



UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
FACULTAD DE MEDICINA
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**“VARIABILIDAD GENÉTICA DEL VIH DURANTE LA RESPUESTA A LA
TERAPIA ANTIRRETROVIRAL EN PACIENTES NAÏVE LUEGO DE 12 MESES
DE SEGUIMIENTO EN PANAMÁ 2016-2017”**

PRESENTADO POR:
Licda. Ambar Moreno TM
CIP 8-863-1855

ASESOR:
Alexander Martínez PhD, TM

Agradecimientos

A Dios por guiar cada una de mis decisiones y mantenerme enfocada durante la realización de esta investigación.

Les doy gracias a mis padres Milagro Ruiz y Raúl Moreno quienes me han apoyado en cada meta que me he propuesto. A mi esposo, Christian Castillo quien ha sido pilar fundamental en los momentos más difíciles y me ha brindado su apoyo incondicional.

A todo el departamento de Genómica y Proteómica del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud, en especial a la Mgter. Claudia González, Mgter. Oris Chavarría y a la Licda Jéssica Góndola quienes fueron un apoyo invaluable en la durante el desarrollo de esta investigación. Agradezco a Migdalys Ortega y Kimberly Zamora, técnicos asistentes del departamento, las cuales fueron parte fundamental en la búsqueda y organización de las muestras de este estudio.

A mis amigos y familiares quienes fueron apoyo moral incondicional desde el inicio y estuvieron allí para darme ánimos siempre que lo necesité.

Al Dr. Alexander Martínez por guiarme siempre durante los ensayos de esta investigación y por todos los conocimientos brindados.

INDICE

Abreviaturas	5
Resumen	10
Objetivo general y específicos.....	11
Capítulo I Marco teórico	
1.1 Origen y breve historia del Virus de Inmunodeficiencia Humana	13
Epidemiología del VIH	14
Estructuras, genes y proteínas del VIH	15
Receptores y co-receptores del VIH	16
Ciclo de replicación del virus	17
Terapia antirretroviral	19
Terapia antirretroviral en Panamá	21
1.6 Mecanismo de acción de los antirretrovirales	23
Inhibidores nucleosídicos de la transcriptasa inversa (INTI)	23
Inhibidores no nucleosídicos de la transcriptasa inversa (INNTI)	24
Inhibidores de la proteasa	24
Inhibidores de la fusión	25
1.7 Resistencia a los antirretrovirales	27
Mecanismo de resistencia frente a los antirretrovirales	29
Mecanismos de resistencia a inhibidores nucleosídicos de la transcriptasa (INTI)	29
Mecanismo de resistencia a inhibidores no nucleosídicos de la transcriptasa inversa (INNTI)	30
Mecanismo de resistencia a inhibidores de la proteasa	31
Mecanismo de resistencia a inhibidores de la fusión	32

1.8 Diagnóstico, pruebas de monitoreo y determinación de resistencia en personas viviendo con VIH /SIDA (PVVS)	34
1.9 Secuenciación de próxima generación (NGS) Illumina	35
Importancia del estudio de mutaciones minoritarias del VIH	40
Factores asociados a falla terapéutica	41
Capítulo II Metodología	44
Consideraciones éticas del estudio	45
Tipo de estudio	45
Ámbito del estudio	45
Universo	45
Población de estudio	45
Muestreo	46
Sujetos de Estudio	46
Criterios de inclusión	46
Criterios de Exclusión	47
Criterios de Eliminación	47
Capítulo III Resultados.....	73
Capítulo IV Discusión.....	114
Capítulo V Conclusiones y recomendaciones.....	124
Referencias bibliográficas.....	128
Anexos.....	141

