

**UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL**  
**UNIDAD DE POSTGRADO INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO**  
**MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR**

“RESISTENCIA A LOS MEDICAMENTOS ANTIRRETROVIRALES INHIBIDORES DE PROTEASA E INHIBIDORES DE INTEGRASA EN PACIENTES ADULTOS CON INFECCION POR EL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA , EN LOS HOSPITALES EUGENIO ESPEJO Y ENRIQUE GARCES DE LA CIUDAD DE QUITO, PERIODO ENERO - MARZO 2017”

**Tesis presentada para optar el grado académico de Magíster en  
Biotecnología Molecular**

**Autor(a):** Lcda. Tatiana Vaturina Sivisaca Pucha

**Director:** Dr. Manuel Augusto González

**GUAYAQUIL – ECUADOR**  
**AGOSTO 2017**

## REPOSITORIO NACIONAL EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA

### FICHA DE REGISTRO DE TESIS

<b>TÍTULO Y SUBTÍTULO:</b> "RESISTENCIA A LOS MEDICAMENTOS ANTIRRETROVIRALES INHIBIDORES DE PROTEASA E INHIBIDORES DE INTEGRASA EN PACIENTES ADULTOS CON INFECCION POR EL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA , EN LOS HOSPITALES EUGENIO ESPEJO Y ENRIQUE GARCES DE LA CIUDAD DE QUITO, PERIODO ENERO - MARZO 2017"	
<b>AUTOR:</b> Lcda. Tatiana Vaturina Sivisaca Pucha.	<b>TUTOR:</b> Dr. Manuel Augusto González
	<b>REVISORES:</b> Dr. Manuel Augusto González
<b>INSTITUCIÓN:</b> Universidad de Guayaquil.	<b>FACULTAD:</b> Unidad de Posgrado, Investigación y Desarrollo
<b>CARRERA:</b> Maestría en Biotecnología Molecular.	
<b>FECHA DE PUBLICACIÓN:</b> 10/08/2017	<b>Nro. de páginas:</b> 86
<b>TÍTULO OBTENIDO:</b> Magister en Biotecnología Molecular.	
<b>ÁREAS TEMÁTICAS:</b> Epidemiología molecular del virus de inmunodeficiencia humana VIH en el Ecuador, resistencia genotípica del virus de la inmunodeficiencia humana a los antirretrovirales.	
<b>PALABRAS CLAVE:</b> <i>Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH); Resistencia genotípica del virus de inmunodeficiencia humana; inhibidores de Proteasa; inhibidores de Integrasa; pirosecuenciación.</i>	
<b>RESUMEN:</b> La resistencia a los medicamentos antirretrovirales es uno de los principales problemas al momento de instaurar el tratamiento adecuado en pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana, así como la falta de adherencia al tratamiento, intolerancia a la medicación, las variaciones individuales de la farmacocinética. <b>(1)</b> El interés del presente estudio fue establecer la resistencia a los medicamentos antirretrovirales inhibidores de proteasa e integrasa en pacientes adultos vírgenes de tratamiento (naïve) con infección por virus de inmunodeficiencia humana, identificar las mutaciones que más frecuentemente se asocian a resistencia , detectar los subtipos y formas recombinantes de VIH-1 de los pacientes motivo del estudio. Para tal fin se realizó un estudio descriptivo, analítico, prospectivo y de corte transversal, entre los meses enero a marzo 2017 en pacientes (naïve) vírgenes al tratamiento, que asistieron a los Hospitales Eugenio Espejo y Enrique Garcés de la ciudad de Quito ; se recolectaron un total de 27 muestras de las cuales se procesó 10 que cumplían con los criterios de inclusión y exclusión ; a las muestras analizadas se les realizó extracción del ácido ribonucleico , amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se pirosecuenció en el equipo 454-gs junior de roche; el análisis de la información se realizó con el software deepchek®. Se detectaron en el gen de la proteasa 41 mutaciones, de las cuales 3 se asocian con resistencia a los inhibidores de la proteasa <b>(IP), A71T, L10I / V, V82I</b> . En el gen de la integrasa las mutaciones encontradas fueron 24 de las cuales 1 está asociada a resistencia a los inhibidores de integrasa <b>(IIN) L74 M/L</b> . En las muestras analizadas predominó el subtipo B, seguido por el subtipo C, y la forma recombinante circulante 07_BC para el gen de la proteasa y para el gen de la integrasa se presentó el subtipo B en una de las muestras analizadas.	
<b>No. DE REGISTRO</b> (en base de datos):	<b>No. DE CLASIFICACIÓN:</b>
<b>DIRECCIÓN URL</b> (tesis en la web):	
<b>ADJUNTO PDF:</b>	<input checked="" type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO
<b>CONTACTO CON AUTOR/ES</b>	Teléfono: 0994773462 E-mail: tatita-861@hotmail.com
<b>CONTACTO EN LA INSTITUCIÓN:</b>	<b>Nombre:</b> Unidad de Posgrado Investigación y Desarrollo
	<b>Teléfono:</b> 2325530-38 Ext. 114
	<b>E-mail:</b> upid@ug.edu.ec

## CERTIFICADO DEL TUTOR

En mi calidad de tutor del Programa de Maestría en Biotecnología Molecular, nombrado por el Director General de la Unidad de Posgrado, Investigación y Desarrollo, CERTIFICO: que he analizado la Tesis presentada, como requisito para optar el grado académico de Magíster en Biotecnología Molecular, titulada: “Resistencia a los medicamentos antirretrovirales inhibidores de proteasa e inhibidores integrasa en pacientes adultos con infección por el virus de inmunodeficiencia humana, en los Hospitales Eugenio Espejo y Enrique Garcés de la ciudad de Quito. Periodo enero - marzo 2017” la cual cumple con los requisitos académicos, científicos y formales que demanda el reglamento de posgrado.

Firma

-----

2017

Nombre completo de Tutor

N° de cédula:

Guayaquil, 29 de Julio de

## Urkund Analysis Result

**Analysed Document:** TESIS TATIANA SIVISACA 29 -07-2017 1 1.pdf (D29823567)  
**Submitted:** 2017-07-31 22:30:00  
**Submitted By:** chidalgo@inspi.gob.ec  
**Significance:** 10 %

### Sources included in the report:

1428309962\_tesis.docx (D13843667)  
<http://docslide.com.br/documents/capitulo2epidemiologiadelvihpdf.html>  
<https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182011000600011>  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs360/es/>  
<http://www.unaids.org/es/regionscountries/countries/ecuador>  
<https://dx.doi.org/10.4067/S0370-41062000000200002>  
[http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789243599762\\_spa.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789243599762_spa.pdf)

### Instances where selected sources appear:

48

## CERTIFICADO DE REDACCIÓN Y ESTILO

Daniel Ricardo Garzón Chávez MD, Mgs, MPH&TM, con registro del SENESCYT 1031-2016-1663099, 7321 R-15-21290, por medio del presente tengo a bien **CERTIFICAR**: Que he revisado la redacción, estilo y ortografía de la tesis de grado, elaborado por la Señora Lic. Tatiana Vaturina Sivisaca Pucha, con C.I. 1104579311, previo a la obtención del título de MAGISTER EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR.

Tema de tesis: "RESISTENCIA A LOS MEDICAMENTOS ANTIRRETROVIRALES INHIBIDORES DE PROTEASA E INHIBIDORES DE INTEGRASA EN PACIENTES ADULTOS CON INFECCION POR EL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA , EN LOS HOSPITALES EUGENIO ESPEJO Y ENRIQUE GARCES DE LA CIUDAD DE QUITO, PERIODO ENERO - MARZO 2017"

Trabajo de investigación que ha sido escrito de acuerdo a las normas ortográficas y de sintaxis vigentes.



M.D. DANIEL GARZÓN  
Cod. 34 - 05 - 13  
INH. 17 - 08 - 03621

---

Daniel Ricardo Garzón Chávez  
1718988346  
Registro SENESCYT  
Mgs 1031-2016-1663099  
MPH&TM 7321 R-15-21290  
Número de teléfono: 0998624904  
Correo: dgarzonc@usfq.edu.ec

## DECLARACIÓN JURADA DEL AUTOR

Yo, Lcda. Tatiana Vaturina Sivisaca Pucha , declaro bajo juramento ante la Dirección de Posgrado de la Universidad de Guayaquil, que el trabajo aquí descrito, así como sus resultados, conclusiones y recomendaciones presentado es de mi autoría y exclusiva responsabilidad, que es inédito y no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional.

La reproducción total o parcial de esta tesis en forma idéntica o modificada, no autorizada por los editores transgrede los derechos de autoría. Cualquier utilización debe ser previamente solicitada a la Universidad de Guayaquil, a través de la Dirección de Posgrado o al autor.



Firma. -----

N° Cédula. 1104579311

## AGRADECIMIENTO

*Agradezco a Dios por permitir levantarme cada mañana a cumplir mis metas y anhelos.*

*Al Dr. Manuel Augusto González por compartir sus experiencias profesionales, por su paciencia y asesoramiento en el desarrollo de mi tesis.*

*A la Ing. Katherine Sthefanie Hermida Álava por colaborar permanentemente en el trabajo de campo del presente estudio.*

*A las autoridades y personal del Instituto de Investigación en Salud Pública INSPI, por abrirme las puertas de su prestigiosa institución para realizar mi tesis.*

*A cada uno de los profesionales que integran el Centro de Referencia de Retrovirus, Hepatitis y Otros virus de transmisión sexual, por su soporte técnico.*

*Al personal del Hospital Eugenio Espejo y Hospital Enrique Garcés por toda la información brindada en el transcurso de mi tesis.*

*A mi amado esposo Enrique por su calidad de ser humano, por el amor, paciencia, por animarme cada día a superarme profesionalmente.*

*A mi tío Edilberto Sisalima por acogerme en su hogar y hacer de mi estadía en la ciudad de Quito acogedora. Gracias tío.*

*A mis padres por hacer de mí con su ejemplo, una persona útil para la sociedad llena de valores y con mucho entusiasmo para afrontar los retos que se presentan en el desarrollo académico y personal.*

*A todos mis hermanos especialmente a mi hermana Valentina Sivilaca por apoyarme incondicionalmente en el lugar donde me encuentre, eres una excelente persona y grandiosa hermana*

## DEDICATORIA

*A Dios primeramente ser supremo creador de todas las cosas.*

*A mi amado esposo y mejor amigo Enrique por ser un ejemplo de persona y profesional; por demostrarme cada día que todo lo que uno anhela con el corazón y se construye día día es posible.*

*A mis padres Hermenegildo y Elvia por apoyarme siempre con sus buenos consejos y su amor.*

*A mis hermanos Sara (+), Pablo, Julio y Valentina por sus palabras de aliento y amor que me permitieron crecer como persona.*

*A mis sobrinos Edgar, Katherine, Daniela, Anita, Julio, Alexa, Nathy y Sarita, porque a pesar de la distancia los llevo en el corazón.*

*A mis compañeros, amigos, quienes compartieron sus conocimientos, alegrías y tristezas.*

*A todas aquellas personas que durante estos años estuvieron a mi lado apoyándome y lograron que este sueño se haga realidad.*

## ÍNDICE GENERAL

Contenido	Páginas.
<b>Portada.</b>	I
<b>Repositorio de la SENESCYT.</b>	II
<b>Certificado del tutor y análisis de coincidencias.</b>	III
<b>Certificado de redacción y estilo.</b>	IV
<b>Autoría.</b>	V
<b>Agradamientos.</b>	VI
<b>Dedicatoria.</b>	VII
<b>Resumen.</b>	VIII
<b>Introducción.</b>	-1-
<b>Capítulo 1. Planteamiento del problema</b>	-3-
<b>Capítulo 2. Marco Teórico.</b>	-5-
2.1 Información General	-5-
2.1.1 Virus de Inmunodeficiencia Humana	-5-
2.1.2 Estructura del VIH	-5-
2.1.3 Genoma	-6-
2.1. 4 Proteínas estructurales VIH-1.	-7-
2.1. 5 Proteínas no estructurales VIH-1.	-7-
2.1.6 Ciclo vital del VIH.	-8-
2.1.7 Penetración del virus.	-8-
2.1.8 Síntesis del Provirus.	-9-
2.1.9 Transporte nuclear e Integración.	-9-
2.1.10 Expresión génica.	-11-
2.1.11Ensamblaje del virión.	-12-
2.2 Resistencia a la terapia antiretroviral (TARV) en la Infección por el Virus de Inmunodeficiencia Humana.	-12-
2.2.1 Resistencia primaria o transmitida	-13-
2.2.2 Resistencia secundaria o adquirida	-13-
2.2.3 Nomenclatura de las mutaciones	-14-
2.2.4 Resistencia a Inhibidores de Proteasa	-15-
2.2.4.1 Mecanismos de resistencia a inhibidores de proteasa	-16-
2.2.5 Resistencia a Inhibidores de Integrasa (IIN)	-17-
2.3 Dinámica poblacional de la resistencia	-18-
2.4 Mutaciones más comunes asociadas a resistencia a medicamentos antirretrovirales	-19-
2.5 Variabilidad genética del VIH-1	-20-
2.6 Distribución geográfica de los subtipos del VIH-1	-23-
2.7 Ensayos para determinar resistencia a los antirretrovirales	-23-
2.7.1 Ensayos genotípicos para determinar la resistencia del VIH-1	-24-

2.7.1.1 Secuenciación de Sanger	-25-
2.7.1.2 Pirosecuenciación	-26-
2.7.1.3 Ensayos fenotípicos para determinar la resistencia del VIH-1	-28-
<b>Capítulo III. Metodología o diseño de la investigación.</b>	-30-
1. Desarrollo de la Investigación.	-30-
2. Tipo de estudio:	-30-
3. Universo y Muestra:	-30-
4. Procedimientos Éticos	-31-
5. Consentimiento Informado.	-31-
6. Colecta de especímenes	-31-
7. Cuantificación de carga viral VIH-1.	-32-
8. Protocola de transporte de las muestras al CRN.	-32-
9. Protocolo para Prueba de Resistencia del VIH-1	-33-
Flujo de Trabajo:	-34-
10. Análisis de la resistencia	-71-
<b>CAPÍTULO 4. Resultados</b>	-73-
<b>CAPÍTULO 5. Discusión.</b>	-80-
<b>CAPÍTULO 6. Conclusiones y recomendaciones.</b>	-86-
<b>BIBLIOGRAFÍA.</b>	-88-
<b>ANEXOS.</b>	

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<b>IP</b>	Inhibidor de la proteasa
<b>IIN</b>	inhibidores de integrasa
<b>SIDA</b>	Síndrome de Inmunodeficiencia Humana.
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud.
<b>ONUSIDA</b>	Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA
<b>TARV</b>	Tratamiento antirretroviral
<b>OPS</b>	Organización Panamericana de la Salud.
<b>MSP</b>	Ministerio de Salud Pública del Ecuador
<b>TDF</b>	Tenofovir.
<b>FTC</b>	Emtricitabina
<b>EFV</b>	Efavirenz
<b>TARGA</b>	Tratamiento antirretroviral de gran actividad.
<b>VIH-1</b>	Virus de la inmunodeficiencia Humana tipo 1
<b>VIH-2</b>	Virus de la inmunodeficiencia Humana tipo 2
<b>CRF</b>	Formas recombinantes circulantes.
<b>RT</b>	Retrotranscriptasa.
<b>PR</b>	Proteasa.
<b>IN</b>	Integrasa.
<b>CD4</b>	Cúmulo de diferenciación 4 (glucoproteína monomérica que contiene 4 dominios de tipo inmunoglobulinas).
<b>CCR5</b>	Correceptor 5 de quimiocinas.
<b>CXCR4</b>	Receptor 4 quimiocínico de <i>Coxsackie</i> .
<b>GALT</b>	Sistema inmunitario asociado a mucosas
<b>TRIM5</b>	Proteína que contiene el motivo tripartito 5 alfa.
<b>RNAPII</b>	Complejo de RNA polimerasa II
<b>Kb</b>	Kilobases (1000pb)
<b>Pb</b>	Pares de bases.
<b>SIVsm</b>	Virus de la inmunodeficiencia del simio <i>Sooty mangabey</i> , homología genética con VH-2
<b>SIVcpzPtt</b>	Virus de la inmunodeficiencia del chimpancé <i>Pan troglodytes</i>

	<i>troglydites</i> , homología genética con VH-1
<b>CRF 28_BF</b>	Forma recombinante circulante compuesta de los subtipos B y F. Los nuevos CRF se numeran secuencialmente a medida que se conozcan.
<b>NF-kB</b>	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas. Complejo proteico que controla la transcripción del ADN.
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero.
<b>APOBEC3G</b>	Apolipoproteína B ARNm enzima edición, catalítico polipéptido como 3G), desempeña un papel importante en la inmunidad anti-viral innata.
<b>DC-SIGN</b>	Adhesión Intercelular Específica De Células Dendríticas, es una molécula de membrana en las células dendríticas; un receptor de lectina C tipo II.
<b>L-SIGN4</b>	Un receptor de lectina que se expresa en células dendríticas.
<b>TAR</b>	Transactivación de la transcripción de
<b>LTR</b>	Secuencias largas terminales repetidas de los retrovirus, fragmentos de ácido nucleico que aparecen repetidos en los extremos 3' y 5' del genoma viral.
<b>MHC</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad
<b>LacZa</b>	El operón lac contiene tres genes: lacZ, lacY y lacA. Estos genes se transcriben como un solo ARNm, bajo el control de un promotor.
<b>DNTP</b>	Desoxinucleótido trifosfato
<b>dUTP</b>	Desoxiuridina trifosfato.
<b>dTTP</b>	Desoxitimidina trifosfato.
<b>RTC</b>	Complejo de Retrotranscripción.
<b>ABC</b>	Abacavir
<b>PR</b>	Proteasa
<b>TDF</b>	Tenofovir
<b>TARVAE</b>	terapia antirretroviral altamente efectiva
<b>TAM</b>	mutaciones relacionadas con análogos de timidina

<b>3TC</b>	Lamivudina
<b>S<sup>^</sup>NC</b>	Resultados no conclusivos
<b>R</b>	Resistencia alta
<b>I</b>	Resistencia intermedia
<b>S</b>	Susceptible
<b>FTC</b>	Emtricitabina
<b>d4T</b>	Estavudina
<b>ddC</b>	Zalcitabina
<b>ddI</b>	Didanosina
<b>EFV</b>	Efavirenz
<b>AZT</b>	Zidovudina
<b>FCR</b>	Resistencia a una clase completa de medicamentos ARV
<b>CRF</b>	Forma recombinante circulante
<b>ARV</b>	agentes antirretrovirales
<b>FRVIH.</b>	Farmacorresistencia del VIH.
<b>VIH</b>	Virus de la inmunodeficiencia Humana
<b>ARV</b>	Antirretrovirales
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa.

## ÍNDICE DE FIGURAS

CONTENIDOS	Páginas.
<b>Figura 1.</b> Representación estructural del VIH	-5-
<b>Figura 2.</b> Organización genómica del VIH	-6-
<b>Figura 3.</b> Proteínas estructuras del VIH	-7-
<b>Figura 4.</b> Proteínas no estructuras del VIH	-7-
<b>Figura 5.</b> Ciclo Vital del VIH	-8-
<b>Figura 6.</b> Características de una Mutación	-14-
<b>Figura 7.</b> Estructura de la proteasa y posiciones donde frecuentemente se desarrolla mutaciones asociadas a resistencia.	-15-
<b>Figura 8.</b> Mutaciones asociadas con resistencia a los diferentes Inhibidores de Proteasa (IP).	-16-
<b>Figura 9.</b> Mutaciones asociadas con resistencia a los diferentes Inhibidores de Proteasa (IP).	-18-
<b>Figura 10.</b> Separación de fragmentos y análisis en la secuenciación por el método de Sanger.	-26-
<b>Figura 11.</b> Pasos del proceso de pirosecuenciación	-28-
<b>Figura 12.</b> Protocolo de trabajo del proceso de pirosecuenciación.	-34-
<b>Figura 13.</b> Mutaciones en el gen de la Proteasa (RT) en las muestras analizadas. ( <i>Población viral mayoritaria 20%</i> ).	-75-
<b>Figura 14.</b> Mutaciones en el gen de la Integrasa (RT) en las muestras analizadas. ( <i>Población viral mayoritaria 20%</i> ).	-77-

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>CONTENIDO:</b>		<b>Pág.</b>
<b>Tabla I.</b> Clasificación del nivel de resistencia según algoritmo de Stanford		-72-
<b>Tabla II.</b> Caracterización de los pacientes y resultados de laboratorio.....		-73-
<b>Tabla III.</b> Frecuencia de mutaciones en el gen de la proteasa (P) en las muestras analizadas		-74-
<b>Tabla IV.</b> Frecuencia de mutaciones en el gen de la Integrasa (IN) en las muestras analizadas		-76-
<b>Tabla V.</b> Nivel de resistencia genotípica del VIH-1 a los antirretrovirales inhibidores de la Proteasa.....		-78-
<b>Tabla VI.</b> Subtipo viral.....		-79-

## RESUMEN IX

La resistencia a los medicamentos antirretrovirales es uno de los principales problemas al momento de instaurar el tratamiento adecuado en pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana, así como la falta de adherencia al tratamiento, intolerancia a la medicación, las variaciones individuales de la farmacocinética. **(1)** El interés del presente estudio fue establecer la resistencia a los medicamentos antirretrovirales inhibidores de proteasa e integrasa en pacientes adultos vírgenes de tratamiento (naïve) con infección por virus de inmunodeficiencia humana, identificar las mutaciones que más frecuentemente se asocian a resistencia detectar los subtipos y formas recombinantes de VIH-1 de los pacientes motivo del estudio. Para tal fin se realizó un estudio descriptivo, analítico, prospectivo y de corte transversal, entre los meses enero a marzo 2017 en pacientes (naïve) vírgenes al tratamiento, que asistieron a los Hospitales Eugenio Espejo y Enrique Garcés de la ciudad de Quito ; se recolectaron un total de 27 muestras de las cuales se procesó 10 que cumplían con los criterios de inclusión y exclusión ; a las muestras seleccionadas se realizó extracción del ácido ribonucleico , amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se pirosecuenció en el equipo 454-gs junior de roche; el análisis de la información se la realizó con el software deepchek®. Un total de 41 mutaciones fueron detectadas en el gen de la proteasa viral, de las cuales 3 se asocian con resistencia a los inhibidores de la proteasa (IP), **A71T, L10I / V, V82I**. Las mutaciones encontradas en el gen de la integrasa fueron 24 mutaciones, de las cuales 1 está asociada a resistencia a los inhibidores de integrasa (IIN) **L74 M/L**. En las muestras analizadas predominó el subtipo B, seguido por el subtipo C, y la forma recombinante circulante 07\_BC para el gen de la proteasa y para el gen de la integrasa se presentó el subtipo B en una de las muestras analizadas.

**Palabras Clave:** Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH); Resistencia genotípica del virus de inmunodeficiencia humana; inhibidores de Proteasa; Inhibidores de Integrasa; pirosecuenciación.

## SUMMARY

Resistance to antiretroviral drugs is one of the main problems at the time of establishing adequate treatment in patients infected with human immunodeficiency virus, as well as lack of adherence to treatment, medication intolerance and individual variations in pharmacokinetics. (1) The aim of the present study was to establish resistance to antiretroviral protease and integrase inhibitor drugs in virgin adult human immunodeficiency virus (HIV) -treated patients, to identify the mutations most frequently associated with resistance, to detect Subtypes and recombinant forms of HIV-1 patients' motif study. For this purpose, a descriptive, analytical, prospective and cross-sectional study was performed between January and March 2017 in patients (naïve) who were untreated, who attended Eugenio Espejo and Enrique Garcés Hospitals in the city of Quito; A total of 27 samples were collected from which 10 were processed that met the inclusion and exclusion criteria; The samples analyzed were extracted from ribonucleic acid, amplification by polymerase chain reaction (PCR) and pyrosequenced in the junior 454-gs equipment of roche; The analysis of the information was carried out with the software deepchek®. Mutations were detected in the protease gene, of which 3 were associated with resistance to protease (PI) inhibitors, A71T, L10I / V, V82I. In the integrase gene the mutations found were 24 of which 1 is associated with resistance to integrase inhibitors (IIN) L74 M / L. The subtype B, followed by subtype C, and the circulating recombinant form 07\_BC for the protease gene and for the integrase gene, presented the subtype B in one of the samples analyzed.

