%) |
| G70S | | | 1(25%) | | | 1(4,3%) |
| I72IV/IT/V | 4(50%) | 1 (33,3%) | | 6(100%) | | 11 (47,8%) |
| L74I/LIM | 1(12,5%) | | 4(100%) | | 2(100%) | 7 (30,4%) |
| I84V | 1(12,5%) | | | | | 1(4,3%) |
| L101I/V/LI | 6 (75%) | 3(100%) | 4(100%) | | 2(100%) | 15 (65,2%) |
| G106A/GA | | | 1(25%) | 3(50%) | | 4 (17,4%) |
| T112V/AV/M | 2(25%) | 3(100%) | 4(100%) | 6(100%) | 2(100%) | 17 (73,9%) |
| I113V/IV | 2(25%) | | | 2(33,3%) | | 4 (17,4%) |
| S119P/T/PT/SP | 6 (75%) | | 4(100%) | 6(100%) | 1(50%) | 17 (73,9%) |
| T122TI/I | 3(37,5%) | | | 1(16,7%) | | 4(17,4%) |
| T124A/S/N/TA | 3(37,5%) | 1 (33,3%) | 4(100%) | 3(50%) | 2(100%) | 13(56,5%) |
| T125A/TA | 2(25%) | 3(100%) | 4(100%) | 6(100%) | 1(50%) | 16 (69,5%) |
| V126M | | | | 2(33,3%) | | 2 (8,7%) |
| G134D/N/S | | | 4(100%) | 6(100%) | 2(100%) | 12 (52,2%) |
| I135V/IV | | 1 (33,3%) | | 5(83,3%) | 1(50%) | 7 (30,4%) |
| K136A/T/Q/AT/AQ | 1(12,5%) | 1 (33,3%) | 4(100%) | 5(83,3%) | 1(50%) | 12(52,2%) |
| G149E | 1(12,5%) | | | | | 1(4,3%) |
| M154MI | 1(12,5%) | | | | | 1(4,3%) |
| G163E | 1(12,5%) | | | | | 3(13%) |
| V165I | | | 4(100%) | 1(16,7%) | | 5(21,7%) |
| D167E/DE | 1(12,5%) | 1 (33,3%) | | | | 2(8,7%) |
| Q168QP | | | | | 1(50%) | 1(4,3%) |
| A169T | | | 1(25%) | | | 1(4,3%) |
| H171Q/HN/HY | | | 1(25%) | 1(16,7%) | 1(50%) | 3(13%) |
| K173R | 1(12,5%) | | | | | 1(4,3%) |
| V176VL | 1(12,5%) | | | | | 1(4,3%) |
| F181L | | | | 1(16,7%) | | 1(4,3%) |
| R187RK | 1(12,5%) | | | | | 1(4,3%) |
| Q188R | | 1 (33,3%) | | 1(16,7%) | | 1(4,3%) |
| G193D/E | 2(25%) | | | | | 2(8,7%) |
| I200M | | 1 (33,3%) | | | | 1(4,3%) |
| V201I | 5(62,5%) | 3(100%) | 2(50%) | 6(100%) | 2(100%) | 18 (78,2%) |
| I203M | | 1 (33,3%) | | | | 1(4,3%) |
| A205S/AS | 2(25%) | 1 (33,3%) | | | | 3 (13%) |
| T206S | | | 1(25%) | 6(100%) | 2(100%) | 9(39,1%) |
| I208M/L/IM | 2(25%) | 1 (33,3%) | | | | 3(13%) |
| K211R | 3(37,5%) | | 3(75%) | | 1(50%) | 7 (30,4%) |