Abreviaturas

1. CRFs: formas recombinantes circulantes
2. Pol II: ARN polimerasa II del huésped
3. TAR: terapia antirretroviral
4. NGS: Next Generation Sequencing
5. ARNm: ARN mensajero
6. ADNc: ADN complementario
7. PVVS: personas que viven con VIH/SIDA
8. INTI: Inhibidores nucleosídicos de la transcriptasa inversa
9. INNTI: Inhibidores no nucleosídicos de la transcriptasa inversa
10. IP: Inhibidores de la proteasa
11. INSTI: inhibidores de transferencia de la cadena de integrasa
12. ARVs: antirretrovirales
13. dNTPs: desoxirribonucleótidos trifosfatos
14. NHR: repeticiones heptada N-terminal
15. CHR: repeticiones heptada C-terminal
16. TBE: tris borato de EDTA
17. EFV: efavirenz
18. 3TC: Lamivudina
19. TDF: Tenofovir
20. LPV/r: lopinavir
21. RTV: ritonavir
22. DTG: Dolutegravir
23. RAL: Raltegravir
24. ABC: abacavir
25. AZT: Zidovudina
26. SQV: saquinavir
27. ATV: atazanavir
28. DOR: dorunavir

Tabla de figuras

Figura 1 Estructura del VIH	16
Figura 2. Ciclo de replicación del VIH	19
Figura 3. Representación esquemática de la secuenciación por síntesis.	36
Figura 4. Flujo de Trabajo de Illumina NGS.	37
Figura 5. Flujo de trabajo utilizado para la selección de muestras analizadas en este estudio.	49
Figura 6. Esquema del flujo general de la secuenciación por NGS.....	67
Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa para los productos amplificados de la proteasa, transcriptasa inversa e integrasa (amplificación completa del gen pol)...	77
Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa para los productos amplificados de la proteasa y transcriptasa inversa (amplificación parcial del gen pol)..	78
Figura 9. Datos de cobertura y profundidad de lecturas obtenidos en las muestras analizadas..	82
Figura 10. Gráfico de frecuencia de cambios en aminoácidos en el fragmento de la proteasa..	83
Figura 11. Histograma de frecuencia de cambios en aminoácidos en el fragmento de la transcriptasa inversa.	84
Figura 12. Histograma de frecuencia de cambios en aminoácidos en el fragmento de la integrasa.	85
Figura 13. Frecuencia de mutaciones asociadas a resistencia identificadas en la proteasa en los sujetos de estudio	87
Figura 14. Frecuencia de mutaciones asociadas a resistencia identificadas en la transcriptasa inversa en los sujetos de estudio	88
Figura 15. Frecuencia de mutaciones asociadas a resistencia identificadas en la integrasa en los sujetos de estudio	90
Figura 16. Distribución y correlación entre los monitoreos de la carga viral y los Linfocitos T CD4+ en sujetos con posible fallo virológico..	94
Figura 17. Frecuencia de mutaciones minoritarias asociadas a resistencia identificadas en la transcriptasa inversa en sujetos con fallo virológico.	95

Figura 18. Lecturas obtenidas en cada mutación identificada en baja frecuencia.....	98
Figura 19. Lecturas obtenidas en cada mutación identificada en baja frecuencia.....	101
Figura 20. Polimorfismos con mayor frecuencia identificados en la proteasa en los sujetos de estudio con la secuenciación de Sanger.....	104
Figura 21. Distribución y correlación entre los monitoreos de la carga viral y los Linfocitos T CD4+ en sujetos con mutaciones minoritarias asociadas a resistencia en la proteasa.....	108
Figura 22. Polimorfismos de mayor frecuencia identificados en la transcriptasa inversa en los sujetos de estudio con la secuenciación de Sanger.....	109
Figura 23. Distribución y correlación entre los monitoreos de la carga viral y los Linfocitos T CD4+ en sujetos con mutaciones minoritarias asociadas a resistencia en la transcriptasa inversa.	112

Índice de Tablas

Tabla 1. Cebadores utilizados para la amplificación de productos del fragmento parcial del VIH.	52
Tabla 2. Cebadores para amplificación fragmento completo del VIH: transcriptasa inversa, proteasa e integrasa.	55
Tabla 3 Materiales y reactivos para amplificación de ARN viral a partir de plasma con EDTA	68
Tabla 4 Reactivos, materiales y equipos necesarios para la preparación de librerías de Illumina	70
Tabla 5. Datos clínicos y demográficos de los 78 participantes naïve VIH-1 positivos y sensibles a la terapia antirretroviral en su diagnóstico inicial.	71
Tabla 6. Métricas de la secuenciación MiSeq	75
Tabla 7. Listado de muestras con mutaciones minoritarias de los INTR con frecuencia $\geq 5\%$ de la población viral y su interpretación en la TAR.	80
Tabla 8. Listado de muestras con mutaciones accesorias minoritarias o polimórficas de los INSTI con frecuencia $\geq 5\%$ de la población viral y su interpretación frente a los antirretrovirales.	92
Tabla 9. Listado de muestras con mutaciones minoritarias de los INPR con frecuencia $\leq 1\%$ de la población viral y su interpretación frente a los antirretrovirales.	97
Tabla 10. Listado de muestras de seguimiento con carga viral ≥ 1000 copias/mL luego de 2 meses de monitoreo con mutaciones minoritarias de los Inhibidores de	