**Keywords:** Human immunodeficiency virus (HIV); genotypic resistance of human immunodeficiency virus; Protease inhibitors; Integrasa inhibitors; Pyrosequ

## INTRODUCCIÓN

La resistencia a los medicamentos antiretrovirales es uno de los problemas fundamentales al momento de instaurar el tratamiento adecuado en pacientes que se encuentran infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana, así como la falta de adherencia al tratamiento, intolerancia a la medicación, las variaciones individuales de la farmacocinética. **(1)**

Actualmente se dispone de medicamentos los cuales según la acción que ejercen en el ciclo de replicación viral se clasifican en: inhibidores de la transcriptasa inversa (ITI), inhibidores de la proteasa viral (IP), inhibidores de entrada del virus a la célula (IE) e inhibidores de la integrasa (IIN). **(2)**

La terapia antirretroviral en pacientes infectados con el virus de inmunodeficiencia humana tipo 1, ha permitido disminuir las complicaciones oportunistas en más de un 50 %, incrementar la supervivencia y mejorar la calidad de vida de los pacientes que padecen de esta enfermedad; sin embargo, es común el fracaso terapéutico por la pobre adhesión a la terapia, la intolerancia a la medicación, las interacciones medicamentosas, las variaciones individuales de la farmacocinética y el desarrollo de resistencia. **(3)** Con el propósito de determinar la resistencia a los medicamentos antiretrovirales y considerando que esto puede afectar gravemente a la salud de los pacientes que presentan VIH surge la hipótesis de si existe resistencia a los medicamentos antirretrovirales inhibidores de proteasa e inhibidores de integrasa en pacientes adultos vírgenes de tratamiento (naïve) con infección por virus de inmunodeficiencia humana en los Hospitales Enrique Garcés y Eugenio Espejo de la ciudad de Quito.

Los objetivos del presente estudio fueron establecer la resistencia a los medicamentos antirretrovirales inhibidores de proteasa e integrasa en pacientes adultos vírgenes de tratamiento (naïve) con infección por virus de inmunodeficiencia humana, identificar las mutaciones que más frecuentemente se asocian a la resistencia a los antirretrovirales y

determinar los subtipos y formas recombinantes de VIH -1 de los pacientes motivo del estudio, para tal fin se realizó varios procedimientos laboratoriales que permitieron cumplir con los objetivos del estudio .

El propósito del presente estudio es generar los primeros datos en el país acerca de la resistencia del VIH en pacientes sin exposición previa al tratamiento lo cual permitirá al personal medico la selección del tratamiento más eficaz en los pacientes en los que inician la terapia antiretroviral, además le brindará datos al Sistema de Vigilancia Epidemiologica y la Estrategia Nacional de VIH, para el fortalecimiento de la política pública en relación al manejo de pacientes con esta enfermedad.

La estructura general de los capítulos que contienen el presente estudio son:

**CAPITULO 1.** Planteamiento del problema

**CAPÍTULO 2.** Marco Teórico.

**CAPÍTULO 3.** Diseño Metodológico.

**CAPÍTULO 4.** Análisis e interpretación de resultados.

**CAPÍTULO 5.** Discusión.

**CAPÍTULO 6.** Conclusiones y recomendaciones,

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS Y ANEXOS.**

## CAPITULO 1

### PLANTEAMIENTO PROBLEMA

La infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es uno de los problemas de salud pública que afecta a la población mundial. La Organización Mundial de la Salud estima que a finales 2015, 1,1 millones de personas fallecieron a causa del VIH en todo el mundo. **(4)**

El Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/sida, indica que en el Ecuador el número estimado de personas que viven con VIH se encuentra entre 29000 , con una prevalencia en adultos de entre 15 y 49 años del 0.3%, de los cuales se encuentran hombres y mujeres de al menos 15 años que viven con el VIH 8900 , niños de 0 a 14 años de edad que viven con el VIH <500, fallecimientos por el sida <1000 , huérfanos por el VIH de 0 a 17 años de edad 11 000 . **(5)**

El virus de inmunodeficiencia humana **(VIH)** constituye el agente etiológico del síndrome de inmunodeficiencia adquirida, se conocen dos tipos diferentes de virus de inmunodeficiencia humano: VIH-1 y VIH-2, los cuales se diferencian por la distribución de su genoma, y las relaciones filogenéticas (evolutivas). Con base en las secuencias del gen env, VIH-1 abarca 4 grupos virales diferentes (M, N, O y P). **(6)**

Vencer la pandemia del VIH ha sido imposible hasta el momento, porque a diferencia de los virus ADN, los virus ARN presentan una elevada tasa de cambios o mutaciones (número de incorporaciones erróneas por nucleótido copiado) durante el proceso de replicación. Las mutaciones que se generan pueden tener varios efectos en la biología del virus: pueden producir aumento o disminución de su virulencia, aumento o disminución de su capacidad replicativa así como también asociarse a resistencia a los antirretrovirales cuando las mutaciones ocurren en los sitios blancos de las drogas. **(7)** La resistencia a los medicamentos antirretrovirales está definida por la aparición de mutaciones, principalmente sobre el gen pol, en específico a nivel de la transcriptasa

reversa, proteasa viral e integrasa; la resistencia a los medicamentos antirretrovirales es un problema creciente en los últimos años y se estudia a través de pruebas genotípicas y fenotípicas las cuales permiten obtener información utilizada en la clínica a la hora de instaurar el tratamiento más apropiado; sin embargo, la interpretación del genotipo es compleja y está sujeta a cambios frecuentes, tanto por la incorporación de nuevos fármacos, como también por la actualización en los patrones de resistencia . **(8)**

Las clases de ARVs con las que se cuenta en la actualidad son:

- Inhibidores análogos de nucleósidos de la TR (INTR).
- Inhibidores no análogos de nucleósidos de la TR (INNTR).
- Inhibidores de la proteasa (IP).
- Inhibidores de entrada, e.
- Inhibidores de la integrasa (IIN). **(9)**

En el Ecuador la terapia antirretroviral se distribuye a los pacientes desde el año 2003, desde esa fecha hasta el momento, existe muy poca información sobre la presencia de virus que presenten resistencia primaria o secundaria del virus a las drogas, lo cual genera una gran interrogante en relación a la existencia de transmisión de virus resistentes entre la población y por ende del éxito del esquema terapéutico de inicio que se utiliza en el país.

## CAPÍTULO 2

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1 Información General

##### 2.1.1 Virus de Inmunodeficiencia Humana

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), pertenece a la familia retroviridae, es un lentivirus del cual se han identificado dos tipos: VIH-1 que a su vez se divide en cuatro grupos distintos (M, N, O y P), es el más frecuente y produce al síndrome de inmunodeficiencia adquirida; VIH-2 con ocho grupos diferentes, se encuentra principalmente en habitantes del África Occidental y es transmitido con menor eficacia pero igualmente que el VIH-1 también termina en SIDA y muerte. **(10)**

##### 2.1.2 Estructura del VIH

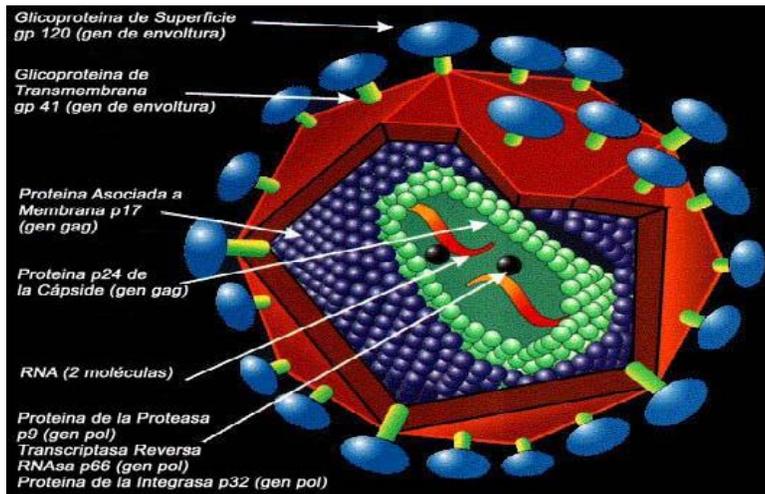


Fig. 1: Representación estructural del VIH.

El virión de VIH consta de la siguiente estructura:

- ✓ Un núcleo cilíndrico con dos bandas idénticas de RNA unidas por la proteína p9, copias de la enzima transcriptasa reversa y proteínas nucleares.
- ✓ Capa de proteínas de la cápside constituido por el antígeno p24.
- ✓ Capa de la matriz compuesta por el antígeno p17, que sirve como revestimiento interno de la envoltura viral externa.

- ✓ Doble capa de lípidos de la envoltura, derivada de la membrana plasmática de la célula huésped. Embebida en ella se encuentra la proteína transmembrana gp41, donde se ancla la glicoproteína de superficie Gp120, que sirve como sitio de inserción primaria de las partículas de VIH a las moléculas de superficie en las células huéspedes. (11)

### 2.1.3 Genoma

El genoma del VIH comparte la disposición básica de secuencias de ácidos nucleicos característica de todos los retrovirus que incluyen los siguientes elementos: Repeticiones terminales largas (LTR) al final de cada genoma, que regulan la integración viral en el genoma del huésped, la expresión génica del virus y la replicación viral; los genes gag que codifican las proteínas estructurales del core, los genes pol que codifican para la transcriptasa inversa, endonucleasas y proteasas virales requeridas para la replicación viral y los genes env que codifican las glicoproteínas de envoltura gp 120 y gp 41, requeridas para la infección de las células. Además de estos genes, el VIH incluye al menos seis genes reguladores, que incluyen: vpr, vif, tat, rev, nef y vpu, cuyos productos controlan la replicación viral de varias maneras. El VIH-2 contiene estos genes, excepto el vpu y tiene otro gene, el vpx que está ausente en el VIH-1. (12)

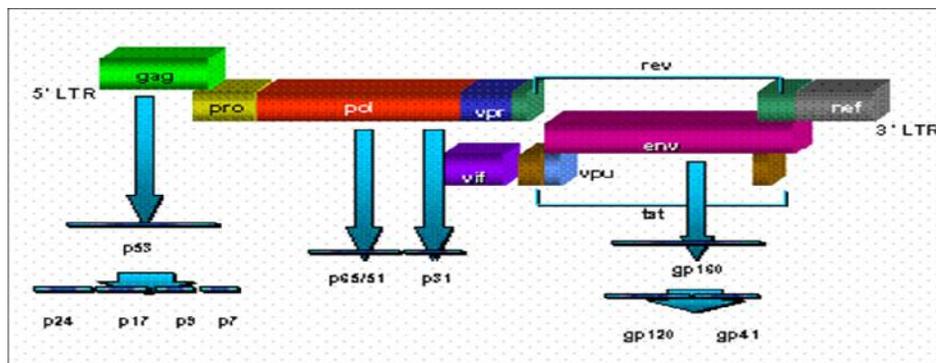


Fig. 2 Organización Genómica del VIH-1.

#### 2.1.4 Proteínas estructurales VIH-1.

Se encuentra el nombre de cada proteína estructural, con su respectiva abreviatura y nombre alternativo. (13)

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

Fig.3 Proteínas estructurales VIH-1. (Black & Black, 2012; Knipe & Howley, 2013)

#### 2.1.5 Proteínas no estructurales VIH-1.

Se encuentra el nombre de cada proteína no estructural, con su respectiva abreviatura y nombre alternativo. Modificado de Acheson, 2011 (13)

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

Fig. 4 Proteínas no estructurales VIH-1.

### 2.1.6 Ciclo vital del VIH.

El virus alcanza la célula diana y logra penetrar a través de la membrana plasmática, la reverse transcriptasa viral (RT) convierte el ARN viral en ADN. El ADN retrotranscrito es transportado al núcleo e integrado al ADN celular, proceso mediado por la enzima integrasa (IN). Debido a las características de replicación de los retrovirus, el ADN proviral está flanqueado por las regiones LTR (long terminal repeats), con importantes funciones reguladoras.

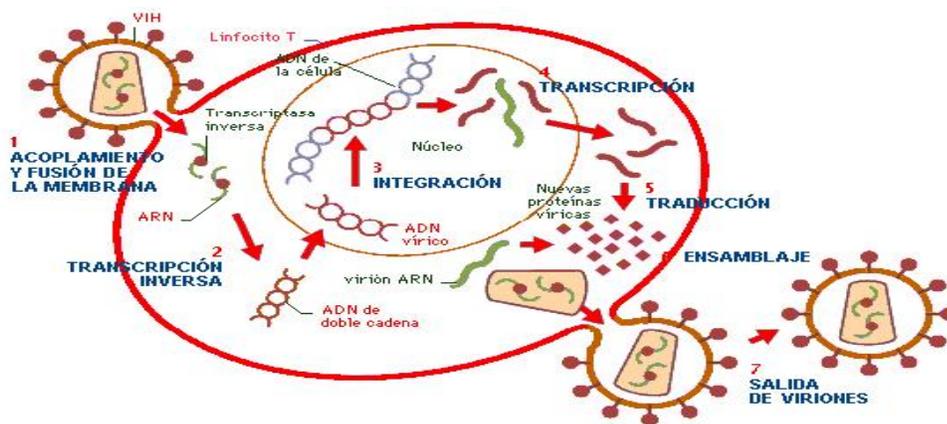


Fig. 5 Ciclo vital del VIH.

Después de la integración, el ADN retroviral (provirus) usa la maquinaria celular para expresar el ARN viral. El ARN genómico, junto a las proteínas virales, son ensamblados en la partícula viral, que sale de la célula e infecta nuevas células mediante la unión a receptores celulares específicos. (14)

### 2.1.7 Penetración del virus.

La proteína de superficie gp 120 se une al receptor de superficie CD4, este receptor se encuentra en los linfocitos T, monocitos, linfocitos B y otras células, aunque CD4 es el receptor primario. La interacción de CD4 con La proteína de superficie gp 120 es de vital importancia para el VIH,

permitiendo la infección y desregulación de CD4. Esto afecta la función de las células T y eventualmente permite la depleción de las células TCD4 (+) causando inmunodeficiencia en los pacientes infectados. **(14, 15)** El VIH, como otros retrovirus, infecta a las células de forma pH-independiente, a través de la fusión directa entre las membranas viral y celular, se piensa que el proceso es conducido inicialmente a través de cambios conformacionales en Env, justo después de la unión a CD4, los cuales hacen exponer dominios de fusión, localizados en la región hidrofóbica N-terminal de la subunidad transmembrana de Env. **(16, 17)** En la superficie celular humana existen otras moléculas que, junto a CD4, y actuando como cofactores, son cruciales para la eficaz entrada de VIH; destacan el receptor fusina-CCR5 o el receptor para quimiocinas CKR5. **(18, 19)**

#### **2.1.8 Síntesis del Provirus.**

Después de la penetración del virus, la cápside se desestructura y la transcriptasa reversa (RT) viral es activada, un complejo ribonucleoproteico (RNP) conocido como "complejo de preintegración" se estructura en el citoplasma de la célula infectada y es responsable de la transcripción reversa y del transporte al núcleo.

Durante la retro transcripción, las dos moléculas de ARN del virión son convertidas a una doble cadena lineal de ADN. **(20)**

#### **2.1.9 Transporte nuclear e Integración.**

El ADN proviral de doble cadena unido a proteínas es transportado al núcleo de la célula infectada, no está claro como el complejo de preintegración es transportado desde la membrana plasmática a la membrana nuclear pero se asume con la posibilidad de que Vif esté implicada en el proceso teniendo en cuenta que la proteína es empaquetada en las partículas virales de VIH asociada al core viral, el Vif

tiene la habilidad de asociarse con filamentos intermedios como la vimentina que conecta las membranas nucleares y plasmáticas. **(21,22)** Parece probable que Vif actúe como puente de unión entre el complejo de preintegración y las moléculas motoras de los microtúbulos celulares para el transporte activo hacia el núcleo. A diferencia de los oncoretrovirus, el VIH puede entrar en el núcleo de células quiescentes como los macrófagos diferenciados. **(23,24)** Uno de los primeros pasos en la importación nuclear del complejo es el reconocimiento de señales de localización nuclear (NLS) presentes en el complejo de preintegración, el proceso en cuestión está mediado por un complejo proteico heterodimérico compuesto por Importina-a (Imp-a) e Importina-b (Imp-b). Imp-a une las NLS mientras que Imp-b media la translocación a través del poro nuclear. Tanto la Matriz (MA) como la integrasa (IN) portan secuencias NLS y se sabe que interaccionan con miembros de las Importinas. **(25,26)** El ADN del VIH es integrado en el genoma celular a través de la acción de la integrasa (IN) viral en sitios localizados al azar, aunque se han descrito regiones de alta probabilidad de integración. **(27,28)** Se sabe que el ADN viral lineal es el sustrato directo para la integración siendo inviable la integración de formas circularizadas. El provirus integrado es homólogo al ADN viral excepto que se eliminan algunos nucleótidos de cada extremo además de la presencia, en ellos, de cortas repeticiones procedentes del genoma del huésped. La integración requiere que la integrasa (IN) reconozca los extremos del ADN viral, la integrasa (IN) cataliza la eliminación de dos pares de bases de los extremos 3' de cada cadena de ADN viral exponiendo un dinucleótido (CA), muy conservado entre todos los retrovirus. Este ADN viral procesado es unido entonces a los extremos 5' del ADN celular, previamente cortados, a través de una reacción de transesterificación. **(29,30)** Las enzimas celulares reparan entonces las uniones generando las repeticiones cortas que flanquean las secuencias virales. La proteína Nef está implicada en la regulación de la infectividad viral. **(31,32)** De hecho, hay similitudes considerables entre los fenotipos derivados de

defectos en Vif y en Nef. Para ambas proteínas, los defectos se manifiestan en un paso muy temprano del ciclo viral y se caracterizan por niveles reducidos en la síntesis de ADNc. **(33)**

#### **2.1.10 Expresión génica.**

El LTR 5' contiene un promotor/activador y el LTR 3' contiene un eficiente sitio de poliadenilación, la transcripción del provirus, vía ARNpol II celular, da lugar a un transcrito primario que tiene dos importantes funciones: puede servir como ARN genómico para ser incorporado en el virión, o bien ser procesado para proveer todos los ARN mensajeros (ARNm) que codifican las proteínas virales. El promotor del VIH es regulado por factores celulares y virales y su actividad varía dependiendo del estado celular. En muchas células de individuos VIH positivos la expresión del virus es indetectable. De este modo, puede existir un estado de latencia en células individuales aunque la infección esté crónicamente activa debido a la expresión continua de VIH en una fracción de las células. La proteína Tat incrementa en gran medida la expresión del promotor de VIH. Esta proteína es la que permite la alta expresión de ARNm en los primeros momentos posteriores a la infección. Mientras que la activación de Tat conduce básicamente a la obtención de ARNm maduros, la proteína Rev (regulación postranscripcional) regula el balance entre ARNm pre y post Splicing. La activación de Rev conduce la última etapa de la expresión viral donde el ARNm que no ha sufrido Splicing predomina. La función de Rev dirige el balance de la expresión de las proteínas virales a través de un feedback negativo; la disfunción de esta proteína conduce al estancamiento del virus en un estado en el que domina un patrón ineficaz de la expresión génica. **(34,35)**. En la mayoría de las células, la transición desde la primera etapa de la expresión viral (producción de Tat y ARNm maduros) a la última (producción de Tat y Rev con expresión eficiente de todos los ARNm virales) ocurre con rapidez (horas). Aunque pueden detectarse muchas células conteniendo

el genoma de VIH pero sin expresión proteica, parece que sólo unas pocas pueden bloquearse en las primeras etapas de la expresión viral. **(36)**

#### **2.1.11 Ensamblaje del virión.**

Las proteínas estructurales traducidas se van acumulando dentro de la membrana plasmática. La proteína Gag interacciona con Env que está embutida en la membrana plasmática. La multimerización del precursor Pr55gag lleva consigo el inicio de la formación de la partícula. Junto a Pr55gag, algunas Pr160gag-pol son también incorporadas al virión. Dos moléculas de ARN genómico son también encapsuladas junto a las moléculas de ARNtLys. La integración de Pr160gag-pol a la partícula permite la activación de la misma. El corte ordenado de Pr160gag-pol y Pr55gag dirige la maduración de la partícula y su inmediata liberación. Este es un paso esencial para la producción de viriones infectivos, ya que las partículas virales conteniendo las moléculas precursoras no son infectivas. El proceso descrito permite que se inicie también la maduración y activación de otras enzimas virales. La RT está asociada con el complejo ARNgenómico-ARNt e inicia la retrotranscripción si hay disponibilidad de nucleótidos trifosfato (dNTP). Las proteínas accesorias Vif y Vpr y posiblemente Nef son también incorporadas al virión junto con las proteínas celulares], jugando un papel importante en el proceso de ensamblado. Una de las peculiaridades de VIH es el requerimiento de ciclofilina A (CyPA) para la infectividad del virus CyPA, una chaperona con actividad peptidil isomerasa tiene un papel general en el plegamiento proteico y se cree que interacciona directamente con Gag del VIH. Probablemente sea necesaria para el correcto plegamiento de Gag. **(37,38)**

## **2.2 Resistencia a la terapia antiretroviral (TARV) en la Infección por el Virus de Inmunodeficiencia Humana.**

La terapia antiretroviral (TARV) ha reducido la morbi-mortalidad asociada a la infección por VIH esto debido a que ha permitido disminuir la carga viral (CV) a niveles indetectables, restaurar secundariamente el sistema inmune evidenciado por el aumento del recuento de linfocitos T CD4 (+) y disminuir la transmisión del VIH.(39,40) A pesar de estos efectos beneficiosos, en diversos estudios poblacionales demuestran que entre 30 y 63% de los pacientes presentan resistencia a los medicamentos antiretrovirales al año de haber iniciado tratamiento; la resistencia es un problema no sólo en pacientes con falla virológica, sino también en pacientes NAÏVE (vírgenes a tratamiento) debido a transmisión de virus resistentes. (41,42) La resistencia a ARVs está definida por la aparición de mutaciones, principalmente sobre el gen pol, en específico a nivel de la transcriptasa reversa (TR), proteasa viral (P) e integrasa (IN); la resistencia puede derivar de problemas en la adherencia, potencia inadecuada de los fármacos, problemas farmacocinéticas, o bien, resistencia preexistente. Varios factores influyen en el desarrollo de resistencia a los ARVs y dependen por un lado del virus, como es la alta tasa de mutaciones espontáneas debido a errores en la acción de la TR ( $3 \times 10^{-5}$ ), lo que explica la alta variabilidad genética del VIH, pero también contribuyen, la alta tasa replicativa del virus y su renovación ( $10^8$ - $10^9$  partículas virales al día). La resistencia a la TARV se define entonces, como la pérdida total o parcial de la susceptibilidad del virus a los ARVs, por la presencia de mutaciones. (43,44)

### **2.2.1 Resistencia primaria o transmitida**

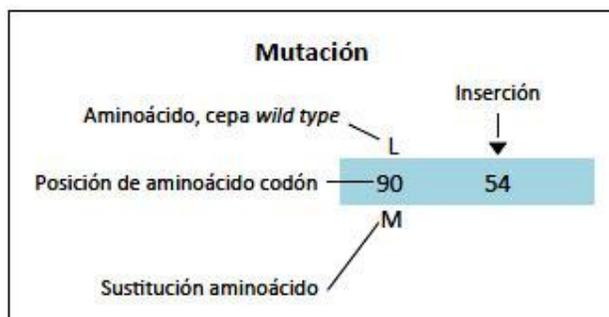
Es aquella que se presenta en pacientes que no han recibido aún TARV, debido a la adquisición de un virus que posee mutaciones asociadas a

resistencia; en la actualidad se habla más bien de resistencia transmitida.(45)

### 2.2.2 Resistencia secundaria o adquirida

En pacientes en tratamiento antirretroviral TARV, bajo la presión selectiva de los ARVs, el grado de resistencia que presentan el virus a los ARVs depende de la barrera genética de cada fármaco en particular o grupo de ARVs. La resistencia secundaria o adquirida está definida por el número de mutaciones que se requiere para provocar resistencia; fármacos con una baja barrera genética pueden requerir de una sola mutación para producir resistencia, como es el caso de lamivudina con la mutación M184V o efavirenz con la mutación K103N; una alta barrera genética en cambio, está definida por un gran número de mutaciones necesarias para inducir resistencia, como es el caso de la mayoría de los IP. (46) Otro concepto importante es el de la hipersusceptibilidad que pueden conferir algunas mutaciones específicas sobre algunos ARVs. Así por ejemplo, la mutación M184V, que causa resistencia a lamivudina y emtricitabina, confiere hiper-susceptibilidad a AZT, o la mutación K65R asociada a resistencia a tenofovir (TDF), y que confiere resistencia cruzada a la mayoría de los INTR, ocasiona hiper-susceptibilidad a AZT. Así también, las mutaciones I50L y N88S, que causan resistencia a atazanavir, confieren hiper-susceptibilidad a la mayoría de los otros IP. (47)

### 2.2.3 Nomenclatura de las mutaciones



**Fig. 6 Características de una mutación. (Llibre M J, Shapiro M J)**

Es importante recordar que en el genoma, cada codón está representado por tripletes de nucleótidos, los que se identifican por una letra que corresponde a cada base nitrogenada, A: adenina, T: timidina, C: citosina, y G: guanosina. A su vez, cada triplete o codón codifica para un aminoácido determinado, el que a su vez se identifica por una letra específica, por ejemplo, M: metionina, V: valina, K: lisina, R: arginina ; las mutaciones se denominan según el aminoácido que sea reemplazado en un codón determinado; así por ejemplo, en la mutación M184V el aminoácido original (cepa salvaje) es metionina (M), el número representa la posición del codón en el genoma (184) y a continuación sigue el aminoácido reemplazante (mutante), en este caso valina (V). **(48)**

#### **2.2.4 Resistencia a Inhibidores de Proteasa**

En el caso de los Inhibidores de Proteasa (IP), estos ARVs presentan una alta barrera genética, por lo que, para provocar resistencia a un determinado fármaco, es necesaria la presencia de varias mutaciones, por lo general tres o más. Actualmente, se ha identificado más de 20 mutaciones de resistencia en el gen de la proteasa , a pesar de que existe un alto grado de resistencia cruzada entre saquinavir, nelfinavir, indinavir y ritonavir, hay mutaciones primarias que son relativamente específicas para cada fármaco, por ejemplo D30N para nelfinavir, I50L para atazanavir, I50V para fosamprenavir y darunavir y G48V para saquinavir, entre otros tipranavir y darunavir son Inhibidores de Proteasa (IP) de segunda generación, siendo este último el de mayor diferentes IP con las mutaciones primarias y secundarias asociadas a resistencia.