la transcriptasa inversa con frecuencia $\leq 1\%$ de la población viral y su interpretación frente a los antirretrovirales..... 100

Tabla 11. Listado de muestras con TAMS identificadas en los sujetos del estudio.....102

Tabla 12. Listado de muestras de seguimiento luego de 2 meses de monitoreo con mutaciones minoritarias de los INSTI con frecuencia $\leq 1\%$ de la población viral y su interpretación frente a los antirretrovirales.....
103

Tabla 13. Comparación entre Sanger e Illumina en muestras con mutaciones asociadas a resistencia de los Inhibidores de la proteasa presentes en sujetos que no logran supresión viral luego de 2 meses de monitoreo..... 106

Tabla 14. Comparación entre polimorfismos identificados mediante a metodología de Sanger e Illumina de los inhibidores de la transcriptasa inversa..... 110

Resumen

La presencia de mutaciones asociadas a resistencia en sujetos que no han sido expuestos previamente a la terapia antirretroviral, generan consecuencias negativas en la efectividad del mismo. Estos sujetos pueden presentar mayor retos para lograr valores de carga viral indetectable de forma sostenida. Debido a esto, estudios con metodologías más sensibles para determinar la resistencia del VIH, son necesarios para detectar mutaciones en baja frecuencia que podría ser la causante de fallo virológico en esta población. En este estudio, se evaluaron muestras colectadas en entre los años 2016-2017, de sujetos adultos naïve sensibles al tratamiento. Se realizó una evaluación de aquellos sujetos que a lo largo de 12 meses de monitoreo, no lograron valores de carga viral indetectable o supresión viral sostenida con el objetivo de identificar la presencia de mutaciones o variantes virológicas en baja frecuencia asociadas a resistencia frente a los antirretrovirales utilizando la metodología de secuenciación masiva NGS Illumina para secuenciar el gen pol incluyendo las 3 enzimas de mayor importancia: transcriptasa inversa, proteasa e integrasa. En este estudio identificamos mutaciones asociadas a resistencia en la transcriptasa inversa y proteasa, sin embargo, en la integrasa las mutaciones identificadas no generaron cambios en la sensibilidad de los antirretrovirales utilizados en Panamá. Mediante los resultados obtenidos, será posible suministrar información al Ministerio de Salud sobre la importancia de utilizar metodologías altamente sensibles para la identificación de mutaciones asociadas a resistencia en baja frecuencia y evaluar el impacto de las mutaciones identificadas en sujetos que no logran supresión viral sostenida.

Objetivo general

- Identificar las variantes virológicas de VIH y su relación en la respuesta a la terapia antirretroviral en pacientes naïve inicialmente sensibles al tratamiento luego de 12 meses de seguimiento.

Objetivos específicos

- Determinar y clasificar las variantes virológicas encontradas de acuerdo a su importancia epidemiológica.
- Comparar las variantes virológicas encontradas con los valores de linfocitos T CD4+, carga viral y el tiempo en alcanzar la supresión viral.
- Evaluar y comparar el desempeño de la metodología de secuenciación de próxima generación (NGS) Illumina con la metodología de secuenciación de Sanger

Capítulo I

MARCO TEÓRICO

1.1 Origen y breve historia del Virus de Inmunodeficiencia Humana

El Virus de Inmunodeficiencia Humana es un lentivirus que pertenece a la familia Retroviridae ¹ el cual fue identificado por primera vez en el año 1983 y actualmente se estima que 38 millones de personas están infectadas en todo el mundo ². Se clasifica en 4 grupos: M, N, O y P siendo el grupo M el más propagado a nivel mundial y este se clasifica a su vez en 9 subtipos (A–D, F–H, J, K) ³. Por otro lado, existen más de 40 diferentes formas recombinantes circulantes (CRFs) las cuales son generadas en procesos intracelulares cuando múltiples subtipos de VIH-1 infectan una misma célula huésped. Cuando el virión que contiene ambas hebras de ARN combinadas entra a una nueva célula huésped, ocurre la transcripción del ARN compuesto de los segmentos virales de ambos subtipos y se conoce como genoma recombinante inter-subtipo. Este material recombinante, al ser transmitido a la población en general, logra convertirse en una de las cepas circulantes del VIH-1⁴.

El VIH se caracteriza por poseer una extensa variabilidad genética debido a la alta tasa de error de la enzima transcriptasa inversa (TI). Sus propiedades recombinantes o capacidad para generar diversas variantes genéticas entre subtipos y altas tasas de replicación del virus de aproximadamente resultan en la generación rápida de poblaciones virales que pueden diferir hasta en un 10% en cada individuo infectado ^(10,5,6).

La transcriptasa inversa presenta una alta tasa de mutación de aproximadamente 3.4×10^{-5} mutaciones por par de bases por ciclo de replicación, introduciendo una incorporación errónea por cada 104 nucleótidos ^(7,8). Los errores son aleatorios, lo que resulta en variaciones en la secuencia de los virus de la progenie y las proteínas virales traducidas.

La capacidad de recombinación, las altas tasas de replicación viral y mutación genómica (inserciones y deleciones) son características que contribuyen a la alta variabilidad genética del VIH-1 el cual es capaz de producir una población viral con alta diversidad genética dentro de un individuo, también conocida como infección dual. Esto es especialmente común en las infecciones por VIH-1 ⁹.

1.2 Epidemiología del VIH

A mediados del 2020, 38 millones de personas estaban viviendo con VIH de los cuales 26 millones tenían acceso a la terapia antirretroviral. Según las metas del 90-90-90 a nivel mundial, 81% de las PPVVS conocían su estado clínico, 82% tenían acceso al tratamiento y 88% presentaban supresión viral ¹¹.

En Panamá, 26, 000 personas estaban viviendo con VIH para el año 2018 de los cuales 13, 000 estaban recibiendo terapia antirretroviral (TAR). Según datos obtenidos por parte del programa nacional de VIH, se evidencia que solo el 54 % de

los sujetos bajo tratamiento logran alcanzar supresión viral sostenida en Panamá, porcentaje bajo con respecto al 90 % esperado en las metas del 90-90-90 ¹².

Un estudio realizado en Panamá donde se evaluaron secuencias de VIH del 2007 al 2012 reveló que el 9.2 % de la población analizada tenía al menos una mutación asociada a resistencia primaria o transmitida ¹³. Otro estudio que evaluó muestras tomadas del 2016 al 2018 mostró un aumento en esa prevalencia al 15.2 %, con una proporción desigual cuando se compararon muestras provenientes de la ciudad y de áreas apartadas del país. Estos datos sugieren que en Panamá hay transmisión sostenida de mutaciones asociadas a resistencia.

1.3 Estructuras, genes y proteínas del VIH

Las partículas virales del VIH tienen un diámetro de 100-400 nm de diámetro y están rodeadas por una membrana rica en glicoproteínas y proteínas de membrana de la célula blanco original.

El virus está compuesto por ARN de una sola hebra y 3 genes principales llamados gag, env y pol. El gen gag es el encargado de codificar las proteínas estructurales (p55, p24 y p17), el gen env codifica las glicoproteínas de envoltura (gp 160, gp 120 y gp 41) y el gen pol, que codifica la información de la transcriptasa inversa, proteasa (p66, p51 y p31) e integrasa las cuales se presentan en la figura 1 ¹⁴.