Con menor frecuencia se presentan mutaciones en el gen *gag*, las que pueden causar resistencia a los Inhibidores de Proteasa (IP,) y que no son identificadas en los estudios genotípicos habituales, los que analizan el gen *pol*, generalmente éstas van acompañadas a mutaciones en la

proteasa y rara vez se presentan aisladamente en pacientes con resistencia a Inhibidores de Proteasa (IP). (49,50)

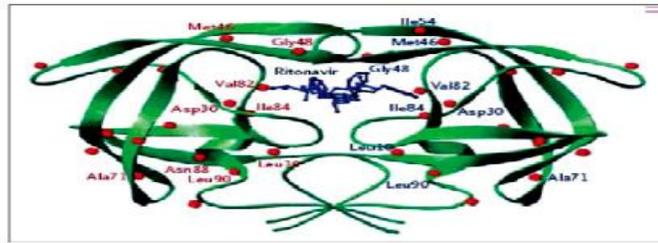


Fig. 7 Estructura de la proteasa y posiciones donde frecuentemente se desarrollan mutaciones asociadas a resistencia (adaptado de Clavel F, et al. HIV drug resistance. N Engl J Med 2004; 350 (10): 1023-35).

Mutaciones en el gen de la proteasa asociadas a resistencia a inhibidores de proteasa<sup>a,p,q</sup>

Atazanavir +/- ritonavir <sup>r</sup>	L	G	K	L	V	L	E	M	M	G	I	F	I	D	I	I	A	G	V	I	I	N	L	I
	10	15	20	24	32	33	34	36	46	48	50	53	54	60	62	64	71	73	82	84	85	88	90	93
	I	F	E	R	I	I	I	F	I	L	I	V	L	L	E	V	L	V	C	S	T	A	A	T
	F	V	E	M	I	I	F	I	L	L	L	V	M	E	V	L	V	C	S	T	A	A	T	
	V																							
Darunavir/ ritonavir <sup>r</sup>	V				V	L			I	I	I								T	L		I	L	
	11				32	33			47	50	54							74	76		84	89		
	I				I	F			V	V	M							P	V		V	V		
Fosamprenavir/ ritonavir <sup>r</sup>	L				V				M	I	I	I						G	L	V	I	L	L	
	10				32				46	47	50	54					73	76	82	84	90			
	F				I				I	V	V						S	V	A	V	M			
	I								I	L	V	M								A	F	S	T	
	R																							
	V																							
Indinavir/ ritonavir <sup>r</sup>	L	K	L	V	M				M	I	I	F	I				A	G	L	V	V	I	L	
	10	20	24	32	36				46		54						71	73	76	77	82	84	90	
	I	M	I	I	I				I		V						V	S	V	I	A	V	M	
	R								L								V	T	A	F	T			
	V																							
lopinavir/ ritonavir <sup>r</sup>	L	K	L	V	L				M	I	I	F	I				L	A	G	L	V	I	L	
	10	20	24	32	33				46	47	50	53	54			63	71	73	76	82	84	90		
	F	M	I	I	F				I	V	V	L	V	L		P	V	S	V	A	V	M		
	I	R							L	A	V	L	A	M	T	S					A	F	T	
	R																							
	V																							
Nelfinavir <sup>r</sup>	L			D	M				M								A	V	V	I	N	L	L	
	10			30	36				46								71	77	82	84	88	90		
	F			N	I				I								V	I	A	V	D	M		
	I								L								T	I	F	T	S			
Saquinavir/ ritonavir <sup>r</sup>	L								G		I	I	A	G	V	V	I	L	L					
	10			24					48		54	62	71	73	77	82	84	90						
	I			I					V		V	V	V	S	I	A	V	M						
	R										L	V	T			F	T	S						
	V																							
Tipranavir/ ritonavir <sup>r</sup>	L			L	M		K	M	I		I	Q	H	T	V	N	I	L	L					
	10			33	36		43	46	47		54	58	69	74	82	83	84	89						
	V			F	L		T	L	V		A	E	K	P	L	D	V	I	M					
				I	V						M	V	R		T			V						

Fig.8 Mutaciones asociadas con resistencia a los diferentes IP (adaptado de Johnson VA, et al. Update of the drug resistance mutations in HIV-1: December 2010. International AIDS Society-USA).

#### **2.2.4.1 Mecanismos de resistencia a inhibidores de proteasa**

La resistencia a los Inhibidores de Proteasa (IP) está mediada por cambios estructurales en el bolsillo de unión a estos ARVs, determinando reducción de la afinidad por los Inhibidores de Proteasa (IP). Las mutaciones en otros sitios de la proteasa son menos obvias y parecen involucrar mecanismos de alteración en la catálisis enzimática, estabilidad del dímero enzima-sustrato, alteraciones en la cinética enzimática o perturbaciones estructurales mayores. La resistencia a los IP en general se desarrolla lentamente, ya que requiere acumulación de mutaciones.

La presencia de dos o más mutaciones primarias claves (M46I/L, I50V, I54M/L/V, V82A/F/T/S, I84V y L90M), generalmente confiere resistencia cruzada a otros IP. Las mutaciones en los codones 10, 20, 36, 63, 71, 77 y 93 se encuentran fuera del sitio activo de la enzima y no se asocian a altos niveles de resistencia; sin embargo, contribuyen a ella al asociarse a las otras mutaciones. Las mutaciones en los codones 10, 20, 36 y 71 ocurren hasta en 5 a 10% de los pacientes vírgenes a tratamiento, como parte del polimorfismo de la enzima.

La posición de mayor polimorfismo de la proteasa es el codón 63 (45% de los pacientes vírgenes a tratamiento) y cuando se observan pacientes tratados con múltiples IP, la prevalencia aumenta hasta en 90%. **(50,51)**

#### **2.2.5 Resistencia a Inhibidores de Integrasa (IIN)**

La integrasa del VIH es una enzima formada por 288 aminoácidos y es altamente conservada, está codificada por el gen *pol* al igual que la TR y la proteasa, hasta la fecha se dispone de un inhibidor de integrasa aprobado por la FDA de E.U.A. en 2007: raltegravir, otro ARV de la misma familia es elvitegravir, pero aún no comercializado. Las mutaciones se encuentran fundamentalmente próximas al centro catalítico de la enzima, entre las posiciones 66 y 155. Los estudios BENCHMRK-1 y 2 son los ensayos clínicos que proporcionaron inicialmente mayor información

sobre las posibles vías de resistencia a raltegravir, los resultados muestran que la resistencia a raltegravir se produce principalmente por las siguientes vías: selección de una histidina (H) en la posición 155, selección de diversas mutaciones en la posición 148 y cambios en la posición 143. Los sujetos que han seleccionado la mutación N155H de forma aislada, al continuar la presión farmacológica, seleccionan gradualmente otras mutaciones que incrementan el grado de resistencia al fármaco. Estas mutaciones secundarias son varias: L74M, E92Q, T97A, G140S, G163K/R, V151I y D232N, no se define un patrón predominante. Por el contrario, en los pacientes que desarrollan resistencia a raltegravir seleccionando cambios en la posición 148, sí existe un patrón de resistencia predominante: Q148H + G140S, el impacto en la susceptibilidad a raltegravir de estas mutaciones en ensayos *in vitro* muestra que, tanto N155H como los cambios en la posición 148, reducen significativamente (más de 10 veces) la sensibilidad al fármaco.

(52)

	66	92	121	138	140	143	147	148	153	155	263
Cons	T	E	F	E	G	Y	S	Q	S	N	R
Raltegravir		Q	Y	AK	AS	RCH	G	HRK		HS	
Elvitegravir	I	Q	Y	AK	AS		G	HRK	Y	HS	K

En rojo se marcan las mutaciones asociadas a reducción > 10 veces de la susceptibilidad. Adaptado de <http://hivdb.stanford.edu> (noviembre 6, 2009)

Fig.9 Mutaciones asociadas con resistencia a los diferentes IIN (adaptado de Johnson VA, et al. Update of the drug resistance mutations in HIV-1: December 2010. International AIDS Society-USA).

### 2.3 Dinámica poblacional de la resistencia

Una de las características más importante del virus es su alta variabilidad genética, lo que permite la formación de variantes virales con capacidad para evadir el sistema inmune, cambiar el tropismo celular y desarrollar resistencia a medicamentos antirretrovirales, las cuales pueden permanecer como poblaciones minoritarias o, de acuerdo al ambiente,

expandirse e influir en el desenlace clínico y en la respuesta al tratamiento.

La transcriptasa reversa del virus se considera la principal fuente de mutaciones, mientras que la segunda mayor contribución a la diversidad del virus es dada por el intercambio de segmentos o recombinación entre dos genomas ARN durante el proceso de duplicación del genoma **(53)**.

La tasa de mutación se define como el número de bases incorrectas que son incorporadas en el genoma del virus en cada ciclo de replicación; esta varía entre  $3,4 \times 10^{-5}$  a  $2,4 \times 10^{-5}$  sustituciones/nucleótido/ciclo replicativo teniendo en cuenta que el genoma viral es de aproximadamente  $10^4$  nucleótidos, se puede asumir que aproximadamente una cuarta parte de los viriones nacientes presentan mutaciones **(54)**.

Dado que el genoma del VIH está compuesto por dos copias de ARN de cadena sencilla y que un individuo puede infectarse simultáneamente con dos subtipos o dos variantes diferentes, estos saltos durante la transcripción reversa llevan a la formación de partículas virales con genomas recombinantes que pueden contener varias mutaciones que conducen a multirresistencia **.(55)**

La ocurrencia de tales cambios genéticos no necesariamente se expande a la totalidad de la población viral. En ausencia de un factor de selección - como lo puede ser el tratamiento antiviral- dichos mutantes y recombinantes pueden permanecer como variantes minoritarias. El tratamiento con fármacos antirretrovirales puede seleccionarlos positivamente y llevarlos a constituirse en la subpoblación predominante. A su vez, la suspensión del tratamiento puede reversar dicho efecto y llevar a los mutantes resistentes de nuevo a una proporción minoritaria.

Una sola mutación o una combinación particular de mutaciones pueden conferir resistencia a varios medicamentos de la misma clase, esto es, resistencia cruzada. El número de mutaciones requeridas para conferir resistencia y el costo en la eficacia biológica de estas mutaciones constituyen la llamada “barrera genética a la resistencia”, que, en general,

es más alta para los IP y más baja para los INNTR y algunos INTR como lamivudina y emtricitabina . **(56)**

#### **2.4 Mutaciones más comunes asociadas a resistencia a medicamentos antirretrovirales**

El estudio genético de los diferentes aislados virales permite identificar las diferentes mutaciones asociadas con resistencia a los medicamentos antirretrovirales, si se identifican en al menos una de las siguientes situaciones : a) en experimentos in vitro que confirmen la contribución a la resistencia usando mutagénesis dirigida; b) por evaluación de la disminución de la susceptibilidad in vitro a los antirretrovirales en aislados clínicos o cepas de laboratorio; y c) por correlaciones entre la secuencia del genoma viral (genotipo) y la respuesta virológica en pacientes que se expusieron al tratamiento . **(57)**

Así, se han podido catalogar las principales mutaciones que generan resistencia a cada uno de estos fármacos las cuales pueden ser consultadas en las bases de datos de resistencia a antirretroviral como la de la Universidad de Stanford (<http://hivdb.stanford.edu/>), la del Laboratorio Nacional Los Álamos del Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos (LANL) (<http://www.hiv.lanl.gov/content/index>) y la del Departamento de Salud Nacional del Reino Unido de Resistencia a Medicamentos (<http://www.hivrd.org.uk/>).

#### **2.5 Variabilidad genética del VIH-1**

Las tasas de mutación de los virus ARN, incluidos los retrovirus, se estimó en  $10^{-3}$  a  $10^{-5}$  sustituciones por nucleótidos (s/nt) por ronda de copia (88-90). La base bioquímica de esta alta tasa de mutación es la ausencia, en la replicasa y la transcriptasa inversa (TI) de los virus ARN, de la actividad correctora (exonucleasa 3'- 5'), asociada a muchas ADN polimerasas

celulares. De acuerdo con ello, la TI del VIH-1 in vitro muestra también una alta tasa de error, estimada en  $10^{-3}$  a  $10^{-4}$  sustituciones por nucleótido. (58) La variación genética de los virus ARN no sólo puede ocurrir por mutaciones puntuales (transiciones y transversiones) sino también por inserciones y supresiones, por recombinación homóloga (entre secuencias muy parecidas) y no homóloga (entre secuencias distintas) y por reordenamiento de segmentos en virus de genoma segmentado. (59)

Los análisis filogenéticos basados en las secuencias génicas del VIH-1, principalmente de los genes gag y env, han revelado cuatro grandes grupos (2): M (principal, del inglés main), O (externo, del inglés outlier), N (no M, no O, del inglés, non M, non O) y P. A su vez del grupo M se han identificado subtipos que van del A al D, F-H, J y K. En los subtipos A y F se distinguen sub-subtipos designados como A1, A2, A3, A4 y F1, F2. (60) Los virus de un mismo subtipo difieren de un 15 a un 20% en la envoltura, mientras que los de diferentes subtipos difieren entre un 25 y un 35%. Las secuencias nucleotídicas del VIH-1 identificadas solo tienen un 50% de homología con las del VIH-2. En este último se distinguen 8 grupos denominados con las letras de la A a la H. (61)

La recombinación constituye una fuente adicional de variación del VIH y desempeña un papel esencial en su evolución y en la expansión geográfica de los subtipos. La generación de retrovirus recombinantes requiere que dos virus infecten una célula, bien simultáneamente, a través de un episodio único de transmisión, bien de forma secuencial, en varios episodios. En el VIH-1, la recombinación se puede producir entre diferentes cepas del mismo subtipo (intra-subtipo), distintos subtipos (inter-subtipo) o diferentes grupos (inter-grupo). (62)

Las formas recobinantes FRs del VIH-1 son mucho más prevalentes de lo admitido hasta la fecha, con una distribución geográfica mucho más amplia. Esto se aplica no sólo a las forma recobinates circulantes CRF,

forma recombinante FR idénticas en al menos tres individuos no relacionados desde el punto de vista epidemiológico. También, y de forma más significativa, se puede ver en las formas recobinante única URF, que son las encontradas en un único individuo o en varios que están relacionados epidemiológicamente. **(63)**

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. **(64)**

La nomenclatura actual de CRF y los criterios para definir las se adoptaron en 1999. Según estos criterios, para definir una CRF, se deben caracterizar tres virus sin relación epidemiológica entre ellos, con idénticos patrones de recombinación y agrupación consistente en árboles filogenéticos. De los tres virus se necesita tener secuenciado, al menos, dos genomas completos ( 8 kb). Las CRF se designan con números consecutivos a medida que se van describiendo, seguido por los subtipos parentales, o cpx cuando derivan de más de dos subtipos parentales. Hasta el momento se han identificado 52 CRF originadas en todos los continentes. **(65)**

La recombinación in vitro puede ligar mutaciones en el VIH-1 y aumentar la resistencia a un determinado antirretroviral o generar virus multirresistentes. 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. **(66)**

Las poblaciones de virus ARN se replican como distribuciones complejas de genomas diferentes pero genéticamente relacionados a los que se les denomina cuasiespecies (88). 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. **(67)**

Toda población de virus ARN presenta una secuencia nucleotídica promedio, también llamada secuencia consenso, que tiene en cada posición el nucleótido más frecuente del conjunto de moléculas de la población. La cuasiespecie constituye un reservorio de variantes víricas, que presentan un amplio rango de fenotipos respecto a virulencia, tropismo, cinética de replicación y composición antigénica. El tamaño poblacional es de gran importancia en la heterogeneidad genética. En un individuo infectado por VIH-1 pueden existir de  $10^9$  a  $10^{12}$  viriones, con un recambio de virus y de células infectadas muy elevado. **(68)**

## **2.6 Distribución geográfica de los subtipos del VIH-1**

La distribución geográfica de subtipos del VIH-1 es un proceso dinámico, dada la gran movilidad de la sociedad humana moderna. Aparecen subtipos en áreas donde no se habían descrito con anterioridad. La generación de FRs contribuye ampliamente a ésta diversidad, la que se vislumbra en aumento con la diseminación de subtipos a nivel global. **(69)**

Las formas genéticas con mayor prevalencia en todo el mundo son los subtipos A, B, C, D, y G y las FRs CRF01\_AE y CRF02\_AG. El subtipo A se localiza principalmente en Madagascar y Rusia, el subtipo B está expandido globalmente, con predominio en América del Norte, el Caribe,

América Latina, Europa occidental y Australia. El subtipo C es el responsable de más del 40% de todas las infecciones a nivel mundial y se concentra en el sur y este de África y en la India. El subtipo D circula en el sudeste de África. El subtipo G tiene su mayor prevalencia en Nigeria y la República Democrática del Congo. La CRF01\_AE predomina en el sudeste de Asia, mientras que la CRF02\_AG lo hace en el África occidental. La mayor diversidad del VIH-1 se encuentra en África central. **(70)**

## **2.7 Ensayos para determinar resistencia a los antirretrovirales**

En la actualidad existen varias técnicas, entre estudios genotípicos y fenotípicos, para realizar análisis de la resistencia en pacientes con infección por VIH. **(71)**

Las mutaciones asociadas a resistencia se presentan generalmente en el contexto de la presión selectiva que ejercen los fármacos ARVs, por lo que al suspender o discontinuar la terapia, las cepas mutantes, por su menor capacidad replicativa en relación a la cepa salvaje, se van transformando en poblaciones minoritarias (menos del 20%), y no podrán ser detectadas por las técnicas habituales de genotipificación.**(72)** Al reinstalar los fármacos a los que se desarrolló resistencia o con resistencia cruzada, puede resultar una rápida reaparición de las cepas mutantes, la acumulación de resistencia a múltiples clases de ARVs, deja al paciente sin opciones de terapia efectiva, llevando a progresión de la enfermedad y muerte. **(73)**

Los estudios de genotipificación detectan la presencia de mutaciones relacionadas con resistencia en el genoma viral, las cuales se basan en la amplificación génica, mediante la reacción de polimerasa en cadena (RPC), de las regiones del gen pol, cuya secuencia nucleotídica es posteriormente analizada. **(74)**

Los estudios de fenotipificación, por su parte, miden la inhibición de la replicación viral o de la actividad enzimática de la Transcriptasa Reversa (TR) y de la proteasa viral, a diferentes concentraciones de fármacos

específicos. Estas técnicas son más costosas y más complejas de realizar que los estudios genotípicos. **(75)**

La mayoría de las recomendaciones de los estudios de genotipificación concuerda en indicar su uso frente a fracaso virológico, respuesta virológica sub-óptima, mujeres embarazadas con los mismos criterios anteriores, accidentes laborales, y primoinfección, dependiendo de la epidemiología local, principalmente indicada en países con niveles de resistencia primaria o transmitida > 5 a 10%. **(76)**

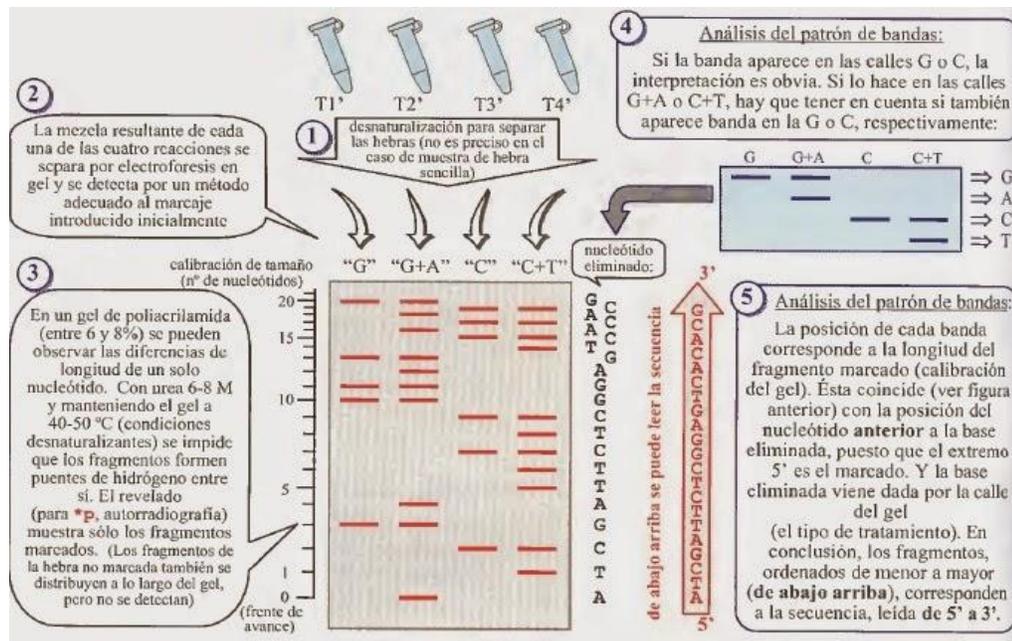
### **2.7.1 Ensayos genotípicos para determinar la resistencia del VIH-1**

Los ensayos genotípicos constan de dos etapas: **la amplificación** de la región específica (genes *gag* y *pol*) y **la detección de mutaciones**. La amplificación se realiza mediante técnicas de PCR y la detección de mutaciones puede realizarse por 3 técnicas diferentes: **secuenciación de ADN, hibridación y ensayos de sondas en línea**. La secuenciación de ADN es el método de referencia, en ella se determina la secuencia de nucleótidos de las regiones del genoma anteriormente amplificadas y se comparan con secuencias de referencia del VIH-1, para determinar la presencia de las diferentes mutaciones. La secuenciación puede ser por método químico conocido como el Método de Maxam y Gilbert, y el método enzimático conocido como el Método de Sanger y la Pirosecuenciación que es una modificación del Método de Sanger considerada de última generación. **(40)**

#### **2.7.1.1 Secuenciación de Sanger**

Este método fue descrito por *Sanger et al* en 1977 y se lo conoce como el método de Sanger o el método con inhibidores de terminación de cadena **(77)** Se utilizan cuatro reacciones de secuenciación en paralelo para secuenciar una sola muestra. Cada reacción implica un molde de cadena sencilla, un cebador específico para iniciar la reacción, los cuatro

desoxinucleótidos estándar (dATP, dGTP, dCTP y dTTP), y ADN polimerasa. La polimerasa añade bases a una cadena de ADN que es complementario a la plantilla de cadena sencilla de la muestra. Uno de los cuatro didesoxinucleótidos (ddATP, ddCTP, dUTP o dTTP) se añade entonces a cada reacción, respectivamente, a una concentración menor que los desoxinucleótidos. La ADN polimerasa va incorporando ddNTP's a la cadena de ADN creciente haciendo que esta termine, esto se produce debido a que los ddNTP's carecen del grupo OH en el extremo 3'. Cuatro ddNTP's diferentes se utilizan de tal manera que la cadena no siempre terminan en el mismo nucleótido (A, G, C, o T). Esto produce una variedad de fragmentos de diferentes longitudes, para separar estos fragmentos se utiliza electroforesis en gel.



**Fig.10. Separación de fragmentos y análisis en la secuenciación por el método de Sanger. Detalla brevemente la secuenciación de Sanger desde la separación de la hebra (punto 1), pasando por las cuatro reacciones para separar cada nucleótido mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (paso 2 y 3), hasta llegar al análisis del patrón de banda (paso 4). Tomada de Luque y Herráez 2006.**

El inicio de la automatización de este método fue en 1986 gracias a Smith et al .La secuenciación se realiza en tiempo real, esto puede ser posible

gracias a que se agrega un fluorocromo distinto en cada una de las 4 reacciones para la síntesis, convirtiéndose en el precursor del sistema de genotipificación ViroSeq HIV-1. Actualmente existen dos sistemas cerrados para la genotipificación de VIH que amplifican la región de la proteasa y parte de la transcriptasa reversa, utilizando formas automatizadas de secuenciación. **(78)**

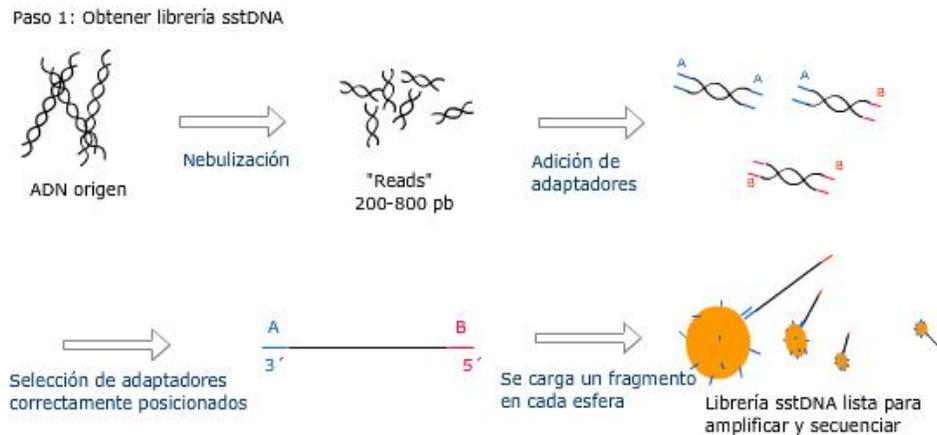
### **2.7.1.2 Pirosecuenciación**

Esta técnica fue desarrollada por *Ronaghi et al* en 1996 y uno de sus principales usos ha sido el de genotipificación. **(79)** *Eriksson et al* en el 2008, utilizó la pirosecuenciación para estimar efectivamente la población viral en pacientes con VIH, comparando 165 secuencias de 4 poblaciones virales diferentes. **(80)**

En el 2009, *Le et al* indicó que las mutaciones asociadas a resistencia de baja abundancia, puede aumentar la resistencia en el momento de fallo virológico, pero estas mutaciones suelen pasar desapercibidas en los métodos convencionales de genotipificación, demostrando así que la pirosecuenciación puede proporcionar información importante para los médicos sobre la planificación de terapias posteriores. **(81)** *Ji et al* en el 2010 demostró que la vigilancia epidemiológica de la fármacorresistencia del VIH-1 basada en pirosecuenciación agrupada es costo-competitiva para la detección de mutaciones asociadas a la resistencia en la región de la proteasa, y que al realizar modificaciones a la pirosecuenciación agrupada puede ser utilizada para determinar la tasa poblacional de mutaciones que confieren resistencia tanto en la región de la proteasa como de la transcriptasa inversa. **(82)** *Dudley et al* en el 2012 demostró que utilizando pirosecuenciación se pudo realizar secuenciación simultánea de muestras de hasta 48 pacientes, 4 veces más de otros métodos. Además este método fue 4 veces más sensible a costos 3 – 5 veces menores que en la secuenciación por el método de Sanger. **(83)**

El sistema de pirosecuenciación está basado en un sistema enzimático y ha sido utilizado para genotipificar algunos tipos de virus. **(84)**

La pirosecuenciación presenta varios pasos detallados a continuación



**Figura 11. Pasos del proceso de pirosecuenciación. (Breve descripción del procedimiento y lo que conlleva cada uno de los pasos en la pirosecuenciación. Tomada de Hernández, 2013).**

El principio del proceso de secuenciación es el siguiente, la polimerasa incorpora los nucleótidos (dNTP) correspondientes, inmediatamente después se libera una molécula de pirofosfato y la sulfurilasa genera ATP a partir de la molécula liberada. La luciferasa hidroliza el ATP y utiliza el sustrato (luciferina) para la formación de luz. La luz generada es la utilizada para la elaboración del pirograma, el cual nos servirá para realizar la lectura de secuencia. **(85)**

### **2.7.1.3 Ensayos fenotípicos para determinar la resistencia del VIH-1**

Las pruebas de resistencia fenotípicas implican la cuantificación directa de la sensibilidad al medicamento. La replicación viral se mide en cultivos celulares a concentraciones ascendentes del medicamento antirretroviral y se compara con la replicación viral del virus salvaje. Las pruebas genotípicas y fenotípicas ofrecen resultados confiables intra-ensayo e inter-ensayo. No obstante, la interpretación de los perfiles de resistencia

genotípica se ha vuelto muy compleja y requiere de la actualización constante de las normas. **(86)**

Aunque la falla del tratamiento requiere de la consideración de otros factores causales, las pruebas de resistencia son de gran importancia en el manejo y seguimiento de la terapia antirretroviral. Finalmente, es necesario enfatizar que aún con el beneficio de las pruebas de resistencia interpretadas correctamente, sólo los médicos con experiencia en el tratamiento del HIV deberían iniciar, interrumpir o cambiar la terapia antirretroviral y hacerlo, teniendo en cuenta, la situación clínica y el contexto psicosocial del paciente. **(87)**

## CAPÍTULO 3

### Metodología o diseño de la investigación.

#### 1. Desarrollo de la Investigación.

La metodología a utilizar incorpora las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para estudios de HIVDR (HIV drogo resistentes) en pacientes iniciando la toma de antirretrovirales. **(88)** Se redactó una solicitud dirigida a la dirección de Investigación, Desarrollo e Innovación del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) Dr. Leopoldo Izquieta Pérez, para registrar el trabajo y obtener el permiso correspondiente. **(Anexo 1)**

#### 2. Tipo de estudio:

Descriptivo, analítico, prospectivo y de corte transversal.

#### 3. Universo y Muestra:

- ✓
- ✓ Todos los/las pacientes adultos que vayan a iniciar tratamiento antirretroviral (TAR), en los hospitales Eugenio Espejo y Enrique Garcés de la ciudad de Quito, para realizar el estudio investigativo descrito se obtuvieron los permisos en el Departamento de Docencia e Investigación de cada hospital, además que se obtuvo autorización del Comité de Bioética.
- ✓ Debido a la dificultad de establecer el número estimado de pacientes con VIH que empiezan el tratamiento antirretroviral en cada hospital, no existe un tamaño estimado de la muestra, ésta se estableció de acuerdo al número de pacientes que acudieron al Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública Dr. Leopoldo

Izquieta Pérez de la ciudad de Quito procedentes de los hospitales seleccionados durante el periodo enero a marzo 2017 y que además cumplieron con los criterios de inclusión descritos.

#### **4. Procedimientos Éticos**

El presente estudio fue revisado y aprobado por la Comisión de Ética del Hospital de Especialidades Eugenio Espejo y Hospital Enrique Garcés de la ciudad de Quito. (**Anexo 2**)

#### **5. Consentimiento Informado.**

Los participantes fueron informados antes de la recolección de las muestras acerca de la investigación, los objetivos, posibles riesgos, beneficios y confidencialidad de los datos, las personas incluidas en el estudio firmaron de forma voluntaria un consentimiento informado escrito.

Toda la documentación fue registrada y archivada en el sistema de gestión documental del Laboratorio de Retrovirus, Hepatitis y Otros virus de Transmisión Sexual del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) Dr. Leopoldo Izquieta Pérez. INSPI-LIP de la Coordinación Zonal 9 (CZ9), en la ciudad de Quito.

Los pacientes que acudieron Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) Dr. Leopoldo Izquieta Pérez INSPI-Quito y que asintieron voluntariamente participar del presente estudio mediante firma en el consentimiento informado escrito (**Anexo 3**), se les realizó extracción de muestras de sangre.

#### **6. Colecta de especímenes**

Los pacientes elegibles fueron sometidos a extracción de muestra de sangre, se obtuvo de cada paciente 10mL de sangre total mediante tubo vacutainer con anticoagulante etilen diamino tetra acético (Edta) el cual se

dejó reposar por 15 minutos y luego fueron centrifugados a 1500rpm por 10 minutos para separar el plasma, el plasma obtenido fue alicuotado entres viales de 1 ml, los cuales fueron almacenados a -80 °C hasta su procesamiento. El procedimiento se realizó de acuerdo a lo establecido en el protocolo de toma de muestras del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) Dr. Leopoldo Izquieta Pérez INSPI. **(89)**

## **7. Cuantificación de carga viral VIH-1.**

Se utilizó uno de los viales para la cuantificación de la carga viral, la cual fue procesada siguiendo el protocolo descrito en el inserto COBAS® AMPLIPREP/COBAS® TaqMan® **(90)** de la compañía Roche, el procesamiento de las muestras fue realizado en el Laboratorio de Retrovirus, Hepatitis, y otros virus de transmisión Sexual de la ciudad de Quito.

Las muestras de plasma con carga viral VIH-1 <5000 cp/mL fueron descartadas para el estudio, los resultados obtenidos de la prueba fueron consignados en una ficha de recolección de datos propia del estudio. **(Anexo 4)**

## **8. Protocola de transporte de las muestras al CRN.**

Las dos alícuotas adicionales de plasma (2mL aproximadamente) congeladas a -80°C fueron transportadas al Centro de Referencia Nacional (CRN) de Retrovirus, Hepatitis y otros virus de Transmisión Sexual del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública Dr. Leopoldo Izquieta Pérez (INSPI) ubicado en la ciudad de Guayaquil en cajas térmicas para garantizar la conservación de la muestra y las medidas de bioseguridad.

Una vez en el INSPI-Guayaquil, el plasma fue utilizado para la prueba de resistencia y el sobrante de la alícuota fue almacenada a menos -80°C.

## 9. Prueba de Resistencia del VIH-1

Se realizó la genotipificación (secuenciación nucleotídica del **gen pol** en las regiones que codifican las proteínas de la proteasa e integrasa para la identificación de mutaciones, subtipo viral y el nivel de resistencia a los ARV, según el algoritmo diagnóstico de la Universidad de Stanford (EUA). **(91)** La prueba de resistencia se realizó en el Centro de Referencia Nacional de Retrovirus, Hepatitis y otros virus de Transmisión Sexual situado en la ciudad de Guayaquil. Para tal efecto se utilizó una alícuota de 1 mL de plasma sanguíneo a la cual se hizo la extracción del ácido nucleico, luego se amplificó el genoma usando el protocolo de PCR descrito en el sistema de detección de resistencia antirretroviral para VIH desarrollado para la plataforma de **pirosecuenciación 454 GS Junior** Para la reacción de secuencia nucleotídica se siguieron las recomendaciones del mismo. Para determinar la presencia de mutaciones asociadas o no a resistencia a los medicamentos ARV, se realizó estudios de PCR y secuencia del gen pol. Realizadas las pruebas moleculares, se usó la aplicación *DeepChek®* para el ensamblaje, edición, revisión y análisis de las secuencias obtenidas **(91)**.

### Flujo de Trabajo:

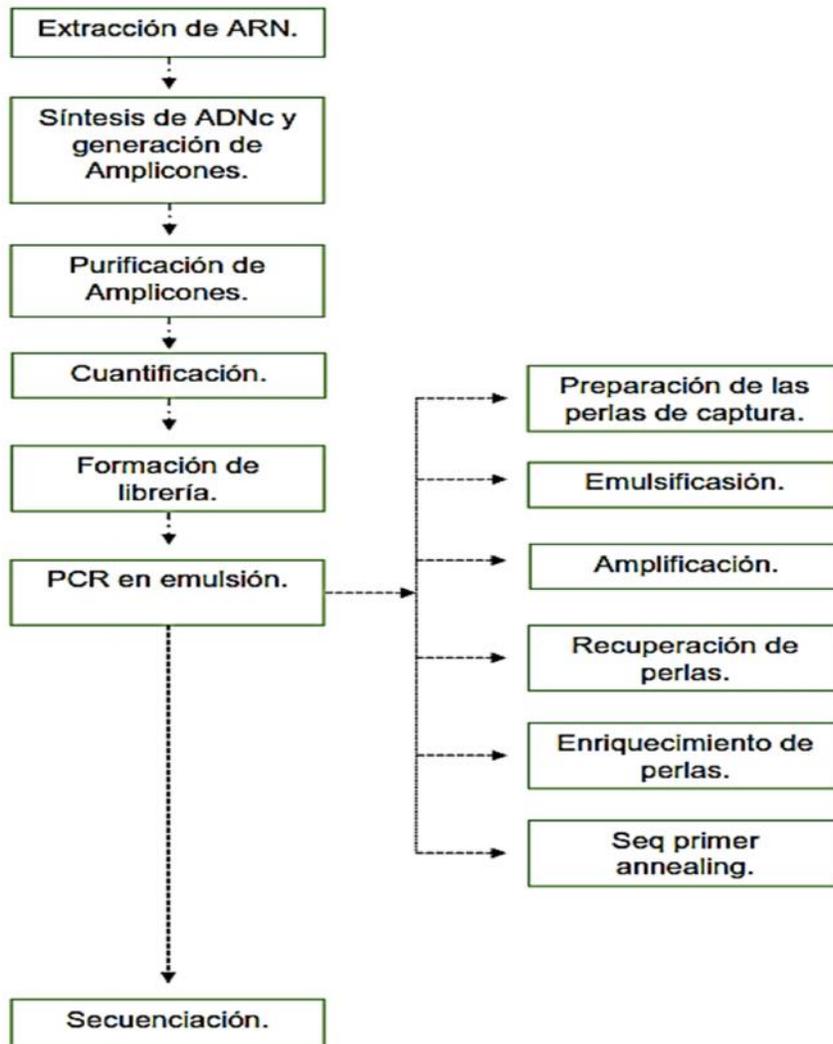


Figura 12. Flujo de trabajo. Detalla los pasos que deben realizarse en la técnica de genotipificación por pirosecuenciación.

## PROTOCOLO DE TRABAJO

### EXTRACCIÓN DE ARN

Materiales: RNase Away

High Puree Viral Nucleico Acid Large Volume Kit

(5114403001)

EtOH 100%

Falcon de 15 mL

Termoblock para falcon 15mL o baño maría

Centrifuga falcon 50mL

Centrifuga Eppendorf 1,5 MI

MS2 (10165948001)

1. Limpiar y desinfectar cabina de extracción, RNase Away, cloro, EtOH 70%, UV.
2. Prender baño maría/termoblock a 75 ° C
3. Seleccionar 10 muestras con carga viral mayor a 2000 copias/mL, un control negativo y un control positivo.
4. Preparar reactivos de High Pure Viral Nucleic Acid Large Volume Kit (5114403001)
  - Resuspenda Proteinasa k en 5,5 mL de EB y vortex (-20 ° C en alícuotas 1510 uL) (xa 6 muestras).
  - Resuspenda Poly (A) Carrier RNA en 0,65 mL de EB (-20 ° C en alícuotas 190 uL) (xa 12 muestras).
  - Agregar 20 mL de EtOH 100% a Inhibitor Removal Buffer
  - Agregar 40 mL de EtOH 100% a Wash Buffer

5. Preparar Solución 250 ng /uL de RNA Carrier MS2 (10165948001)(C1=800 ng/uL, alcanza para 1600 uL de sol 250 ng/uL )(-20 ° C en alícuotas de 30 uL ) (xa 12 muestras )
6. Transferir 1 mL (2,5 mL) e Binding Buffer + 15 uL de Poly (A) a un falcon de 15 mL.  
Homogenizar  
Agregar 1 mL (o 2,5 mL) de plasma  
Agregar 250 uL de Proteinasa K  
Homogeneizar  
Incubar 15 min a 70 ° C
7. Agregar 400 uL(o 1mL ) de Binding Buffer  
Homogeneizar
8. Transferir al reservorio superior de un High Pure Extender Assembly  
Centrifugar 10 min, 3000 xg
9. Remover el filtro del High Pure Extender Assembly y combinar con un tubo de colección  
Agregar 500uL de Inhibitor Removal Buffer  
Centrifugar 1 min, 8000 xg
10. Combinar el filtro con un nuevo tubo de colección  
Agregar 450 uL de Wash Buffer  
Centrifugar 1 min, 8000 xg
11. Combinar el filtro con un nuevo tubo de colección  
Repetir lavado con 450 uL de Wash Buffer  
Centrifugar 1 min, 8000 xg  
Descartar filtrado y volver a ensamblar con el mismo tubo de colección  
Centrifugar 30 seg a máxima velocidad
12. Combinar el filtro con un tubo Eppendorf de 1,5 mL  
Agregar 50 uL de Elution Buffer  
Incubar 1 min a TA  
Centrifugar 1 min, 800 xg  
Descartar filtro

13. Agregar 2 uL de RNA carrier MS2 250 ng/uL a cada eluido de ARN (50 uL)

14. Mantener RNA en tubos tapa rosca (-80 ° C )

### **PURIFICACION DE ARN**

Materiales: RNase Away

ARN extraído (50 uL)

Agencourt RNA Clean XP beads (81\*12=972 uL)

Vortex

Pipeta Multicanal 200 uL

Pipeta multicanal 10 uL

Placa de fondo redondo

Separador Magnético de placa

EtOH 70% recién preparado (200\*12\*3= 7200 uL)

15. Limpiar y desinfectar cabina de extracción, RNAsa Away, cloro, EtOH 70%, UV.

16. Atemperar las Agencourt RNA Clean XP beads

Vortex (3min)

Tomar una alícuota de 1ml en un Eppendorf 1,5 mL

17. Transferir 45 uL de cada ARN a la primera fila de una placa fondo redondo (A1-A12)

18. Agregar 81 uL de Agencourt RNA Clean XP beads a cada pocillo (vortex frecuentemente)

Homogeneizar por pipeteo 5 veces

19. Incubar 10 min a TA

20. Colocar en concentrador magnético e incubar por 5 min.

Descartar sobrenadante sin llevar partículas

21. Agregar 200ul de EtOH 70% con multicanal

Girar 5 veces la placa sobre el separador magnético para disgregar el pellet

Incubar 30 seg en el separador magnético

Descartar sobrenadante

22. Repetir lavado con EtOH 70% (dos veces más )

- Retirar todo el sobrenadante posible la 3ra vez  
Dejar secar al aire 5 min (cuidado no resecar)
23. Agregar 15 uL de agua UP (con placa todavía en separador magnético)
  24. Retirar la placa de separador magnético y resuspender por pipeteo 10 veces
  25. Regresar la placa al separador magnético y dejar incubar por 1 min
  26. Centrifugar placa de cDNA 30 seg, 930 xg.
  27. Transferir 13,5 uL de sobrenadante a la primera fila de la placa de

cDNA

Muestras: A1- A10

Control Positivo: A11

Control Negativo: A12

Cubrir la placa con sealing foil

Spin 30 seg, 900 rcf

### **SINTESIS DE ADNc**

Materiales:

VType HIV-1 cDNA plate

Laminas selladoras de placas

Centrifuga de placas

Vortex

Minifuge

Termociclador

Hielo picado u Cooler de placas

Cooler de tubos 1,5 mL

Tubos eppendorff 1,5 mL (x1)

Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (4896866001)

RNAse H (10786357001)

Puntas 0,5 -10

Puntas 10-100

28. Incubar la placa de cDNA en termociclador a 65 °C por 10 min  
Retirar del termociclador e incubar en hielo por 2min

Spin 30 seg ,900 rcf

Mantener el hielo

29. Preparar RT MasterMix en tubo 1,5 mL en cooler :

	X1 reacc	X1placa (16 reacc)
Transcriptor RT Reaction Buffer (85x)	4uL	64uL
PCR Nucleotide Mix (dNTPs)(10 Mm)	2 uL	32uL
Protector RNase Inhibitor (840U/UI)	0,5 uL	8uL
Transcriptor Reverse Transcriptase (20 U/uL)	0,5 uL	8uL
Vol. total	7 uL	112uL

Mezclar por pipeteo o vortex suave

Spin

Mantener en hielo

30. Remover lámina selladora de placa ADNc

Agregar 7,0 uL de RT MasterMix en cada pocillo (punta nueva para cada pocillo)

Sellar placa

Spin 30 seg, 900 rcf

31. Colocar en termociclador y correr programa de síntesis de ADNc :

50°C ,60 min

85°C, 5 min

4°C, hold (<2 hs)

32. Retirar placa de ADNc de termociclador

Spin 30 seg, 900 rcf

Colocar en hielo

33. Remover lamina selladora de placa de ADNc
34. Colocar en termociclador y correr programa de RNAsa H
  - 37°C, 20min
  - 4°C, hold (<2 hs)
35. Retirar placa de ADNc de termociclador
  - Spin 30 seg, 900 rcf
36. Mantener placa de ADNc (21,5 uL) refrigerada o congelar -80°C si no se va continuar ese día con PCR.

**GENERACION DE AMPLICONES (PCR)**

Materiales: VType HIV-1 Primerplate

VType HIV-1 cDNA, con ADNc (21,5 uL)

Laminas selladoras de placas

Centrifuga de placas

Vórtex

Minifuge

Agua UP

FastStart High Fidelity Pcr System, dNTP Pack (4738292001)

Termociclador

Cooler de placas

Cooler de tubos 1,5 mL

Tubos eppendorff 1,5 mL (x1)

Pipeta multicanal 10 uL

Puntas 0,5 -10

Puntas 10-100

Puntas 100-1000

37. Limpiar y desinfectar cabina, cloro, EtOH 70%, UV.
38. Preparar PCR Mastermix en tubo Eppendorf en cooler : En tubo de 2 ml

	X 1 reacc	X 1 reacc	placa (72)
--	-----------	-----------	------------

Agua UP	16,50 uL	1188 uL
FastStart High Fidelity Reaction Buffer w/o MgCl2 (10x)	2,50 uL	180,0 uL
MgCl2(25 Mm)	2,25 uL	162,0 uL
PCR Nucleotide Mix (10 mM each)	0,5 uL	36,0 uL
FastStart High Fidelity Enzyme Bend ( U/ uL)	0,25 uL	18,0 uL
Vol total	22,00 uL	1584,0 uL

Vortex suave por 5 seg

Mantener en hielo

39. Spin 30 seg ,900 rcf a placa de PCR

40. Agregar 22,0 uL de PCR MasterMix en cada pocillo de filas A,B,C,D y E de placa de PCR (siempre punta nueva )

41. Transferir 3,0 uL de cDNA a cada pocillo de placa de PCR con multicanal

Muestra 1 (A1 en placa cDNA) a A1, B1, C1, D1, y E1 en placa de PCR

Muestra 2 (A2 en placa cDNA) a A2, B2, C2, D2, y E2 en placa de PCR

.....  
.....

Control Negativo (A12 en placa cDNA) a A12, B12, C12, D12 E12 en placa de PCR

Sellar placas cDNA y PCR

Sin 30 seg, 900 rcf (Verificar mismo volumen en todos los pocillos)

42. Colocar placa PCR en termociclador y correr programa:

95°C, 3min

95°C, 30 seg (43 ciclos)

55°C, 20 seg

72°C, 50 seg

72°C, 8 min

4°C, 3min

43. Guardar placa con ADNc(6,5 uL) a -20° C

44. Al terminar PCR retirar la placa del termociclador

Spin placa con amplicones 30seg, 900rcf

Conservar placa con amplicones (25uL) refrigerado hasta por 5 días

0 a -20 s no se va a continuar con purificación -.

### **PURIFICACIÓN DE AMPLICONES**

Materiales: Placa concentradora de partículas magnéticas

Placa de fondo redondo

Placa 96 pocillos amarilla

AMPure XP beads (45\*12\*5=2700uL)

Placa de productos de PCR (25 uL)

Vortex

Termociclador

Centrifuga de placas

Agua UP

Pipeta multicanal 20-200 UI

Puntas 20-200

EtOH 70%

TE 1 x

45. Atemperar AMPure XP beads

Vortex

Tomar una alícuota de 3ml en un falcon

46. Agregar 22.5 uL de agua UP a cada pocillo flas A-E, columnas 1-12)

de una placa de fondo redondo con multicanal.

47. Spin placa de PCR 30 seg,900 rcf

Remover lamina selladora de placa de PCR

Transferir22, 5 uL de producto de PCR a cada pocillo de la placa de fondo redondo (manteniendo diseño)

- Sellar placa de PCR y guardar (2,5) uL a -20 °C
48. Agregar 45 uL de partículas magnéticas en cada pocillo de la placa de fondo redondo (vortex frecuentemente)
- Mezclar por pipeteo con multicanal 5 veces cada pocillo
49. Incubar placa fondo redondo a TA por 10 min
50. Incubar placa fondo redondo a TA por 5 min sobre concentrador magnético
- Descartar sobrenadante sin desarmar anillo de partículas
- (Cuidar que no pase mucho tiempo antes de agregar el EtOH para que no reseque)
51. Remover placa de fondo redondo de concentrador magnético
- Agregar 100 uL de EtOH 70% recién preparado en cada pocillo
- Colocar sobre el separador y girar cinco veces sobre el separador magnético para disgregar el pellet (golpetear 10 veces para homogenizar)
52. Incubar 1 min en el concentrador magnético
- Descartar sobrenadante sin desarmar anillo de partículas
53. Repetir lavado con EtOH 70% descartando absolutamente todo el sobrenadante
54. Dejar secar al aire sobre concentrador magnético 5-10 min , hasta que los pellets estén completamente secos (cuidar que no se resequen)
55. Agregar 22 uL de TE 1X a cada pocillo con multicanal (con la placa sobre concentrador magnético )
- Golpetear o girar sobre magneto para disgregar pellets
- Incubar placa fondo redondo a TA por 1 min aprox sobre concentrador magnético
56. Transferir el sobrenadante (20 uL) a una nueva placa de 96 (evitar pellet )
- Sellar placa

Mantener placa de amplicones purificados en refrigeración o a -20°C si no se va a continuar enseguida con cuantificación (placa por PCR)

Eliminar placa de fondo redondo

## **CUANTIFICACIÓN DE AMPLICONES POR PICO GREEM**

### **Materiales:**

Pico greem dsDNA Assay Kit

TE 1x

Vortex

Tubos eppendorff 1,5 ml (x10)

Placa de Amplicones purificados (20ul)

Placa negra de fluorómetro

Fluorómetro de placas

Pipeta multicanal 20-200ul

Pipeta multicanal 0,5-10ul

Falcon 50ml (envuelto en papel aluminio)

Puntas 0,5-10 ul

Puntas 20-200 ul

Puntas 10-100 ul

57. Descongelar ADN standard, Pico Green (proteger de luz )

58. Descongelar placa de amplicones purificados (20ul)

Spin 30 seg, 900xg

59. Rotular 10 tubos eppendorff 1,5 ml

Transferir 877,5 uL TE 1x a tubo 1 (43875)

Transferir 450,0 ul TE 1x a tubos 2-10 (225)

60. Vortex ADN standard 10 seg, Spin

Transferir 22,5 uL standard a tubo 1 (dilución1:50)

Vortex 10 seg

Transferir 450 uL de tubo 1 a tubo 2

Vortex 10 seg

Completar diluciones seriadas transfiriendo 450 ul a tubo siguiente (hasta tubo 9) y vortex 10 seg.

Tubo 10 constituye "No DNA control" y contiene solo TE 1x

61. Transferir 100,0 uL de diluciones de ADN standard a filas F y G de placa negra de fondo plano (cambiar diseño si no coincide con posición standard1 , de acuerdo a programa de fluoròmetro )

Tubo 1 pocillo F1 y G1 (250 ng/well)

Tubo 2 → pocillo F2 y G2 (125 ng/well)

Tubo 3 → pocillo F3 y G3 (62,5 ng/well)

Tubo 4 → pocillo F4 y G4 (31,25 ng/well)

Tubo 5 → pocillo F5 y G5 (15,63 ng/well)

Tubo 6 → pocillo F6 y G6 (7,81 ng/well)

Tubo 7 → pocillo F7 y G7 (3,91 ng/well)

Tubo 8 → pocillo F8 y G8 (1,95 ng/well)

Tubo 9 → pocillo F9 y G9 (0,98 ng/well)

Tubo 10 → pocillo F10 y G10 (0 ng/well)

62. Transferir 97,0 uL de TE 1x a los pocillos de muestras de la placa negra (filas A-E, columnas 1-12 )

63. Agregar 3,0 uL de amplicones purificados a pocillos de placa negra con 97 uL de TE 1x(filas A-E, columnas 1-12 ), mantener diseño  
Sellar placa de amplicones purificados (17 uL) y conservar en refrigeración

64. Transferir 8955 uL de TE 1x a falcon 50 mL (envuelto en papel aluminio)

Agregar 45 uL de Pico Green (dilución 1:200)

Vortex

65. Transferir 100,0 uL de Pico Green diluido con multicanal a cada pocillo de placa negra conteniendo Standard o amplicones  
Homogeneizar por pipeteo 4 veces
66. Medir fluorescente en fluoròmetro
67. Ingresar datos de fluorescencia en archivo. xls de cálculo de cuantificación (pestaña "Table 1 – Quant Amplicons").  
Verificar que R2 = 0,98 (puede ser necesario eliminar el punto más alto)  
Verificar que lecturas de muestras se encuentren dentro de valores de standards.

### **NORMALIZACION DE AMPLICONES Y PREPARACION DE MASTER POOL**

Materiales:

Placa de amplicones purificados (17 uL)

Placa de PCR

Puntas 0,5-10

Puntas 20-200

Tubos eppendorf

Pipetas multicanal 0,5-100 uL

Pipetas multicanal 20-100 uL

Puntas 100-1000

TE 1x

68. Ingresar datos de concentración en archivo .xls de cálculo de diluciones (pestaña "Enter Concentrations ")
69. Dilución de amplicones a  $5 \times 10^9$  moléculas /uL  
Obtener valores de dilución en pestaña "Plate 1 Dilutions".  
Transferir volumen indicado de TE 1x y amplicom purificado a una nueva placa de PCR mantener diseño.
70. Migrar lo que sobra de amplicones purificados para verificar ausencia de oligos.
71. Preparación del pool de muestras  $5 \times 10^9$  moléculas /uL

Transferir 5 uL de cada amplicón de cada muestra a fila H (antes homogeneizar)

(5ul de A1, B1, C1, D1, y E1 a H1) (5ul de A2, B2, C2, D2, Y E2 a H2).....

72. Preparación del Master pool de muestras  $1 \times 10^{10}$  moléculas /uL

Transferir 5 uL de cada pool de muestras (H1,H2....H12) en un tubo eppendorf 1,5 ml (60ul)

Homogenizar

Transferir 20 ul del master pool ( $5 \times 10^9$  moléculas /uL) a un nuevo tubo eppendorf 1,5 ml conteniendo 80 ul de TE 1x (100 ul)

73. Guardar los 20 uL restantes de cada pool de muestras  $5 \times 10^9$  moléculas/uL a  $-20^\circ\text{C}$

Guardar los 40 uL restantes de master pool  $5 \times 10^9$  moléculas /uL a  $-20^\circ\text{C}$

**PURIFICACION DE MASTER POOL**

Materiales:

Master pool  $1 \times 10^9$  moléculas/uL (100)

Partículas magnéticas

Placa fondo redondo

Placa concentradora de partículas magnéticas

EtOH 70% (400 uL)

TE 1x

Puntas 20-200

Agua UP

Tubos 1,5 ml

Vortex

74. Atemperar partículas magnéticas

Vortex 20 segundos min y alicuotar en un eppendorf 1,5 ml (100 uL)

75. Agregar 22, 5 uL de agua UP a un pocillo de una placa de fondo redondo

- Transferir 22,5 uL del Master Pool 1x10<sup>9</sup> moléculas/uL al mismo pocillo  
Agregar 45 uL de partículas magnéticas  
Homogeneizar por pipeteo al menos 10 veces
76. Incubar placa fondo redondo a TA por 10 min
77. Incubar placa fondo redondo a TA por 5 min sobre concentrador magnético  
Descartar sobrenadante sin desarmar anillo de partículas  
Cuidar que no pase mucho tiempo antes de agregar EtOH para que no se reseque
78. Agregar 100uL de EtOH 70% recién preparado en el pocillo  
Girar sobre el concentrador magnético para disgregar el pellet  
(Golpetear 10 veces par homogenizar)
79. Incubar placa fondo redondo a TA por 1 min sobre concentrador magnético  
Descartar sobrenadante sin desarmar anillo de partículas
80. Repetir lavado con EtOH 70% descartando todo el sobrenadante posible
81. Colocar plato fondo redondo en concentrador magnético y dejara secar al aire libre 5 min
82. Resuspender en 22,5 uL de TE 1x  
Girar sobre el concentrador magnético para disgregar el pellet  
(Golpetear o mover sobe el magneto para favorecer la elución)  
Incubar placa fondo redondo a TA por 1 min sobre placa magnética
83. Transferir el sobrenadante (22,5 uL) a un nuevo pocillo de la placa de fondo redondo  
Agregar 22,5 uL de agua UP  
Agregar 45 uL de partículas magnéticas  
Homogeneizar por pipeteo 5 veces al menos  
Repetir paso 76-82
84. Repetir purificación con 2 lavados de EtOH 70% (100uL)
85. Transferir todo el Master Pool doblemente purificado (22,5uL) a un nuevo tubo eppendorf

86. Eliminar placa de fondo redondo

### **CUANTIFICACION DEL MASTER POOL DOBLEMENTE PURIFICADO**

Materiales: Tubo con Master Pool doblemente purificado (22,5 uL)

Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit

TE1 x

Vortex

Tubos Eppendorf 1,5 ml (x13)

Placa negra de fluorómetro

Fluorometro de placas

Pipeta multicanal 20-200 uL

Pipeta multicanal 0,5-10 uL

Falcon 50 ml (envuelto en papel aluminio)

Puntas 0,5-10 uL

Puntas 20-200 uL

Puntas 100-1000 uL

87. Descongelar ADN standard, Pico Green (proteger de luz)

88. Rotular 13 tubos eppendorf 1,5 ml

Transferir 441,0 uL TE 1x a un tubo 1

Transferir 225,0 uL TE 1x a un tubo 2-13

89. Vortex ADN standard 10 seg

Transferir 9,0 uL de ADN standard a tubo (dilución 1:50)

Vortex 10 seg

Transferir 225 uL de tubo 1 a tubo 2

Vortex 10 seg

Completar diluciones seriadas transfiriendo 225.0 uL a tubo siguiente (hasta tubo 12) y vortex 10 seg

Tubo 13 constituye "No DNA control " y contiene solo TE 1x

Descartar tubo 1, este no se utiliza para la creación de la curva standard

90. Transferir 100,0 uL de diluciones de ADN standard a filas A y H de placa negra (cambiar diseño si no coincide con posición de standard 1, de acuerdo a programa del fluorómetro)

Tubo 2 → pocillo A1 y H1 (100 ng/well)

Tubo 3 → pocillo A2 y H2 (50 ng/well)

Tubo 4 → pocillo A3 y H3 (25 ng/well)

Tubo 5 → pocillo A4 y H4 (12,5 ng/well)

Tubo 6 → pocillo A5 y H5 (6,25 ng/well)

Tubo 7 → pocillo A6 y H6 (3,13 ng/well)

Tubo 8 → pocillo A7 y H7 (1,56 ng/well)

Tubo 9 → pocillo A8 y H8 (0,78 ng/well)

Tubo 10 → pocillo A9 y H9 (0,39 ng/well)

Tubo 11 → pocillo A10 y H10 (0,195 ng/well)

Tubo 12 → pocillo A11 y H11 (0,098 ng/well)

Tubo 13 → pocillo A12 y H12 (0 ng/well)

91. Transferir 90,0 uL de TE 1x a pocillo B1

Agregar 10,0 uL de master pool doblemente purificado a pocillo B1

Conservar tubo con el resto de master pool doblemente purificado (12,5 uL) en refrigeración

92. Transferir 2985 uL de TE 1x a falcon 50ml (envuelto en papel aluminio)

Agregar 15 uL de Pico Green (dilución 1:200)

Vortex

93. Transferir 100,0 uL de Pico Green diluido a cada pocillo de placa negra conteniendo standards o master pool

Homogeneizar por pipeteo 4 veces

94. Medir fluorescencia en fluorómetro

95. Ingresar datos de fluorescencia en tabla

Verificar que  $R^2 = 0,98$

Verificar que lecturas de muestras se encuentren dentro de los valores de standards

96. Ingresar datos de fluorescencia en archivo .xls de cálculo de cuantificación (pestaña "Table 2 –Quant 2xPurif Mast Pool")

Verificar que  $R^2 = 0,98$

97. Ingresar dato de concentración en archivo .xls de cálculo de diluciones (pestaña "Master Pool Dilution")

Preparación de Master Pool Final 2x10<sup>6</sup> moléculas /uL (el mismo día de la emPCR)

Obtener valores de dilución en pestaña "Master Pool Dilution"

Mezclar la cantidad indicada de TE 1x y Master Pool doblemente purificado para obtener master Pool final 2x10<sup>6</sup> moléculas /uL

## **Em PCR**

Materiales:

Master pool de amplicones doblemente purificado (12.5 ul )

GS Junior emPCR Reagents (Lib-A) (059965380019)

GS Junior Titanium emPCR Kit oil and Breaking Kit (059965380019)

Agua UP

Cooler

Puntas 0,5-10 uL, 20-200 uL ,100-1000 uL

Vortex

Minifuge

Termoblock

Centrifuga

IKa Turrax

Falcon 50 ml

Falcon 15 ml

Termociclador

Placas para Termociclador

Laminas selladoras de placas

Kimwipes

Pipeta repetidora

Combitip

98.- Descongelar reactivos de emPCR (Exepto Mix y PPIase)

Vortex 5 seg

Spin 10 seg

Dejar a TA

99.- Vortex Additive (tapa negra ) e incubar a 55°C hasta que este totalmente transparente (se pueda ir preparando Mock Mix 1x y Pre emulsion )

100.- Preparacion de Live Amp Mix A

Spin al aditivo antes y tomar de arriba para evitar partículas

Vortex 5 seg

Dejar en hielo

Agua	205 ul
Aditivo(tapa negra)	260 ul
Amp mix (tapa verde claro)	135 ul

Amp primer A	40 ul
Enzyme Mix (tapa verde oscuro)	35 ul
Ppiase (tapa rojo)	1 ul
Total	676 ul

101.- Preparacion de Live Amp Mix B

Spin al aditivo antes y tomar de arriba para evitar partículas

Vortex 5 seg

Dejar en hielo

Agua	205 ul
Aditivo(tapa negra)	260 ul
Amp mix (tapa verde claro)	135 ul
Amp primer B	40 ul
Enzyme Mix (tapa verde oscuro)	35 ul
Ppiase (tapa rojo)	1 ul
Total	676 ul

102.- Lavado de esferas de captura Ay B

Agregar 4,5 ml de agua UP + 0,5 ml de Wash buffer concentrado (8tapa marrón) en un falcon (Wash buffer 1x)

Vortex y spin a Capture Beads A (tapa violeta) y Capture Beads B (tapa azul oscuro) (c/u con 5.000.000 esferas de captura)

Agregar 1 ml de Wash buffer 1x a cada uno

Vortex

Centrifugar 13000 rcf 1 min .Girar 180° - Centrifugar 13000 rcf 1 min  
(spin-rotate-spin)

Descartar sobrenadante (igual no todo)

Repetir lavado con 1 ml Wash buffer 1x

Vortex

Spin-rotate-spin

Descartar sobrenadante totalmente (10 ul )

**103. Preparación de Master Pool Final 2x10<sup>6</sup> moléculas/ul ( el mismo día de la empPCR)**

Obtener valores de dilución en pestaña “Master Pool Dilution”

Mesclar la cantidad indicada e TE 1x y Master Pool doblemente purificado para obtener Master Pool final 2x10<sup>6</sup> moléculas/ul

**104. Dilución de librerías a 1 cpb**

Agregar 2,5 ul de librería (Master Pool final 2x10<sup>6</sup> moléculas/ul) al tubo de esferas de captura

A lavadas

Agrehar 2,5 ul de librería (Master Pool final 2x10<sup>6</sup> moléculas/ul) al tubo de esferas de captura

B lavadas

Vortex 5 seg (no homogeneizar con punta para no perder las esferas)

**105. Preparación del Mock Mix 1x**

Vortex y spin al Mock Mix (tapa naranja)

Colocar en un tubo falcon de 15 ml 1,72 ml de H<sub>2</sub>O UP +430 ul de Mock Mix

Vortex

#### **106. Pre – emulsión**

Vortex 10 seg al tubo de emulsión oil

Verter todo el contenido en el turrax stirring tube

Agregar los 2ml del Mock mix 1x por la pared

Encender Ika Turrax Programa 1:4000 rpm 5 min

#### **107. Emulsificacion**

Agregar 600 ul de Live Mix B al tubo de librería + esferas de captura B

Vortex (no homogenizar con punta)

Verter todo el contenido en el turrax stirring tube (con punta 1000 ul por la pared, no enjuagar en la emulsión)

Encender Ika Turrax Programa 2:2000 rpm 5 min

Agregar 600 ul de Live Mix A al tubo de librería + esferas de captura A

Vortex

Verter todo el contenido en el turrax stirring tube (con punta 1000 ul por la pared, no enjuagar en la emulsion)

Encender Ika Turrax Programa 2: 2000 rpm 5 min

#### **108. Amplificación**

Dispensar 100 ul de emulsión con combitip en cada pocillo de una placa nueva (debe alcanzar para aprox 70 pocillos)(cuidado burbujas)

Si se ensucia algo de la parte superior limpiar con Kimwipe

Sellar placa (muy imp bien sellado)

Colocar placa en termociclador e iniciar programa de amplificación  
(aprox 6 hs)

	94°	4 min
	94°	30 seg
50 ciclos	58°	4,5 min
	68°	30 seg
	10°	hold
Retirar antes de las 16 hs		

#### **RECUPERACION DE ESFERAS**

**Materiales:** Sistema de vacio

GS Junior Titanium emPCR Kit Oil and Breaking Kit  
(05996511001)

GS Junior Titanium emPCR Kit Bead Recovery  
Reagents (05996490001)

Isopropanol x 120 ml

Falcon 50 ml

Vortex

Centrifuga

Minifuge

Puntas 0,5-10 uL

Puntas 20-200 uL

Puntas 100-1000 uL

Reservorios pa multicanal

Centrifuga de tubos falcon

Etanol 100%

109. Atemperar enhacing buffer
110. Retirar placa de termociclador y verificar que no se haya roto la emulsion (se ve como algodón o más de 2 fases)
111. Armar sistema de vacio (guardar la tapa del falcon)  
Colocar isopropanol en cubeta (aprox 30 ml)  
Probar sistema recuperando isopropanol
112. Colocar 80-100 ul de isopropanol en cada pocillo (no botar las puntas)  
Aspirar con peineta multicanal y sistema de vacio en un falcon 50 ml
113. Dispensar 100 ul isopropanol en cada pocillo con pipeta multicanal  
Homogenizar por pipeteo con multicanal (no botar puntas)  
Volver a aspirar por vacío
114. Repetir lavado con 100 ul isopropanol  
Volver a aspirar por vacío  
(pueden ser necesarios más lavados si todavía están turbios los tubos)
115. Aspirar el resto del isopropanol que estaba en la cubeta para limpiar la peineta  
(esto puede guardarse refrigerado hasta x 2 semanas)  
Apagar sistema de vacío y tapar falcon  
Lavado de esferas
116. Aforar falcon a 35 ml con isopropanol  
Vortex  
Centrifugar 5 min x 3037 r.p.m 930g (3 fases: isopropanol + aceite – azúcar – esferas)  
Descartar sobrenadante lo más que se pueda (x inversión)

117. Resuspender en 10 ml de enhancing buffer bien atemperado  
Vortex (no ayudar con nada, solo vortex)  
Centrifugar 5 min x 3037 r.p.m, 930g ( 2 fases: enhancing buffer + azúcar – esferas)  
Descartar sobrenadante totalmente (cuidado aca pellet menos compacto)
118. Agregar 40 ml de isopropanol  
Vortex rápidamente para que no precipite  
Centrifugar 5 min x 3037 r.p.m, 930g  
Descartar sobrenadante lo más que se pueda
119. Repetir lavado con 40 ml de isopropanol  
Vortex rápidamente para que no precipite  
Centrifugar 5 min x 3037 r.p.m, 930g  
Descartar sobrenadante lo más que se pueda
120. Agregar 40 ml de EtOH 100%  
Vortex rápidamente para que no precipite  
Centrifugar 5 min x 3037 r.p.m, 930g  
Descartar sobrenadante lo más que se pueda  
(cuidado, pellet de esferas no tan firme)
121. Agregar 40 ml de enhancing buffer  
Vortex  
Centrifugar centrifugar 5 min x 3037 r.p.m, 930g  
Descartar sobrenadante dejando 1 – 2 ml aprox
122. Transferir a un eppendorf siliconado de 1,7 ml ( no botar la punta, dejarla dentro del falcon)  
Spin – rotate – spin  
Descartar sobrenadante  
Aca ya se puede colocar en el JBC para ver si están los 10.000.000 de esferas
123. Lavar el falcon con 1 ml de enhancing buffer  
Transferir al eppendorf con las esferas con l punta que estaba adentro

- Vortex  
Spin – rotate –spin  
Descartar sobrenadante
124. Agregar 1ml de enhancing buffer  
Vortex  
Spin – rotate –spin  
Descartar sobrenadante
125. Repetir lavado con 1 ml enhancing buffer  
Vortex  
(dejar en enhancing buffer mientras se lavan esferas de enriquecimiento)  
Spin – rotate –spin
126. Colocar en el JBC y verificar si hemos recuperado el 85% de esferas (8.500.000)

## **ENRIQUECIMIENTO DE ESFERAS**

Materiales:

tubo con esferas lavadas (aprox 8.500.000)

termoblock

NaoH 10 N

GS Junior Titanium emPCR kit Bead Recovery Reagents  
(05996490001)

GS Junior emPCR Reagents (Lib-A) (05996538001)

Agua UP

Puntas

Minifuge

Vortex

Cubeta con hielo

Lab Quake rotator

MPC

Junior Bead Counter

127. Prender termoblock a 65°
128. Preparar Melt solution en un falcon: 125 µl de NaOH 10N + 9,875 ml de agua UP

Lavado de esferas de enriquecimiento (estreptavidina) (tapa transparente)

129. Vortex al tubo de esferas de enriquecimiento por 1min  
Colocar en MPC magnética 3min  
Descartar sobrenadante
130. Agregar 500u µl de enhancing buffer  
Vortex  
Colocar en MPC 3 min (mov de tirabuzón con muñeca para que bajen las de la tapa)  
Descartar sobrenadante
131. Repetir lavado con 500 µl de enhancing buffer  
Vortex  
Colocar en MPC magnética 3min  
Descartar sobrenadante
132. Resuspender en 80 µl de enhancing buffer  
Vortex  
Conservar en refrigeración

Preparación para el enriquecimiento

133. Spin – rotate – spin al tubo de esferas de ADN lavada (aprox 8.500.000)  
Descartar sobrenadante
134. Resuspender en 1 ml de melt solution  
Vortex  
Incubar 2 min a TA  
Spin – rotate - spin  
Descartar sobrenadante ( guardar para purificación y migrar )
135. Repetir lavado con 1 ml de melt solution

- Vortex  
Incubar 2 min a TA  
Spin – rotate - spin  
Descartar sobrenadante ( guardar para purificación y migrar )
136. Resuspender en 1ml de annealing buffer (neutralizar pH, cond para hibridación)  
Vortex  
Spin – rotate - spin  
Descartar sobrenadante
137. Retir lavado con 1ml de annealing buffer (dos veces)  
Vortex  
Spin – rotate - spin  
Descartar sobrenadante
138. Agregar 45 µl de annealing buffer + 15 µl de primer de enriquecimiento A ( tapa morado claro) + 15 µl de primer de enriquecimiento B ( tapa celeste claro) (biotina)  
Vortex  
Incubar 5 min a 65° en termoblock  
Colocar inmediatamente en hielo y dejar 2 min
139. Agregar 1 ml de enhancing buffer (eliminar primers no unidos)  
Vortex  
Spin – rotate – spin  
Descartar sobrenadante
140. Repetir lavado con 1 ml de enhancing buffer ( 2 veces)  
Vortex  
Spin – rotate – spin  
Descartar sobrenadante
141. Resuspender en 1 ml de enhancing buffer  
Vortex  
Conservar en refrigeración

Enriquecimiento de esferas con ADN

142. Agregar 80  $\mu$ l de esferas de enriquecimiento lavadas al tubo de esferas con ADN (1ml)  
Vortex  
Incubar en Lab-Quake 5min
143. Colocar en el MPC  
Esperar a que se peguen 3 - 5 min  
Girar el tubo 180°  
Esperar a que se peguen 3 - 5 min sobre la otra pared  
Descartar sobrenadante, eliminado la mayor parte de esferas blancas, sin remover las marrones, terminar con punta de 200  $\mu$ l
144. Lavar esferas con 1 ml de enhancing buffer (6 - 10 veces)  
Vortex  
Colocar MPC  
Invertir / girar 180°  
Descartar sobrenadante hasta que solo quede transparente (hasta que el sobrenadante se vea como pellet de ARN después de spin)

Colección de esferas con ADN enriquecidas

145. Retirar el tubo con esferas enriquecidas del MPC  
Resuspender en 700  $\mu$ l de melt solution  
Vortex 5 seg  
Colocar en MPC hasta que se forme pellet  
Transferir sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf siliconado
146. Agregar otros 700  $\mu$ l de melt solution al tubo de enriquecimiento  
Vortex 5 seg  
Colocar en MPC hasta que se forme pellet  
Transferir sobrenadante al mismo tubo  
Descartar tubo de enriquecimiento
147. Spin – rotate – spin el tubo de esferas enriquecidas (1400  $\mu$ l)  
Descartar sobrenadante
148. Agregar 1 ml de annealing buffer (neutralizar pH)  
Vortex

Spin – rotate – spin

Descartar sobrenadante

149. Repetir lavado con annealing buffer (2 veces )

Vortex

Spin – rotate – spin

Descartar sobrenadante

150. Resuspender en 100 µl de annealing buffer

Vortex

#### Hibridación con primers de secuenciación (disminuir acción de nucleasas)

151. Agregar 5 µl de sequencing primer A (tapa rosada) + 15 µl de sequencing primer B (tapa celeste oscuro)

Vortex

Incubar 5 min a 65°

Colocar en hielo 2 min

152. Agregar 1 ml de annealing buffer

Vortex

Spin – rotate – spin

Descartar sobrenadante

153. Repetir lavado con 1 ml de annealing buffer (2 veces)

Vortex

Spin – rotate – spin

Descartar sobrenadante

154. Resuspender en 1 ml annealing buffer

Vortex

Spin – rotate – spin

155. Medir % de recuperación de esferas enriquecidas en JBC (debe ser 5 – 20%)

156. Conservar en refrigeración hasta por 2 semanas.

#### **CORRIDA DE SECUENCIACION**

##### **Materiales:**

Tubo con esferas enriquecidas (1ml)  
Cubeta con hielo  
GS Junior Titanium Sequencing Reagents and Enzymes  
(05996562001)  
GS Junior Sequencing Buffers (05996589001)  
GS Junior Packing Beads (05996597001)  
bandeja con hielo  
Lab rotator  
Centrifuga de placas  
BDD  
PTP  
Vortex  
Minifunge  
Centrifuga  
Falcon 50 ml  
Agua UP  
Puntas 100 - 1000  
Puntas 20 - 200  
Puntas 0,5 – 10  
Tween-20 al 10%  
EtOH 50%  
Kimwipes  
Zeiss tissue

#### Preparación de reactivos de secuenciación

157. Retirar la lámina selladora del contenedor de reactivos y enzimas  
Colocar los tubos de 2.0 ml en hielo para descongelar  
Llenar el contenedor con agua corriente TA  
Descongelar en agua el cassette de reactivos y el tubo de Substrate  
TW (forrar con papel aluminio) en el agua en posición vertical (no  
sumergir) dentro de la caja protegidos de la luz

Invertir 3 veces periódicamente

Una vez descongelados conservar a 2-8°C hasta su utilización protegidos de la luz.

158. Retirar Packing Beads (tapa verde) y Supplement CB de refrigeración y conservar en hielo hasta su utilización

#### Encender GS Junior Sequencer y ordenador

159. Encender ordenador

Esperar hasta que aparezca ventana de login

Encender GS Junior

Esperar hasta LED (rojo solido) – (rojo parpadeante) – (amarillo sólido)

Esperar Selft-Test, LED (ciclos verde amarillo rojo) - (amarillo sólido)

Login en PC (User: *Admiring*; Password: *Am@r@nto2011/P@tomol2012*)

Ingresar a la aplicacion GS Junior System

#### Pre-wash

160. Ingresar a la aplicación GS Junior Sequencer

Presionar *Sign in*

Presionar ícono Star

Seleccionar *Squencing*

Presionar botón *Next*

Presionar botón *Proceed*

161. Levantar cubierta del equipo y sipper manifold

Ensamblar Buffer Sipper Tube con filtro en el manifold, sin tocar la parte a utilizar de los tubos

Ensamblar Reagents Sipper Tubes con filtros en manifold

162. Cambiar guantes

Enjuagar cassette de pre-wash con pre-wash buffer ( 2 veces)

Llenar los 10 tubos del cassette con pre-wash buffer hasta 1 cm del tope

Montar cassette de pre-wash en equipo

Colocar botella de pre-wash buffer en la posición izquierda

Colocar botella para residuos en la posición derecha

Bajar sipper manifold

Verificar que haya PTP usada cargada en el equipo

Cerrar cubierta del equipo

163. Presionar ícono *Proceed* en aplicación GS Junior Sequencer

Monitorear equipo hasta que estatus LED esté verde parpadeando

Durante pre-wash continuar con preparación de PTP device

#### Preparación de Bead Buffer 2 (BB2)

164. Homogenizar Supplement CB por inversión ( no vortex)

Transferir 6.6 ml de supplement CB a la botella de Buffer CB (sin que se haga espuma)

Mezclar por inversión 10 veces

Conservar en hielo

165. Centrifugar tubo de Apyrase (tapar amarilla) a 9300g 5 g (destruye nt libres)

Transferir 6,5 µl de Apyrasa al falcon BB2

Conservar en hielo

#### Preparación de PTP y BDD

166. Retirar PTP de caja y anotar condigo de 6 dígitos

167. Lavar loading gasket (son azulitos, se cogen con una punta de 1000ml) y cartridge seal en un falcon con agua UP. Sacar con una punta y secar con un Kimwipe

168. Lavar BDD con un cepillo suave y agua UP

Secar con kimwipe

169. Cambiar guantes

Ensamblar BDD

Cargar 350 µl de BB2 (echar el BB2 solo hasta el 1er paso de la pipeta

Centrifugar a 1620 g, 5 min

Preparación de esferas ADN

Homogenizar tubo de esferas con ADN enriquecidas (vortex suave)

Calcular vol correspondiente a 500.00 esferas por regla de 3

Transferir una alícuota correspondiente a 500.000 a un nuevo tubo eppendorf siliconado spin – rotate – spin

Corregir vol si es necesario para tener 500.000(lo mas cercano posible, siempre es mejor no pasarse)

Retirar sobrenadante (quedan aprox 50µl de vol)

Centrifugar tubo control beads XTLF ( tapa negra) a 9300g, 5 seg

Homogenizar por pipeteos 5 veces

Transferir 6 µl al tubo de esferas enriquecidas

Agregar 500 µl de bb2 al tubo de esferas enriquecidas + control beads

Vortex suave

Incubar 20 min en lab rotator TA

#### Lavado de esferas empaquetamiento

170. Agregar 1 ml de BB2 al tubo DE Packing beads ( tapar verde claro)

Vortex high speed

Centifugar a max velocidad 5 min

Retirar sobrenadante

171. Repetir lavado con 1ml BB2 (2 veces más)

172. Resuspender en 200ul de BB2

Vortex high speed

Conservar en hielo

#### Lavado y preparación de esferas den enzimas y PPIase

173. Agregar 1 ml de BB2 a tubo de Enzyme Beads (tapa café) y PPIase Beads ( tapa verde oscuro)

Vortex médium speed

- Colocar tubos en MPC 30 seg  
Movimiento de tirabuzón para bajar las tapa esperas otros 30 seg en MPC  
Descaratr sobrenadante  
Retirar tubos de MPC
174. Repetir lavado con 1ml de BB2 (2 veces más)
175. Resuspender Enzyme Beads en 400 ul de BB2 (capas 1 y 3 )  
Resuspender Ppiase Beads en 410 ul de BB2 (capa 4)  
Vortex médium speed  
Conservar en hielo
176. Rotular un nuevo tubo Enzyme Pre- Layer (capa1)  
Agregar 300 ul BB2 mas 110 ul Enzyme Beads  
Vortex medium speed  
Conserver en hielo
177. Rotular un nuevo tubo Enzyme Post- Layer (capa 3)  
Agregar 300 ul BB2 mas 110 ul Enzyme Beads  
Vortex medium speed  
Conserver en hielo
178. Preparación de mix de esferas de ADN y de empaquetamiento(capa 2)  
Retirar el tubo de esferas de ADN del Lab rotator  
Centrifugar 9300 g 10 seg.  
Remover sobredanante hasta dejar aprox 50 ul de vol final (500 ul )
179. Spin tubos de Polimerasa 8tapa blanca) y Polymerase cofactor (tapa celeste)  
Agregar 40 ul de polymerase + 20 ul de Polymerase Cofactor +85 ul de BB2 al tubo de esferas de ADN (estable por 50 min)  
Vortex low speed 5 seg.  
Incubar 10 min en el lab rotator a TA  
Polimerasa se coloca en ext 3"de primers (U estable por 50 min)

180. Una vez completa la incubación vortex tubo de Packing beads high speed  
Agregar 175 ul de Packing beads al tubo de esferas de ADN  
Vortex low speed  
Incubar 5 min en lab rotator a TA
181. **Depósito de capa de esferas 1 : Enzyme Beads Pe – Layer**  
Retirar sobrenadante de BBD (350 ul )  
Vortex tubo de Enzyme Pre – Layer a low speed 5 seg  
Cargar 350 ul de suspensión de Enzyme Pre –Layer  
Centrifugar a 1620 g, 5 min
182. **Preparación de Buffer CB**  
Vortex tubo de DTT (tapa naranja) a high speed 5 seg  
Agregar 1 ml de DTT a botella de Buffer CB
183. Homogenizar tubo de Substrato TW por inversión 10 veces  
Transferir 44ml de Substrate TW a botella de Buffer CB
184. Homegenizar botella de Buffer CB por inversión 10 veces  
Guardar protegida de la luz
185. **Depósito de capa de esferas 2: DNA y Packing beads**  
Retirar sobrenadante de capa 1 BBD (350 ul )  
Retirar tobo de mix de esferas de ADN y empaquetamiento de lab rotator  
Spin 9300 g 5 seg  
Homogenizar por pipeteo 5 veces  
Cargar 350 ul de mix esferas de ADN y empaquetamiento en BDD  
Centrifugar a 1620 g, 10 min
186. Levantar cubierta de instrumento y sipper manifold  
Remover y descartar cassette y botella de pre-wash  
Vaciar botella de desecho en posición derecha
187. Cambiar guantes  
Homogenizar cassette de reactivos por inversión 20 veces  
Remover tapas  
Montar cassette de reactivos en equipo

- Colocar botella de Buffer CB n posición izquierda  
Bajar sipper manifold y cerrar cubierta
188. Presionar icono Proceed en aplicación GS Junior Sequence (5min)
189. **Depósito de capa de esferas 3: Enzyme Beads Post – Layer**  
Cambiar guantes  
Retirar sobrenadante de capa 2 del BDD ( liq blanquecino),  
centrifugar y comprobar si se depositó el 50 % (250.000)  
Vortex tubo de Enzyme Beads Post- Layer a médium speed 5 seg  
Cargar 350 ul de suspensión de Enzyme Beads Post-Layer en BDD  
Centrifugar a 1629 g, 10 min
190. Preparación del PTP cartridge  
Remover PTP de corrida previa  
Remover cartridge seal con una punta
191. Cambiar guantes  
Limpiar superficie del cartridge con un Kimwipe con EtOH 50 %  
(remueve residuos y esferas)  
Dejar secar al aire
192. Colocar cartridge seal con la pestaña hacia arriba nuevo  
Limpiar superficie del cartridge con un Kimwipe con Tween-20 al 10  
(dism tensión superf, facilita entrada fluidos)
193. Limpiar cámara con un Zeiss tissue  
Dejar secar al aire
194. **Depósito de capa de esferas 4 : Ppiase Beads**  
Retirar sobrenadante de capa 3 del BDD (350 ul )  
Vortex tubo de Ppiase Beads a médium speed 5 seg  
Cargar 350 ul de suspensión de Ppiase Beads en BDD  
Centrifugar a 1620 g, 5 min
195. Ingreso de datos de corrida de secuenciación  
Ingresar código de PTP  
Presionar botón Next  
Ingresar nombre de la corrida (sin espacios)

Seleccionar Applications I  
Presionar botón Next  
Seleccionar 200 cycles  
Presionar boton Next  
Seleccionar Full processing for Amplicon libraries  
Presionar boton Next  
Confirmar que este seleccionado el check de Backup  
Presionar botón Next  
Ingresar comentarios  
Presionar botón Next  
Confirmar review de parámetros  
No presionar icono Proceed hasta cargar PTP

196. Carga de PTP en GS Junior Instrument

Retirar sobrenadante de capa 4 del BDD  
Retirar PTP del BDD (manipular por bordes)  
Colocar PTP sobre el cartridge seal  
Limpiar superficie de la cámara y de la PTP una vez colocada con una Zeiss tissue  
Cerrar puerta de cámara y cubierta del equipo

197. Presionar icono Proceed

Monitorear equipo hasta que status LED verde parpadeando

198. Una vez finalizada corrida

Remover cassette de reactivos, verificar consumo de todos y descartar  
Remover y descartar botella de residuos en posición derecha  
Vaciar botella de Buffer CB y colocarla en posición derecha para residuos  
Remover y descartar filtros y zipers  
Sacar PTP y secar superficie de cartridge con EtOH 50% (para que no se seque y precipite), dejar secar y volver a colocar  
El equipo puede permanecer así hasta 30 días  
Si no se va a volver a utilizar en 30 días realizar Maintenance Wash

199. Apagada

Presionar botón Exit

Seleccionar checkbox Stop instrument

LED (amarillo solido) – (rojo parpadeante) – (ciclos verde amarillo rojo 9- (ciclos lentos verde amarillo rojo negro)

200. Apagar GS Junior cuando el Led este en ciclos lentos con negro entre rojo y verde

201. Apagar PC(System/Shutdown)

## 10. Análisis de la resistencia

Las mutaciones que confieren resistencia a los ARV, el subtipo viral, y los niveles de resistencia se identificaron mediante el algoritmo de interpretación de resistencia genotípica de Stanford **HIVdb** utilizando la aplicación *DeepChek*®.

Para facilitar el análisis, los niveles de resistencia definidos en este algoritmo fueron re-clasificados en 3 niveles:

**Según el algoritmo de Stanford:**

<b>S</b>	Sensible (S)
<b>I</b>	Resistencia intermedia (I)
<b>R</b>	Resistencia de alto nivel (R)

**Tabla I. Clasificación del nivel de resistencia según algoritmo de Standford. (91)**

## CAPÍTULO 4 RESULTADOS.

Se estudiaron 10 muestras de pacientes con diagnóstico de VIH positivo sin tratamiento antirretroviral (*Naïve*). La mediana de la edad fue de 25 años, con predominio del sexo masculino (80%). La mediana del recuento de células T CD4+ más cercana al momento de la toma de muestra fue de 93cel/uL y la de carga viral de 22214 copias/mL.

**Tabla II. Características de los pacientes y resultados de laboratorio.**

Pacientes (n)		10
Edad en años al muestreo	25	(19-46)
Masculino:	8	(80%)
Femenino:	2	(20%)
Conteo de células T CD4+	93	(3-210)
Cuantificación de ARN viral VIH-1 (carga viral).	22214	(5125-190648)

**Fuente:** Hoja de Trabajo de Laboratorio. Centro de Referencia Nacional de Retrovirus, Hepatitis y otros virus de Transmisión Sexual. Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública. “Dr. Leopoldo Izquieta Pérez”. Coordinación Zonal 9. Quito.

**Autora:** Tatiana Sivisaca

En relación a las mutaciones del virus en las 10 muestras analizadas se detectó un total de 41 mutaciones para el gen de la Proteasa las cuales le describen en la **Tabla III**:

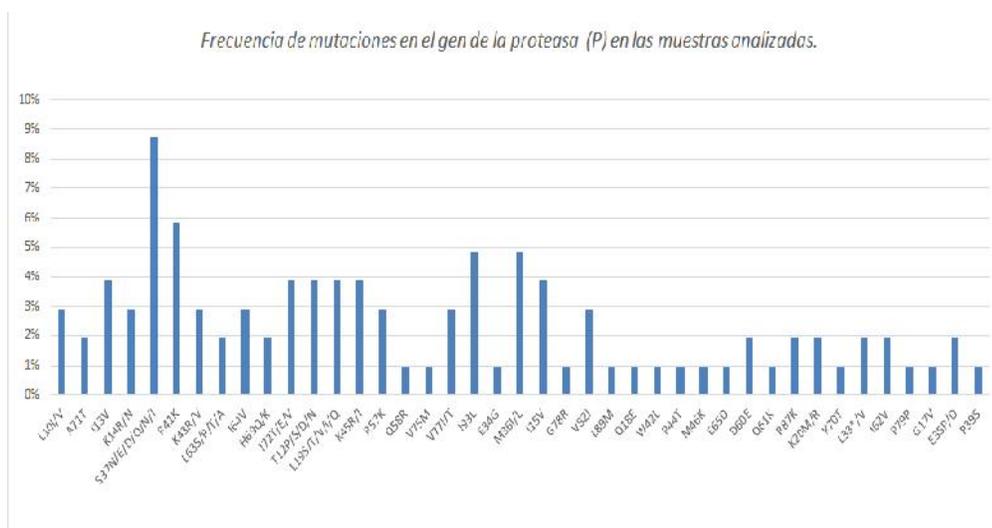
**Tabla III. Frecuencia de mutaciones en el gen de la proteasa (P) en las muestras analizadas.**

<b>Identificación de la muestra</b>	<b>Mutaciones Proteasa</b>
Plate1_Column01 11/05/2017	L10I/V; A71T; I13V; K14R/N; S37N/E/D/Q/N/I; R41K; K43R/V; L63S/P/T/A; I64V; H69Q/K; I72T/E/V
Plate1_Column02 11/05/2017	T12P/S/D/N; L19S/T/V/I/Q; K45R/I; R57K; Q58R
Plate1_Column03 11/05/2017	V75M; V77I/T; I93L
Plate1_Column04 11/05/2017	E34G; M36I/L
Plate1_Column05 11/05/2017	I15V; G78R; V82I; L89M
Plate1_Column06 11/05/2017	Q18E; W42L; P44T; M46K; E65D
Plate1_Column07 11/05/2017	D60E; Q61K; R87K
Plate1_Column08 11/05/2017	K20M/R; K70T
Plate1_Column09 11/05/2017	AL33*/V; I62V; P79P
Plate1_Column10 11/05/2017	G17V; E35P/D; P39S

**Fuente:** Informe de genotipado clínico DeepChek –HIV, Análisis de Mutaciones.

**Autora:** Tatiana Sivisaca

**Figura 13. Frecuencia de mutaciones en el gen de la Proteasa (P) en las muestras analizadas.**



**Fuente:** Informe de genotipado clínico DeepChek –HIV, Análisis de Mutaciones.

**Autora:** Tatiana Sivisaca

**Interpretación de los resultados :** En las 10 muestras analizadas se detectó un total de 41 mutaciones para el gen de la Proteasa, en donde prevaleció **S37N/E/D/Q/N/I**, seguido **R41K**, **I95L** y **M36I/L** entre las más destacadas ; sin embargo 3 están asociadas con resistencia a los **(IP)**, **A71T**, **L10I / V** y **V82I**; las mutaciones **A71T** son mutaciones accesorias polimorfas seleccionadas por inhibidores de proteasa **(IP)** que aumentan la replicación de virus asociados con otras, puede ocasionar resistencia a los medicamentos antiretrovirales; las mutaciones **L10I / V** es una mutación accesoría polimorfa que aumentan la replicación de virus si se encuentra asociada con otras mutaciones en el mismo gen puede ocasionar resistencia a los medicamentos antiretrovirales, ésta mutación se detectó en dos de las muestras analizadas.

La mutación **V82I** es una mutación altamente polimórfica que no es seleccionada por **IPs**, es el aminoácido de consenso en los virus del subtipo G.

En relación a las mutaciones del virus en las 10 muestras analizadas se detectó un total de 24 mutaciones para el gen de la Interasa las cuales le describen en la **Tabla IV**:

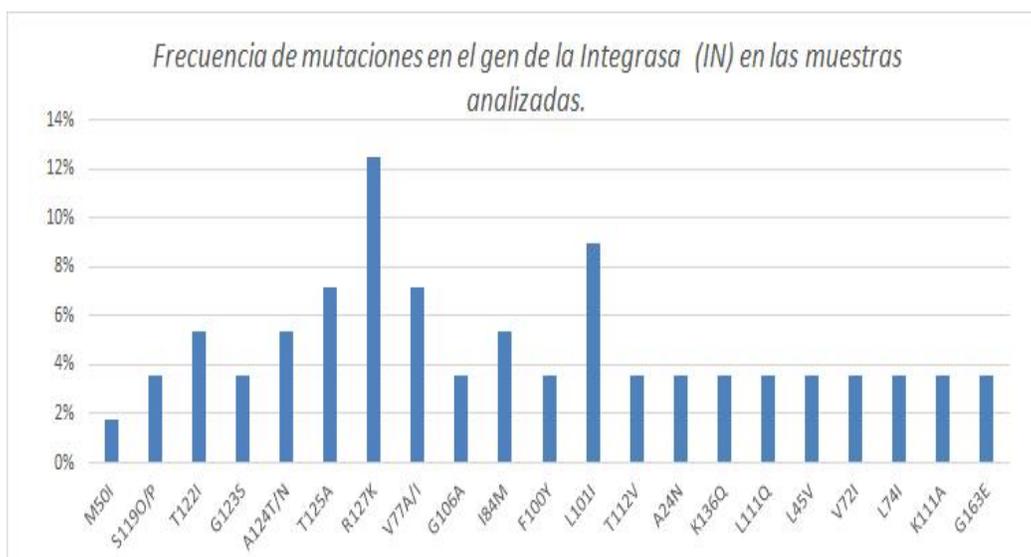
<b>Identificación de la muestra</b>	<b>Mutaciones Proteasa</b>
Plate1_Column02 11/05/2017	M50I; S119O/P; T122I; G123S; A124T/N; T125A; R127K
Plate1_Column03 11/05/2017	V77A/I; G106A
Plate1_Column04 11/05/2017	I84M, F100Y, L101I, T112V, A24N, K136Q
Plate1_Column08 11/05/2017	L111Q
Plate1_Column10 11/05/2017	L45V; V72I; L74I; K111A; G163E

**Tabla IV. Frecuencia de mutaciones en el gen de la integrasa (IN) en las muestras analizadas.**

**Fuente:** Informe de genotipado clínico DeepChek –HIV, Análisis de Mutaciones.

**Autora:** Tatiana Sivisaca

**Figura 14. Mutaciones en el gen de la Integrasa (RT) en las muestras analizadas.**



**Fuente:** Informe de genotipado clínico DeepChek –HIV, Análisis de Mutaciones.

**Autora:** Tatiana Sivisaca

**Interpretación de los resultados:** En las 10 muestras analizadas se detectó un total de 24 mutaciones para el gen de la Integrasa, en donde la mutación más frecuente fue **R27K** seguido de **L110I**, **T125A** y **V77A/I** entre las más destacadas, sin embargo 1 está asociada a resistencia a los (IIN), **L74 M/L**; las mutaciones restantes no confieren resistencia conocida. Las mutaciones **L74 M/L** son mutaciones polimórficas accesorias seleccionadas comúnmente por cada uno de los INSTIs. En los pacientes no tratados con ARV, el **L74M** ocurre en el 0,5% al 10% de los pacientes y el **L74I** ocurre en el 3% al 20% de los pacientes dependiendo del subtipo. Solamente, **L74M / I** tiene efecto mínimo, si es que existe alguno, sobre la susceptibilidad de INSTI. Sin embargo, ellos parecen contribuir a reducir la susceptibilidad a cada uno de los INSTI cuando se producen con las principales mutaciones de resistencia INSTI.

En relación a la resistencia a los medicamentos antiretrovirales inhibidores de proteasa e integrasa en las 10 muestras analizadas no se detectó nivel de resistencia lo cual se describe en la **Tabla V**:

**Tabla V. Nivel de resistencia genotípica del VIH-1 a las drogas antirretrovirales inhibidores de la Proteasa (P) e Integrasa (I)**

Clase	Abreviatura	Antirretroviral	Test 1		Test 2		Test 3		Test 4		Test 5		Test 6		Test 7		Test 8		Test 9		Test 10	
			20%	1%	20%	1%	20%	1%	20%	1%	20%	1%	20%	1%	20%	1%	20%	1%	20%	1%	20%	1%
IP	ATV	Atazanavir	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	DRV	Darunavir/r	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	FPV	Fosamprenavir/	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	IDV	Indinavir/r	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	LPV	Lopinavir	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	NFV	Nelfinavir/r	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	SQV	Saquinavir/r	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	TPV	Tipranavir /r	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
IIN	DTG	Dolutegravir	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	EVG	Elvitegravir	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	RAL	Raltegravir	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

\*Sensible: Resistencia de bajo nivel (S); Resistencia intermedia (IR); Resistencia de alto nivel (R).

**Fuente:** Informe de genotipado clínico DeepChek –HIV, Análisis de Mutaciones.

**Autora:** Tatiana Sivisaca

**Interpretación de los resultados:** De las 10 muestras analizadas, se estableció que no se encontró resistencia a los medicamentos que conforman los Inhibidores de Proteasa (IP) e Integrasa (IIN).

En relación al subtipo viral en las 10 muestras analizadas se detectó los siguientes subtipos descritos a continuación en la **Tabla VI**:

**Tabla VI. Subtipo viral**

<b>Identificación de la muestra</b>	<b>Subtipo viral Proteasa (p)</b>	<b>Subtipo viral Integrasa (IN)</b>
Plate1_Column01 11/05/2017	B	-
Plate1_Column02 11/05/2017	B	-
Plate1_Column03 11/05/2017	B	-
Plate1_Column04 11/05/2017	C	-
Plate1_Column05 11/05/2017	B	-
Plate1_Column06 11/05/2017	B	-
Plate1_Column07 11/05/2017	B	-
Plate1_Column08 11/05/2017	B	-
Plate1_Column09 11/05/2017	B	-
Plate1_Column10 11/05/2017	07_BC	B

**Fuente:** Informe de genotipado clínico DeepChek –HIV, Análisis de Mutaciones.

**Autora:** Tatiana Sivilsaca

**Interpretación de los resultados:** En las muestras analizadas se determinó que predominó el subtipo B, seguido por el subtipo C, y la forma recombinante circulante 07\_BC para el gen de la proteasa y para el gen de la integrasa se presentó el subtipo B en una de las muestras analizadas.

## CAPÍTULO 5

### DISCUSIÓN

Las pruebas de resistencia permiten al personal médico tomar una decisión acertada del esquema de medicación a utilizar e indirectamente obtener una mejor respuesta inmunológica evidenciable en cada uno de los pacientes. El interés del presente estudio fue establecer la resistencia a los medicamentos antirretrovirales inhibidores de proteasa e integrasa en pacientes adultos vírgenes de tratamiento (NAÏVE) con infección por virus de inmunodeficiencia humana, identificar las mutaciones que más frecuentemente se asocian a la resistencia a los antirretrovirales y detectar los subtipos y formas recombinantes de VI -1 de los pacientes motivo del estudio. Para tal fin se realizó varios procedimientos laboratoriales que permitieron cumplir con el propósito del estudio; basado en lo descrito anteriormente y para dar cumplimiento con los objetivos planteados se demostró en el presente estudio que entre enero y marzo del 2017 se recolectaron un total de 27 muestras de pacientes infectados por VIH positivo sin tratamiento antirretroviral (NAÏVE), de las cuales se seleccionaron 10 muestras que cumplían con los criterios de inclusión descritos previamente en el diseño metodológico; el principal criterio por el cual se excluyeron 17 muestras del estudio corresponde a que los resultados de la carga viral VIH fue inferior a 5000cp/mL . El grupo de estudio se constituyó por pacientes con predominio del sexo masculino (80%) con una mediana de la edad de 25 años, cuyos resultados en el recuento de células T CD4+ más cercana al momento de la toma de muestra entre 93 cel/uL y la de carga viral de 22214 copias/mL, lo cual está por debajo a la cifra que se toma como referencia para el comienzo de la terapia ARV en pacientes asintomáticos descritos según la Organización Mundial de la Salud en donde indica lo siguiente: “Deberían iniciar TARV, todos los adolescentes y adultos incluidas mujeres embarazadas con infección por VIH y recuento de CD4 350 células/mm<sup>3</sup>, independientemente de la presencia o ausencia de sintomatología clínica, aquellos pacientes con enfermedad grave o

clínicamente avanzada (estadios clínicos de la OMS 3 o 4) deberían iniciar TARV sin importar su recuento de CD4". **(95)** En relación a las mutaciones del virus en las 10 muestras analizadas se detectó un total de 41 mutaciones para el gen de la Proteasa, en donde prevaleció **S37N/E/D/Q/N/I**, seguido **R41K**, **I95L** y **M36I/L** entre las más destacadas; sin embargo 3 están asociadas con resistencia a los **(IP)**, **A71T**, **L10I / V** y **V82I**; las mutaciones **A71T** son mutaciones accesorias polimorfas seleccionadas por inhibidores de proteasa **(IP)** que aumentan la replicación de virus asociados con otras, puede ocasionar resistencia a los medicamentos antiretrovirales; las mutaciones **L10I / V** es una mutación accesorias polimorfa que aumentan la replicación de virus si se encuentra asociada con otras mutaciones en el mismo gen puede ocasionar resistencia a los medicamentos antiretrovirales, ésta mutación se detectó en dos de las muestras analizadas.

La mutación **V82I** es una mutación altamente polimórfica que no es seleccionada por IPs, es el aminoácido de consenso en los virus del subtipo G. **(96)** Clavel, F, Soriano, V, Zolopa, A R, realizaron un estudio de resistencia a antirretrovirales en pacientes con el Virus de VIH en el 2004, aportando algunas novedades en el campo de las resistencias a los fármacos antirretrovirales, que pueden ser contrastados con los resultados presentados anteriormente por que va a permitir corroborar la información obtenida después del análisis; ellos manifiestan que se ha observado con frecuencia una amplia resistencia cruzada a los **(IP)** en el VIH que presenta mutaciones en las posiciones **33, 82, 84 y 90** del gen de la proteasa, por consiguiente existe un alto nivel de **resistencia cruzada** principalmente entre saquinavir (SQV), nelfinavir (NFV), indinavir (IDV) ritonavir (RTV), y atazanavir dependiendo de la línea de tratamiento. Las mutaciones en las posiciones **10, 20, 36, 63, 71, 77 y 93** no causan resistencia a los fármacos por sí mismas, pero contribuyen a resistencia cuando aparecen con otras mutaciones en el gen de la proteasa; la resistencia primaria a Saquinavir SQV implica con mucha frecuencia a la **mutación L90M** seguida de una acumulación de mutaciones

secundarias como la **L10I**, la **A71V** y la **G73S**, en casos de alta concentración de SQV (cuando se combina con RTV) en un tratamiento con IP en primera línea, se puede observar también la mutación **G48V**, que causa un aumento de la resistencia a SQV de 10 veces, si además también aparece la **L90M**, el aumento de la resistencia es de 100 veces; la resistencia a Indinavir y a Ritonavir la confiere **V82A**, y para que se produzca una resistencia significativa requiere siempre de una acumulación posterior de mutaciones secundarias como la **M46I** o la **I54V**. Cuando Indinavir IDV se administra tres veces al día sin Ritonavir RTV, la resistencia emerge de forma muy lenta lo cual puede estar relacionado a mutaciones individuales o un pequeño número de mutaciones que parecen favorecer niveles remarcablemente bajos de resistencia a Indinavir IDV, con niveles altos sólo alcanzados tras una acumulación de varias mutaciones. **(97)**

En relación a las mutaciones del virus en las 10 muestras analizadas se detectó un total de 24 mutaciones para el gen de la Integrasa, en donde la mutación más frecuente fue **R27K** seguido de **L110I**, **T125A** y **V77A/I** entre las más destacadas, sin embargo 1 está asociada a resistencia a los **(IIN)**, **L74 M/L**; las mutaciones restantes no confieren resistencia conocida. Las mutaciones L74 M/L son mutaciones polimórficas accesorias seleccionadas comúnmente por cada uno de los INSTIs. En los pacientes no tratados con ARV, el L74M ocurre en el 0,5% al 10% de los pacientes y el L74I ocurre en el 3% al 20% de los pacientes dependiendo del subtipo. Solamente, L74M / I tiene efecto mínimo, si es que existe alguno, sobre la susceptibilidad de INSTI. Sin embargo, ellos parecen contribuir a reducir la susceptibilidad a cada uno de los INSTI cuando se producen con las principales mutaciones de resistencia INSTI. **(96)**

Algunas mutaciones asociadas a resistencia a los inhibidores de la integrasa pueden aparecer de manera natural en pacientes que nunca han estado expuestos a esta familia de fármacos, el conocimiento de la frecuencia de estos cambios es de utilidad para estimar si existe una

población que podría responder peor a esta nueva familia de fármacos. Hay una elevada variabilidad en el gen de la integrasa, pues hasta un 64% (184/288) de las posiciones son polimórficas. **(98-99)** Como es de esperar, la prevalencia de mutaciones asociadas a resistencia a estos fármacos se ha observado con mayor frecuencia en subtipos no-B del VIH-1. Por el contrario, la prevalencia en seroconvertidores no difiere de la encontrada en pacientes con infección crónica. Tampoco difiere la encontrada en sujetos naïve respecto a los pretratados con otros antirretrovirales **(100 ,101)**. Todos los estudios confirman la ausencia de cambios tanto en las posiciones de mutaciones primarias (66, 92, 143, 148 y 155), causales del compromiso total tanto a raltegravir como elvitegravir. Los cambios más frecuentemente observados de forma natural en la integrasa ocurren en posiciones descritas como mutaciones secundarias (V72I, V201I, T206S, I203M, K156N), cuyo impacto en la susceptibilidad a los inhibidores de la integrasa, cuando se dan de forma aislada, parece ser nula o escasa. **(98-102)** De las 10 muestras analizadas se estableció que el 100% de las mismas presento sensibilidad a los medicamentos inhibidores de proteasa **(IP)** , esto debido a que a diferencia de otras familias de fármacos los inhibidores de la proteasa (IP) tienen una **barrera genética** alta, es decir se necesita la acumulación de varias mutaciones para que se produzca resistencia y por consiguiente la resistencia se desarrolla lentamente por tal razón se ha observado con frecuencia una amplia resistencia cruzada a los inhibidores de proteasa IP. **(103)** De las 10 muestras analizadas se estableció que el 100% de las mismas presento sensibilidad a los medicamentos inhibidores de integrasa **(IIN)**; a diferencia de los inhibidores de proteasa los inhibidores de integrasa presentan una baja barrera genética es decir esto ocurre cuando la resistencia a un inhibidor de la integrasa conlleva resistencia, total o parcial, a otro. La experiencia clínica con los inhibidores de la integrasa es escasa pues en nuestro país se utilizan desde 2015, de modo que la información sobre resistencias es limitada. Hasta la fecha se dispone de 2 inhibidores de la integrasa, raltegravir

(MK-0518, Isentress<sup>TM</sup>, Merck) y elvitegravir (GS-9137, Gilead). Para raltegravir, la información deriva de los ensayos clínicos de registro llevados a cabo por Merck, se trata de un estudio de fase II en pacientes con mult fracasos (protocolo 005)<sup>5</sup>, un estudio de fase II en pacientes Naïve (protocolo 004)<sup>6</sup> y 2 estudios de fase III en pacientes con mult fracasos (BENCHMRK-1 y 2). **(104)**

La subtipificación se realizó a través de una prueba de homología de secuencia consenso del 20%, que fue generada de todas las lecturas por región y comparada con un conjunto actualizado de secuencias de referencia, en las muestras analizadas predominó el subtipo B, seguido por el subtipo C, y la forma recombinante circulante 07\_BC para el gen de la proteasa y para el gen de la integrasa se presentó el subtipo B en una de las muestras analizadas. Los virus del subtipo B del grupo M son las variantes más prevalentes del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) tipo 1 en los países occidentales. El desarrollo del tratamiento antirretroviral y la mayoría de los datos que conocemos sobre mecanismos de resistencia del VIH se han basado en el estudio de cepas del subtipo B. Sin embargo, en el global de la epidemia, predominan otros subtipos como el A y el C, así como formas recombinantes entre subtipos como son las variantes CRF01\_AE y CRF02\_AG, entre otros. Además, la prevalencia de estos subtipos no-B y de recombinantes está aumentando en los países desarrollados, favorecido principalmente por los movimientos migratorios y el turismo. Las diferencias genéticas entre subtipos podrían tener impacto en la respuesta al tratamiento antirretroviral y en el desarrollo de distintas vías de resistencia, aunque las evidencias clínicas en este sentido son aún limitadas. **(105)** En el ámbito molecular, los subtipos del VIH-1 varían en un 10-12% de sus nucleótidos y en un 5-6% de los aminoácidos en la retrotranscriptasa (RT) y la proteasa (PR), que son las principales enzimas diana del TAR. Estos cambios genéticos en el gen pol, que codifica la RT y la PR, podrían conferir resistencias a distintos antirretrovirales, o incluso a las familias enteras de inhibidores de la RT e inhibidores de la PR, o facilitar el

desarrollo de éstas **(106)**. Sin embargo, hay que tener en cuenta que, en general, las mutaciones de resistencia de los subtipos B también confieren resistencia a los subtipos no-B y, de momento, no hay evidencia de que los subtipos no-B seleccionen mutaciones primarias (o mayores) nuevas y distintas que los B. **(107)**

## CAPITULO 6

### CONCLUSIONES

1. En las muestras analizadas se detectó un total de 41 mutaciones para el gen de la Proteasa en donde prevaleció **S37N/E/D/Q/N/I** con el 9 %, seguido de **R41K** con el 6%, **I95L** con el 5% y finalmente **M36I/L** con el 5% entre las más destacadas (**IP**).
2. En las muestras analizadas se detectó un total de 24 mutaciones para el gen de la integrasa, prevaleció **R27K** con un 13%, seguido de L110I con el 9%, **T125A**, **V77A/I**.
3. De las mutaciones encontradas en el gen de Proteasa 3 están asociadas a resistencia a los (**IP**), **A71T**, **L10I / V**, **V82I**; las mutaciones restantes no confieren resistencia conocida.
4. De las mutaciones encontradas en el gen de la integrasa 1 está asociada a resistencia a los (**IIN**), **L74 M/L**; las mutaciones restantes no confieren resistencia conocida.
5. El subtipo B predominó en este grupo de muestras, seguido por el subtipo C, y la forma recombinante circulante 07\_BC para el gen de la proteasa y para el gen de la integrasa se presentó el subtipo B en una de las muestras analizadas.
6. De las 10 muestras analizadas se estableció que el 100% de las mismas presento sensibilidad a los medicamentos inhibidores de proteasa e integrasa.

## RECOMENDACIONES

1. Implementar los criterios y algoritmos para la utilización de las pruebas de resistencia genotípica en los sistemas Vigilancia Epidemiológica Nacional.
2. Ampliar el estudio de farmacorresistencia primaria para que brinde información al Sistema Nacional de Salud para el fortalecimiento de la política de manejo de antiretrovirales en el país.
3. Evaluar a las personas afectadas con VIH/SIDA con evidencia de resistencia a los medicamentos antiretrovirales, para instaurar la medicación adecuada dependiendo del estado del paciente.
4. Promover el uso de las pruebas de genotipificación en concordancia normas establecidas para el tratamiento a pacientes con VIH/SIDA

## BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Afani S, Alejandro, & Gallardo O, Ana M. (2011). Resistencia a la terapia antiretroviral en la infección por virus de inmunodeficiencia humana. *Revista chilena de infectología*, 28(5), 461-469. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182011000600011>
- 2.- Díaz Torres, H. M., Machado Zaldívar, L. Y., Dubed Echevarría, M., Martínez Fernández, L., Ruiz Gutiérrez, N. M., & Blanco de Armas, M. (2014). Evolución rápida de la resistencia a drogas antirretrovirales en 2 pacientes infectados por VIH-1. *Revista Cubana de Medicina*, 53(2), 127-133.
- 3.- Ceccherini-Silberstein F, Svicher V, Sing T, Artese A, Santoro M, Forbici F, et al. Characterization and Structural Analysis of Novel Mutations in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase Involved in the Regulation of Resistance to Nonnucleoside Inhibitors. *J Virol*. 2007; 81(20):11507-19.
- 4.- WHO. VIH/SIDA Nota descriptiva N°360 [Internet]. 2017. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs360/es/>
- 5.- Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/sida. Available from: <http://www.unaids.org/es/regionscountries/countries/ecuador>
- 6.- Brooks, G. *Microbiología Médica de Jawetz, Melnick, y Adelberg*, 25ª edición, México; Mc Graw Hill.; 2014.
- 7.- Galindo-Orrego P, Mueses-Marín HF, Galindo-Quintero J, Martínez-Cajas JL. Resistencia transmitida del virus de la inmunodeficiencia humana en pacientes sin exposición previa a tratamiento antirretroviral, Cali, Colombia, 2010. *Infectio*. 2014; 17:19-27.
- 8.- Gutiérrez G Cristina del R. Pruebas analíticas de resistencia a antirretrovirales en pacientes infectados por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana Tipo 1 (VIH-1). *INHRR* [Internet]. 2007 Jun [citado 2016 Sep. 07] ; 38( 1 ): 28-33. Disponible en: [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0798-04772007000100005&lng=es.vaual](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-04772007000100005&lng=es.vaual)
9. - Lederman MM, Connick E, Landay A, Kuritzkes DR, Spritzler J, St Clair M, et al. Immunologic responses associated with 12 weeks of combination antiretroviral therapy consisting of zidovudine, lamivudine, and ritonavir: results of AIDS Clinical Trials Group Protocol 315. *J Infect Dis*. 1998; 178(1):70-9.
10. – Delgado, R. (2011). Características virológicas del VIH. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 29(1), 58–65. <http://doi.org/10.1016/j.eimc.2010.10.001>

- 11.-** Pérez S., Lautaro. (2000). Biología molecular del virus de la inmunodeficiencia humana y los recientes progresos en el tratamiento del SIDA. Revista chilena de pediatría, 71(2), 83-88. <https://dx.doi.org/10.4067/S0370-41062000000200002>
- 12.-** Lydia G. Diversidad Genética del Virus de Inmunodeficiencia Humana: una perspectiva general. Volumen 6 no. 1
- 13. -** Acheson N. Fundamentals of Molecular Virology. 2nd ed. Sons JW, editor. 2011.
- 14.-** Kowalski M, Potz J, Basiripour L et al. Functional regions of the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. Science 1987; 237:1351.
- 15.-** Lasky L, Nakamura G, Smith D et al. Delineation of a region of the human immunodeficiency virus type1. gp120 glycoprotein critical for interaction with the CD4 receptor. Cell 1987; 50:975.
- 16. -** Gallaher W. Detection of a fusion peptide sequence in the transmembrane protein of VIH. Cell 1987; 50:327.
- 17. -** White J. Viral and cellular membrane fusion proteins. Annu Rev Physiol 1990; 52:675.
- 18. -** Alkhatib G, Combadiere C, Broder C et al. CC CKR5: A RANTES, Mip-1a, Mip-1b receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. Science 2006; 272:1955.
- 19. -** Doranz B, Rucker J, Yi Y et al. A dual tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and chemokine receptors CKR-5, CKR-3 and CKR-2b as fusion cofactors. Cell 2006; 85:1149.
- 20. -** Bukrinsky M, Sharova N, McDonald T et al. Association of integrase, matrix, and reverse transcriptase antigens of human immunodeficiency virus type 1 with viral nucleic acids following acute infection. Proc Natl Acad Sci USA 2009; 90:6125.
- 21. -** Liu H, Wu X, Newman M et al. The vif protein of human and simian immunodeficiency viruses is packaged into virions and associates with viral core structures. J Virol 2010; 69:7630.
- 22. -** Karczewski M, Strebel K. Cytoskeletal association and virion incorporation of the human immunodeficiency virus type 1 Vif protein. J Virol 1993; 67:4945.
- 23. -** Bukrinsky M, Sharova N, Dempsey M et al. Active nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes. Proc Natl Acad Sci USA 2012; 89:6580.
- 24. -** Gallay P, Swingler S, Aiken C et al. VIH-1 infection of nondividing cells; C-terminal tyrosine phosphorylation of the viral matrix protein is a key regulator. Cell 2011; 80:379.

- 25.** - Gallay P, Stitt V, Mundy C et al. Role of the karyopherin pathway in human immunodeficiency virus type 1 nuclear import. *J Virol* 1996; 70:1027.
- 26.**-Bukrinsky M, Haffar O. HIV-1 nuclear import: in search of a leader. *Front Biosci* 1997; 2:d578.
- 27.** - Shih C, Stoye J, Coffin J. Highly preferred targets for retrovirus integration. *Cell* 2013; 53:531.
- 28.** - . Pryciak P, Varmus H. Nucleosomes, DNA binding proteins, and DNA sequence modulate retroviral target site selection. *Cell* 2012 ; 69:769.
- 29.** - Goff S. Genetics of retroviral integration. *Annu Rev Genetics* 2013; 26:527.
- 30.** - Engelman A, Mizuuchi K, Craigie R. HIV-1 DNA integration: Mechanism of viral DNA cleavage and DNA strand transfer. *Cell* 2013; 67:1211.
- 31.** - Chowers M, Spina C, Kwoh T et al. Optimal infectivity in vitro of human immunodeficiency virus type 1 requires an intact nef gene. *J Virol* 2014; 68:2906.
- 32.** - Miller M, Warmerdam M, Gaston I et al. The human immunodeficiency virus-1 nef gene product: a positive factor for viral infection and replication in primary lymphocytes and macrophages. *J Exp Med* 2013; 179:101.
- 33.** - Chowers M, Pandori M, Spina C et al. The growth advantage conferred by HIV-1 nef is determined at the level of viral DNA formation and is independent of CD4 downregulation. *Virology* 2011; 212:451.
- 34.** - Neumann M, Kleinschmidt A, Felber B et al. Restriction of VIH-1 production in a human astrocytoma cell line is associated with a cellular block in Rev function. *J Virol* 2013; 69:2159.
- 35.** - Tornatore C, Meyers K, Atwood W et al. Temporal patterns of human immunodeficiency virus type 1 transcripts in human fetal astrocytes. *J Virol* 2014; 68:93.
- 36.** - Saksela K, Stevens C, Rubinstein P et al. Human immunodeficiency virus type 1 mRNA expression in peripheral blood cells predicts disease progression independently of the numbers of CD4+ lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 91:1104.
- 37.** - Frankel A, Young J. HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem* 1998; 67:1.
- 38.** - Jabbar M. The human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein: roles in virus release and CD4 downregulation. *Curr Top Microb Immunol* 1995; 193:107.
- 39.** - Luban J. Absconding with chaperone: essential cyclophilin-Gag interaction in HIV-1 virions. *Cell* 1996; 87:1157.

- 40.-** Afani S, Alejandro, & Gallardo O, Ana M. (2011). Resistencia a la terapia antiretroviral en la infección por virus de inmunodeficiencia humana. *Revista chilena de infectología*, 28(5), 461-469. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182011000600011>
- 41.-** Clavel F, Hance AJ. HIV Drug resistance. *N Engl J Med* 2004; 350(10): 1023-35.
- 42.-** Geretti A M. Clinical implications of HIV drug resistance to nucleoside and nucleotide transcriptase inhibitors. *AIDS rev* 2006; 8: 210-20.
- 43.-** Jacobson J M, Lowy I, Fletcher C V, O'Neill T J, Tran D N, Ketas T J, et al. Single dose safety, pharmacology, and antiviral activity of the human immunodeficiency virus (HIV) type 1 entry inhibitor PRO 542 in HIV-infected adults. *J Infect Dis* 2000; 182: 326.
- 44. -** Johnson V A, Brun-Vézinet F, Clotet B. Update of the drug resistance mutations in HIV-1: December 2010. *International AIDS Society-USA* 2010; 18 (5): 156-63.
- 45. -** Paredes Roger and Buenaventura C. Clinical management of HIV-1 resistance. *Antiviral Res* 2010; 85: 245-65.
- 46. -** Menéndez-Arias L. Molecular basis of human immunodeficiency virus. An update. *Antiviral Res* 2010; 85: 210-31.
- 47. -** Nijhuis M, van Maarseveen N M, Verheyen J, Boucher C. Novel mechanisms of HIV protease inhibitor resistance. *Curr Opin HIV AIDS* 2008; 3: 627-32.
- 48. -** Llibre M J, Shapiro M J, Bonaventura C. Clinical implications of genotypic resistance to the newer antiretroviral drugs in HIV-1 infected patients with virological failure. *Clin Infect Dis* 2010; 50 (6): 872-81.
- 49. -** Proceedings of the XVIIth International Drug Resistance Workshop. Sitges, Spain. 10 junio 2008. Abstract 24.
- 50. -** Vingerhoets J, Tambuyzer L, Aziijn H, Hoogstoel A, Nijs S, Peeters M, et al. Resistance profile of etravirine: combined analysis of baseline genotypic and phenotypic data from the randomized, controlled Phase III clinical studies. *AIDS* 2010; 24: 503-14.
- 51.-** Markowitz M, Nguyen B, Gotuzzo E, Mendo F, Ratanasuwan W, Kovacs C, et al. Rapid and durable antiretroviral effect of the HIV-1 integrase inhibitor raltegravir as part of combination therapy in treatment-naive patients with HIV-1 infection: results of a 48-week controlled study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007; 46: 125-33.
- 52.-** Jones G, Ledford R, Yu F, Miller M, Tsiang M, McColl D. Resistance profile of HIV-1 mutants in vitro selected by the HIV-1 integrase inhibitor GS- 9137 (JTK-303) (Abstract 627). 14<sup>th</sup> Conference on Retrovirus and Opportunistic Infections. Los Angeles, 25-28 February 2007.

- 53.-** Patel I H, Zhang X, Nieforth K, Salgo M, Buss N. Pharmacokinetics, pharmacodynamics and drug interaction potential of enfuvirtide. *Clin Pharmacokinet* 2005; 44: 175- 86.
- 54.-** Wei X, Decker J M, Liu H. Emergence of resistant human immunodeficiency virus type 1 in patients receiving fusion inhibitor (T-20) monotherapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 1896-905.
- 55.-** De Luca A, Giambenedetto SD, Trotta MP, Colafigli M, Prosperi M, Ruiz L, et al. Improved interpretation of genotypic changes in the HIV-1 reverse transcriptase coding region that determine the virological response to didanosine. *J Infect Dis.* 2007; 196(11):1645-53.
- 56.-** Rhee SY, Taylor J, Wadhera G, Ben-Hur A, Brutlag DL, Shafer RW.
- 57. -** Genotypic predictors of human immunodeficiency virus type 1 drug resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103(46):17355-60. Bachelier L, Jeffrey S, Hanna G, D'Aquila R, Wallace L, Logue K, et al. Genotypic correlates of phenotypic resistance to efavirenz in virus isolates from patients failing nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor therapy. *J Virol.* 2001; 75(11):4999-5008.
- 58.-** Domingo E, Menendez-Arias L, Holland JJ. RNA virus fitness. *Reviews in medical virology.* 2009; 7(2):87-96
- 59.-** Vingerhoets J, Azijn H, Franssen E, De Baere I, Smeulders L, Jochmans D, et al. TMC125 displays a high genetic barrier to the development of resistance: evidence from in vitro selection experiments. *J Virol.* 2005;79(20):12773-82.
- 60.-** Domingo E, Holland JJ. RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu Rev Microbiol.* 2007;51:151-78.
- 61.-** Soriano V, Briones C, Gomez-Cano M, Perez-Olmeda M, de Medinza C. Resistencia a los farmacos antirretroviricos. In: Soriano V, Gonzalez-Lahoz J, editors. *Manual del SIDA: IDEPSA*; 2009. p. 739-52.
- 62.-** 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. Epub 2008/04/12.
- 63.-** Barroso H, Taveira N. Evidence for negative selective pressure in HIV-2 evolution in vivo. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases.* 2005;5(3):239-46. Epub 2005/03/02.
- 64.-** Clavel F, Hoggan MD, Willey RL, Strebel K, Martin MA, Repaske R. Genetic recombination of human immunodeficiency virus. *Journal of virology.* 2006 ;63(3):1455-9.
- 65.-** Hu WS, Temin HM. Retroviral recombination and reverse transcription. *Science.* 2009 ;250(4985):1227-33.
- 66.-** 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

**67.** - Thomson MM, Najera R. Molecular epidemiology of HIV-1 variants in the global AIDS pandemic: an update. *AIDS reviews*. 2005;7(4):210-24. Epub 2006/01/24.

**68.** - HIV Sequence Database. Los Alamos, NM: Los Alamos National Laboratory [database on the Internet]. 2012 [cited October 9, 2012.]. Available from: <http://www.hiv.lanl.gov/content/hiv-db/mainpage.html>.

**69.** - 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*. 2007; 93(12):6106-11.

**70.**- Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S. Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000-2007. *AIDS*.25(5):679-89. Epub 2011/02/08.

**71.**-Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S. Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004. *AIDS* (London, England). 2006;20(16):W13-23.

**72.**.- Kandathil AJ, Ramalingam S, Kannangai R, David S, Sridharan G. Molecular epidemiology of HIV. *The Indian journal of medical research*. 2005;121(4):333-44. Epub 2005/04/09.

**73.**- Soriano Vazquez V, Rodriguez-Rosado y Martinez-Echevarria R, Martinez E. [Tests to detect resistance to antiretroviral agents in clinical practice]. *Rev Clin Esp*. 2013 ;199(3):179

**74.**- Rodriguez-Rosado R, Briones C, Soriano V. Introduction of HIV drug-resistance testing in clinical practice. *AIDS* (London, England). 2013;13(9):1007-14.

**75.**- Clotet B. Efavirenz: resistance and cross-resistance. *International journal of clinical practice Supplement*. 2013;103:21-5.

**76.** - Adams J. DNA sequencing technologies. *Nature Education*. 2012 ; 1(1):193

**77.** - Sanger F. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1977;74:5463-7.

**78.**-Ji H, Massé N, Tyler S, Liang B, Li Y, Merksh H, et al. HIV Drug Resistance Surveillance using pooled pyrosequencing. *PLoS ONE*. 2010;5(2):e9263.

**79.** Dudley DM, Chin EN, Bimber BN, Sanabani SS, Tarosso LF. Low-Cost Ultra-Wide Genotyping Using Roche/454 Pyrosequencing for Surveillance of HIV Drug Resistance. *PLoS ONE*. 2012;7(5):e36494.

**80.** Ronaghi M. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Research*. 2001;11:3-11.

- 81.-** Le T, Chiarella J, Simen BB, Hanczaruk B, Egholm M, Landry ML, et al. Low-abundance HIV drug-resistant viral variants in treatment-experienced persons correlate with historical antiretroviral use. *PLoS One*. 2009;4(6):e6079.
- 82.-** Ji H, Massé N, Tyler S, Liang B, Li Y, Merksh H, et al. HIV Drug Resistance Surveillance using pooled pyrosequencing. *PLoS ONE*. 2010;5(2):e9263.
- 83.-** Dudley DM, Chin EN, Bimber BN, Sanabani SS, Tarosso LF. Low-Cost Ultra-Wide Genotyping Using Roche/454 Pyrosequencing for Surveillance of HIV Drug Resistance. *PLoS ONE*. 2012;7(5):e36494.
- 84.** Ahmadian A, Ehn M, Hober S. Pyrosequencing: History, biochemistry and future. *Clinica Chimica*. 2005;363(2006):83-94.
- 85.-** Hernandez G, editor. Flujo de trabajo general. *Genome Sequencer Junior*; 2013; INSPI. Roche Diagnostics.
- 86.-** Wolf E. HIV Medicine 2005 2005. Available from: [www.HIVMedicine.com](http://www.HIVMedicine.com).
- 87.-** Clavel F, Hance AJ. HIV drug resistance. *The New England journal of medicine*. 2004;350(10):1023-35. Epub 2004/03/05.
- 88.-** Ravasi G. Recomendaciones de la OMS para la vigilancia de la farmacorresistencia del VIH y su aplicación en América Latina y Caribe Contexto. 2012. Available from: [http://www2.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_view&Itemid=270&gid=19333&lang=es](http://www2.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&gid=19333&lang=es)
- 89.-** Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) Dr. Leopoldo Izquieta Pérez. Manual para Toma, Recepción y Transporte de Muestras del INSPI - Regional Norte. Quito- Ecuador. 2016.
- 90.-** [Molecular.Roche.com](http://molecular.roche.com) [Internet]. Available from: <https://molecular.roche.com/assays/cobas-ampliprep-cobas-taqman-hiv-1-qualitative-test/>
- 91.-** Base de datos de la farmacorresistencia del VIH de la Universidad de Stanford @ [hivdb.stanford.edu](http://hivdb.stanford.edu) [Internet]. Available from: [https://hivdb.stanford.edu/pages/published\\_analysis/genophenoPNAS2006/](https://hivdb.stanford.edu/pages/published_analysis/genophenoPNAS2006/)
- [www.ablsa.com](http://www.ablsa.com) [Internet]. Available from: <https://www.ablsa.com/diagnostic-applications/deepchek-hiv-rt-pr-genotyping-assay/>
- 92.-** Dudley DM, Chin EN, Bimber BN, Sanabani SS, Tarosso LF. Low-Cost Ultra-Wide Genotyping Using Roche/454 Pyrosequencing for Surveillance of HIV Drug Resistance. *PLoS ONE*. 2012;7(5):e36494.

- 93.** - GS Junior emPCR Amplification Method Manual Lib-A. ROCHE; 2012.
- 94.** - Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for using antiretroviral agents among HIV-infected adults and adolescents. <http://www.aidsinfo.nih.gov/guidelines>. October 29,2004.
- 95.** - Revised WHO clinical staging and immunological classification of HIV and case definition of HIV for surveillance. 2006, disponible en: [http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789243599762\\_spa.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789243599762_spa.pdf)
- 96.** Listado ampliamente reconocido de mutaciones del VIH de la Universidad de Stanford, California, EE UU: [http://hivdb6.stanford.edu/asi/deployed/input/scores/Comments\\_RT.txt](http://hivdb6.stanford.edu/asi/deployed/input/scores/Comments_RT.txt)
- 97-** Clavel, F, Soriano, V, Zolopa, A R, HIV Infection Antirretroviral resistance. Scientific basis and Recommendations for management, Bash, Paris, 2004.
- 98.** Lataillade M, Chiarella J, Kozal M. Natural polymorphism of the HIV-1 integrase gene and mutations associated with integrase inhibitor resistance. *Antivir Ther.* 2007;12:563-70.
- 99 .** Zioni R, Rhee S, Liu T, Shafer R. Natural variation of HIV-1 group M Integrase: Implications for integrase inhibitor therapy [Abstract 623]. 14th Conference on Retrovirus and Opportunistic Infections. Los Angeles, 25-28 February 2007.
- 100.-** Garrido C, Geretti AM, De Mendoza C, Booth C, Strang A, Soriano V. Polymorphisms at the integrase gene in distinct HIV populations may influence the susceptibility to integrase inhibitors [Abstract 12]. 6th European HIV Drug Resistance Workshop. Budapest, 26-28 March 2008.
- 101.-** Sichtig N, Däumer M, Esser S, Dittmer U, Schülter E, Oette M, et al. Analysis of integrase inhibitor (INI) resistance of HIV-1 group M in ARTnaïve and -experienced but INI-naïve patients in Germany [Abstract 67]. 6th European HIV Drug Resistance Workshop. Budapest, 26-28 March 2008.
- 102 .-** Sichtig N, Däumer M, Esser S, Dittmer U, Schülter E, Oette M, et al. Analysis of integrase inhibitor (INI) resistance of HIV-1 group M in ARTnaïve and -experienced but INI-naïve patients in Germany [Abstract 67]. 6th European HIV Drug Resistance Workshop. Budapest, 26-28 March 2008.
- 103-** Antonio Solano, III Congreso Centroamericano de Infectología Honduras 2012. [http://www.bvs.hn/Honduras/SHEI/5-ResistenciaARV\\_SolanoA\\_2012.pdf](http://www.bvs.hn/Honduras/SHEI/5-ResistenciaARV_SolanoA_2012.pdf)
- 104** - Cooper D, Gatell J, Rockstroh J, Katlama C, Yeni P, Lazzarin A, et al, for the

BENCHMRK-1 Study Group. 48-Week Results from BENCHMRK-1, a Phase III Study of Raltegravir in Patients Failing Antiretroviral Therapy (ART) , Barbados.

**105.-** Pablo Rivasa, África Holguína, Eva Ramírez de Arellanoa, Carmen Muñoz-Almagrob, Rafael Delgadoc, Raúl Ortiz de Lejarazud, Vicente Sorianoa, por el Grupo de Estudio del Sida (GeSIDA). Tratamiento antirretroviral según tipos y subtipos del virus de la inmunodeficiencia humana.

**106-** Wainberg MA. HIV-1 subtype distribution and the problem of drug resistance. AIDS. 2004;Suppl 3:S63-8.

**107.-** Holguin A, Ramírez de Arellano E, Rivas P, Soriano V. Efficacy of antiretroviral therapy in individuals infected with HIV-1 non-B subtyp. AIDS Reviews. 2006;8:98-107.

# **ANEXOS**

## Anexo 1



**Memorando Nro. INSPI-CZ9-2016-0724-M**

**Quito, D.M., 23 de septiembre de 2016**

**PARA:** Sr. Mgs. Gabriel Adolfo Morey Leon  
**Director Técnico de Investigación, Desarrollo e Innovación.**

**ASUNTO:** Solicitud de aval para realizar tesis de post grado Lic. Sivisaca

De mi consideración:

En referencia al Memorando INSPI-CZ9-LRHOVTS-2016-0056-M en el que se pone consideración el desarrollo dentro del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública el desarrollo dentro del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública, el proyecto de investigación con el tema tentativo: **"RESISTENCIA A LOS MEDICAMENTOS ANTIRRETROVIRALES (INHIBIDORES DE PROTEASA E INHIBIDORES DE INTEGRASA) EN PACIENTES ADULTOS CON INFECCIÓN POR VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA"**, como requisito previo a la obtención del título Magister en Biotecnología Molecular, programa de posgrado de la Universidad de Guayaquil, cohorte 2013 2015, previo a la petición realizada por la Lic. Tatiana Vaturina Sivisaca Pucha CI1104579311 a esta Institución.

**NOMBRES Y APELLIDOS:** TATIANA VATURINA SIVISACA PUCHA  
CI.1104579311

**CORREO ELECTRÓNICO:** tatita-861@hotmail.com

**TELÉFONO:** 0994773462

**ENTIDAD A LA QUE PERTENECE:** UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL

**GRADO ACADÉMICO:** LICENCIADO EN LABORATORIO CLINICO

**TÍTULO A OBTENER:** MAGISTER EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR.

Solicito a usted de la manera más cordial realizar el análisis respectivo para proceder con el aval y posterior ejecución del proyecto, para ello adjunto la documentación referente al proyecto.

Con sentimientos de distinguida consideración.

Atentamente,

**Memorando Nro. INSPI-DTLVERN-CRNRH-2016-0156-M**

**Guayaquil, 30 de septiembre de 2016**

**PARA:** Sr. Mgs. Gabriel Adolfo Morey Leon  
**Director Técnico de Investigación, Desarrollo e Innovación.**

Sra. Dra. Glenda Velásquez Serra. Msc, PhD  
**Directora Técnica de Laboratorios de Vigilancia Epidemiológica y  
Referencia Nacional.**

**ASUNTO:** Aval para realización de tesis en el CRN de Retrovirus

De mi consideración:

En referencia a los Memorando Nro. INSPI-CGT-DTIDI-2016-0869-MEM y memorando Nro. INSPI-CGT-DTLVERN-2016-1010-M.

El Centro de Referencia Nacional de Retrovirus , da el aval a las propuestas de los profesionales :

Sr. Lic. Cosme Hidalgo Tapia:

Con el tema "RESISTENCIA GENOTÍPICA DEL VIH-1 SIDA A LOS ANTIRRETROVIRALES INHIBIDORES DE LA TRANSCRIPTASA INVERSA, EN PACIENTES SIN EXPOSICIÓN PREVIA AL TRATAMIENTO (NAÏVE). HOSPITALES EUGENIO ESPEJO Y ENRIQUE GARCÉS DE LA CIUDAD DE QUITO, PERIODO SEPTIEMBRE-NOVIEMBRE 2016"

Y a la Sra Lic. Tatiana Sivisaca Pucha:

Con el tema "RESISTENCIA A LOS MEDICAMENTOS ANTIRRETROVIRALES (INHIBIDORES DE PROTEASA E INHIBIDORES DE INTEGRASA) EN PACIENTES ADULTOS CON INFECCIÓN POR VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA"

Considerando que las propuestas de tesis presentadas son afines a la línea de investigación en Resistencia a los medicamentos antirretrovirales en individuos expuestos a la infección del VIH. Y Que el CRN de Retrovirus realiza .

Además se cuenta con equipamiento y reactivos para que puedan los maestrantes incorporarse al laboratorio y realizar la parte experimental de las tesis mencionadas.

Particular que hacemos conocer para los fines pertinentes.

**Memorando Nro. INSPI-CGT-DTIDI-2016-0888-MEM**

**Guayaquil, 07 de octubre de 2016**

**PARA:** Sr. Ing. David Fernando Sarmiento Aguas  
**Coordinador Zonal 9 - INSPI LIP.**

**ASUNTO:** Aval del CRN de Retrovirus para realización de Tesis de Posgrado

De mi consideración:

En referencia a los Memorando Nro. INSPI-CGT-DTIDI-2016-0869-MEM y Memorando Nro. INSPI-CGT-DTLVERN-2016-1010-M. El Centro de Referencia Nacional de Retrovirus, da el aval a las propuestas de los profesionales:

Sr. Lic. Cosme Hidalgo Tapia:

Con el tema "RESISTENCIA GENOTÍPICA DEL VIH-1 SIDA A LOS ANTIRRETROVIRALES INHIBIDORES DE LA TRANSCRIPTASA INVERSA, EN PACIENTES SIN EXPOSICIÓN PREVIA AL TRATAMIENTO (NAÏVE). HOSPITALES EUGENIO ESPEJO Y ENRIQUE GARCÉS DE LA CIUDAD DE QUITO, PERIODO SEPTIEMBRE-NOVIEMBRE 2016"

Y a la Sra Lic. Tatiana Sivasaca Pucha:

Con el tema "RESISTENCIA A LOS MEDICAMENTOS ANTIRRETROVIRALES (INHIBIDORES DE PROTEASA E INHIBIDORES DE INTEGRASA) EN PACIENTES ADULTOS CON INFECCIÓN POR VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA"

Considerando que las propuestas de tesis presentadas son afines a la línea de investigación en Resistencia a los medicamentos antirretrovirales en individuos expuestos a la infección del VIH; y que el CRN de Retrovirus realiza los análisis, contando además con equipamiento e reactivos, los maestrantes podran incorporarse al laboratorio para ejecutar la parte experimental de las tesis mencionadas.

Particular que hacemos conocer para los fines pertinentes.

Con sentimientos de distinguida consideración.

Atentamente,

Blga. Jenny Ketty Muzzio Aroca  
**DIRECTOR TÉCNICO DE INVESTIGACIÓN DESARROLLO E INNOVACIÓN.,**

## Anexo 2



MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA  
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES "EUGENIO ESPEJO"  
COMITÉ DE BIOÉTICA EN INVESTIGACIÓN

Quito DM, 13 de diciembre de 2016

Licenciada  
Tatiana Sivisaca

Presente

Reciba un cordial saludo de los miembros del Comité de Bioética en Investigación del Hospital Eugenio Espejo.

A través de la presente le informamos que, una vez analizado por parte de los miembros del Comité el Trabajo de Titulación "RESISTENCIA A LOS MEDICAMENTOS ANTIRRETROVIRALES INHIBIDORES DE PROTEASA E INHIBIDORES INTEGRASA EN PACIENTES ADULTOS CON INFECCIÓN POR EL VIRUS DE INMUNO DEFICIENCIA HUMANA, EN LOS HOSPITALES EUGENIO ESPEJO Y ENRIQUE GARCÉS DE LA CIUDAD DE QUITO, EN EL PERIODO AGOSTO 2016 – FEBRERO 2017". Se le comunica que al no encontrar ningún criterio que vaya en contra de las normas de la bioética en investigación, este Comité aprueba la realización de dicho proyecto.

El Comité de Bioética en Investigación se reserva el derecho de solicitar en cualquier momento, informe del avance de su investigación.

Atentamente,

  
Dr. Carlos Rosero H.  
PRESIDENTE

Ministerio de Salud Pública  
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES  
"EUGENIO ESPEJO"  
COMITÉ DE  
BIOÉTICA EN INVESTIGACIÓN

  
Dra. Maribel Cruz  
SECRETARIA

  
MIEMBRO DEL COMITÉ

Atte. J

Dirección Av. Gran Colombia s/n y Yaguachi PBX (593)2541-231  
Sitio Web: [www.hec.gob.ec](http://www.hec.gob.ec)  
Quito - Ecuador

### Anexo 3.

#### INFORMACIÓN PARA EL VOLUNTARIO Y CONSENTIMIENTO INFORMADO SOBRE EL PROYECTO

**Títulos de la investigación:**

*"RESISTENCIA GENOTÍPICA DEL VIH-1 A LOS ANTIRRETROVIRALES INHIBIDORES DE LA TRANSCRIPTASA INVERSA, EN PACIENTES SIN EXPOSICIÓN PREVIA AL TRATAMIENTO (NAIVE) , EN LOS HOSPITALES EUGENIO ESPEJO Y ENRIQUE GARCES DE LA CIUDAD DE QUITO, EN EL PERIODO AGOSTO 2016 –FEBRERO 2017"*

*"RESISTENCIA A LOS MEDICAMENTOS ANTIRRETROVIRALES INHIBIDORES DE PROTEASA E INHIBIDORES INTEGRASA EN PACIENTES ADULTOS CON INFECCION POR EL VIRUS DE INMUNO DEFICIENCIA HUMANA , EN LOS HOSPITALES EUGENIO ESPEJO Y ENRIQUE GARCES DE LA CIUDAD DE QUITO, EN EL PERIODO AGOSTO 2016 - FEBRERO 2017 "*

**Organización del investigador:**

**Nombre de la Universidad:** Universidad Estatal de Guayaquil.

**Institución:** Unidad de Posgrado, Investigación y Desarrollo.

**Empresa a la que pertenece el IP:** Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública, "Dr. Leopoldo Izquieta Pérez".

**Nombre de los investigadores:**

- ✓ Cosme Enrique Hidalgo Tapia
- ✓ Tatiana Vaturina Sivisaca Pucha

**1. Datos de localización del investigador principal:**

**Cosme Enrique Hidalgo Tapia:**

**Teléfono:** 2900235 – (INSPI-CZ9)

**Celular :** 0997383223

**Correo electrónico:**cosmehidalgo\_84@yahoo.es

**2. Datos de localización del investigador secundario:**

**Tatiana Vaturina Sivisaca Pucha:**

**Teléfono:** 2900235 – (INSPI-CZ9)

**Celular :** 0994773462

**Correo electrónico:**tatita-861@hotmail.com

**(Anexo consentimiento informado)**

Usted ha sido considerada/o para participar en el presente estudio, que se realizará en la ciudad de Quito. El propósito del presente documento es explicarle en qué consiste cada una de las etapas del mismo y usted pueda decidir participar.

### **Propósito en el estudio**

El virus de inmunodeficiencia humana (VIH) constituyen el agente etiológico del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). No existe una cura eficaz, pero con la atención médica adecuada, el VIH se puede controlar. Los medicamentos que se usan para tratar el VIH se llaman terapia antirretroviral, o TARV. Si se toman de la manera correcta, todos los días, estos medicamentos pueden prolongar drásticamente la vida de muchas personas infectadas por el VIH, mantenerlas saludables y reducir significativamente sus probabilidades de infectar a otras personas. La resistencia a la terapia anti-retroviral constituye uno de los problemas fundamentales en el éxito del tratamiento, en los pacientes infectados con virus de la inmunodeficiencia humana, al igual que las toxicidades y los problemas de adherencia. La resistencia del VIH a los medicamentos antirretrovirales ha sido un problema creciente en los últimos años, y se estudia a través de pruebas genotípicas y fenotípicas. La información que proporcionan estos estudios, resulta una herramienta crucial en la clínica a la hora de instaurar el tratamiento más apropiado. El objetivo del presente estudio es determinar la resistencia genotípica a los medicamentos antirretrovirales en muestras de sangre provenientes de pacientes adultos con infección por virus de inmunodeficiencia humana.

### **Procedimiento**

Si decide participar en el estudio, se le solicitará la donación de dos tubos de sangre, para lo cual se procederá a realizar una extracción sanguínea por un profesional, considerando las normas de bioseguridad y ética. Las dos muestras serán tomadas por personal calificado, formado, con experiencia y capacitado con las normativas específicas para desarrollar los diferentes procedimientos necesarios para este estudio.

### **Beneficios, riesgos y molestias**

Los responsables del estudio brindarán información a las personas incluidas en el estudio sobre los efectos de ser portador del VIH y los efectos que conlleva no tomar la medicación de la manera oportuna, así como medidas preventivas para evitar el contagio y posibles resistencias a antirretrovirales.

Los riesgos y molestias físicas causadas por la extracción en este estudio son las que se presentan en cualquier colecta de una muestra de sangre periférica que usted seguramente ya ha experimentado previamente. Puede sentir un ligero dolor, enrojecimiento o irritación del área de la que se tomó la sangre, que desaparecerán unos minutos después del procedimiento.

### **Criterios de inclusión del estudio**

Los pacientes elegibles deben cumplir los siguientes criterios:

- Diagnóstico confirmado de VIH de acuerdo a los criterios de diagnóstico de VIH establecidos en el Ecuador.
- Pacientes que inician TARV por primera vez
- Pacientes que van a reiniciar tratamiento después de haberlo dejado por tres meses
- Pacientes que firmen el consentimiento informado escrito.

El estudio se realizará mediante un muestreo aleatorio sistemático de pacientes que cumplan los criterios de inclusión establecidos en el documento y que sean atendidos durante el periodo de estudio en las unidades de salud seleccionadas.

Aquellos que cumplan con los criterios de inclusión serán invitados a participar en el estudio y una vez que acepten su participación se les hará firmar la hoja de consentimiento informado.

Una vez incluido, la información del paciente: identificación, edad, sexo, factores de riesgo y condición clínica será consignada en una ficha de recolección de datos propia del estudio.

#### **Participación voluntaria**

- Su participación es voluntaria usted puede retirarse en cualquier fase del estudio.
- Cabe recordar que su participación en el estudio puede finalizar por incumplimiento suyo a las instrucciones impartidas en el estudio, u otras razones, justificadas razonablemente en el campo médico.
- Los participantes están en todo el derecho de decidir si desean o no colaborar con el estudio, esa decisión será respetada y no conlleva a ninguna penalidad o pérdida de los beneficios a los cuales tiene derecho.

#### **Información y muestras codificadas**

Para proteger su confidencialidad, sus muestras y resultados serán registrados con un código, sin nombres ni datos de identificación. Los integrantes del equipo de investigadores guardarán el archivo con la vinculación de este código con su nombre, pero este no aparecerá bajo ningún motivo en cualquier producto relacionado con la presente investigación.

#### **Almacenamiento y análisis posteriores de las muestras**

El INSPI (Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública) almacenará sus muestras junto con otras procedentes de este estudio, y las mismas serán utilizadas solo para el propósito establecido. En todo momento las muestras se almacenarán en un lugar adecuado para las mismas, y se exigirá que las personas que trabajen con sus muestras respeten la confidencialidad de su información y resultados.

#### **Compromisos adquiridos por el proyecto de investigación**

El equipo de investigadores de este proyecto, luego de la colecta y análisis de las muestras se comprometen a elaborar un informe con los resultados encontrados, el que será entregado al médico tratante en un periodo no mayor a 3 meses después de realizada la toma de muestras.

#### **Aspectos comerciales**

Usted no recibirá ninguna compensación económica por la participación de este estudio.

#### **Personal de contacto para el estudio**

Si tiene preguntas acerca de esta investigación sobre cualquier daño relacionado a la extracción de sangre o su retiro del estudio, debe contactarse en cualquier momento con Lcdo. Cosme Enrique Hidalgo Tapia al número 0997383223, Director del Proyecto.

**CONSENTIMIENTO PARA TOMA DE MUESTRAS DE SANGRE PARA ANALISIS DE LABORATORIO.**

1. Comprendo mi participación en este estudio.
2. Me han explicado los riesgos y beneficios de participar en un lenguaje claro y sencillo.
3. Todas mis preguntas fueron contestadas.
4. Acepto voluntariamente participar en esta investigación.

**AUTORIZO**

Al equipo de salud para realizar el procedimiento.

Firma del paciente

Código del paciente

CI.

Nombre Representante Legal (en incapacidad del paciente)

..... Parentesco (padre, madre, tutor, esposo/ a, otro)

.....

Firma del representante

Fecha del consentimiento Informado.....

Huella indice derecho paciente