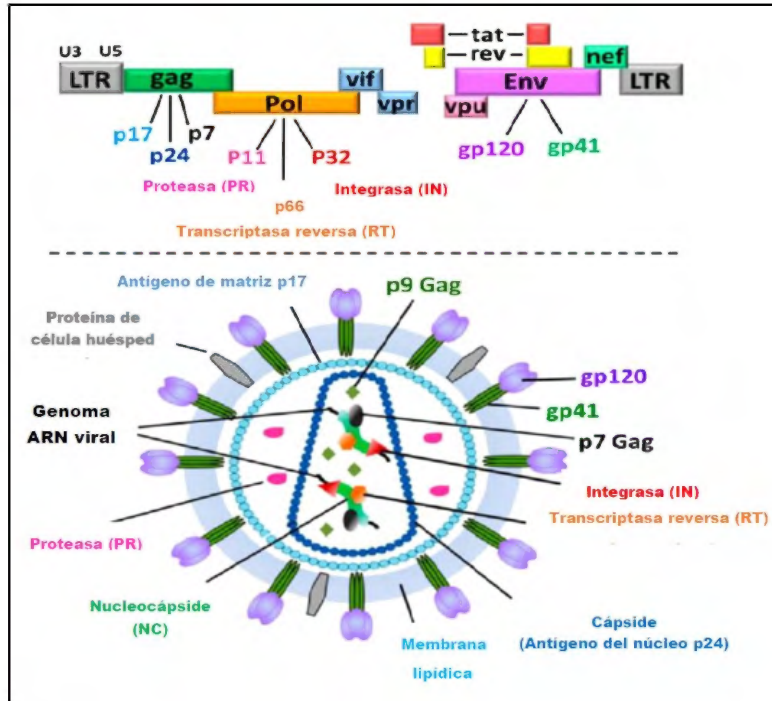


Figura 1 Estructura del VIH. En la imagen se identifica los genes, proteínas y enzimas que confirman el virus.¹⁵

1.4 Receptores y co-receptores del VIH

La célula blanco principal del virus es el linfocito T CD4+ al que ingresa mediante la unión de la glicoproteína 120 y la gp41 a receptores presentes en su membrana llamados CXCR4 o CCR5¹⁶. Estos receptores fueron descritos por primera vez en el año 1996 y estudios previos sugieren que el tropismo viral del VIH-1 está relacionado a la preferencia del virus por ingresar a la célula huésped mediante uno de estos correceptores.

Se ha demostrado que aquellos virus con tropismo al correceptor CCR5 (virus R5) están relacionados a los estadios tempranos de la infección, mientras que los virus que prefieren el receptores CXCR4 (virus X4) o ambos (tropismo dual; virus R5X4) se observan en una fase tardía de la enfermedad ¹⁷.

1.5 Ciclo de replicación del virus

La replicación del virus comienza con el ensamble de la glicoproteína de membrana del virus llamada gp120. La gp120 se une al receptor que se encuentra presente en la superficie del linfocito T CD4+, monocitos o macrófagos y este puede ser el receptor CXCR4 o el correceptor CCR5. La unión de la gp120 a estos receptores provoca cambios conformacionales en esta glicoproteína causando un acercamiento entre receptores del virus y la célula huésped (Figura 2)¹⁸. Luego, ocurre la fusión entre ambas membranas y el contenido del virus es liberado dentro de la célula iniciando el proceso de transcripción por medio de la enzima transcriptasa inversa la cual transcribe el ARN viral a una molécula de ADN de doble cadena ¹⁹.

Posteriormente en el núcleo, el ADN viral de doble cadena es integrado al ADN de la célula blanco por medio de la enzima integrasa, una ADN recombinasa especializada la cual es la encargada de integrar el ADN a la célula huésped mediante un proceso de transcripción. Inicialmente, la integrasa escinde 2 nucleótidos de los 2 extremos 3' de la doble cadena de ADN viral y luego el ADN es

transferido al núcleo del ADN de la célula huésped mediante reacciones de transesterificación fosfodiéster ^(20, 21).

Si el virus continúa el proceso, da como resultado una nueva partícula viral. Por el contrario, si el virus detiene el proceso, se mantendrá integrado en el ADN de la célula blanco en un estado latente, proceso en el cual el virus no producirá partículas virales pero es capaz de persistir de forma latente en las células del organismo infectado durante largos periodos de tiempo ²².

Una vez integrado el ADNc, comienza la síntesis de proteínas víricas y ARNm (ARN mensajero) los cuales posteriormente se ensamblan en la membrana para dar origen a un nuevo virión ²³. Finalmente, el virión es liberado en sangre y puede contener glicoproteínas de membrana de la célula blanco que luego le permitirán evadir la respuesta inmune del organismo ²⁴.

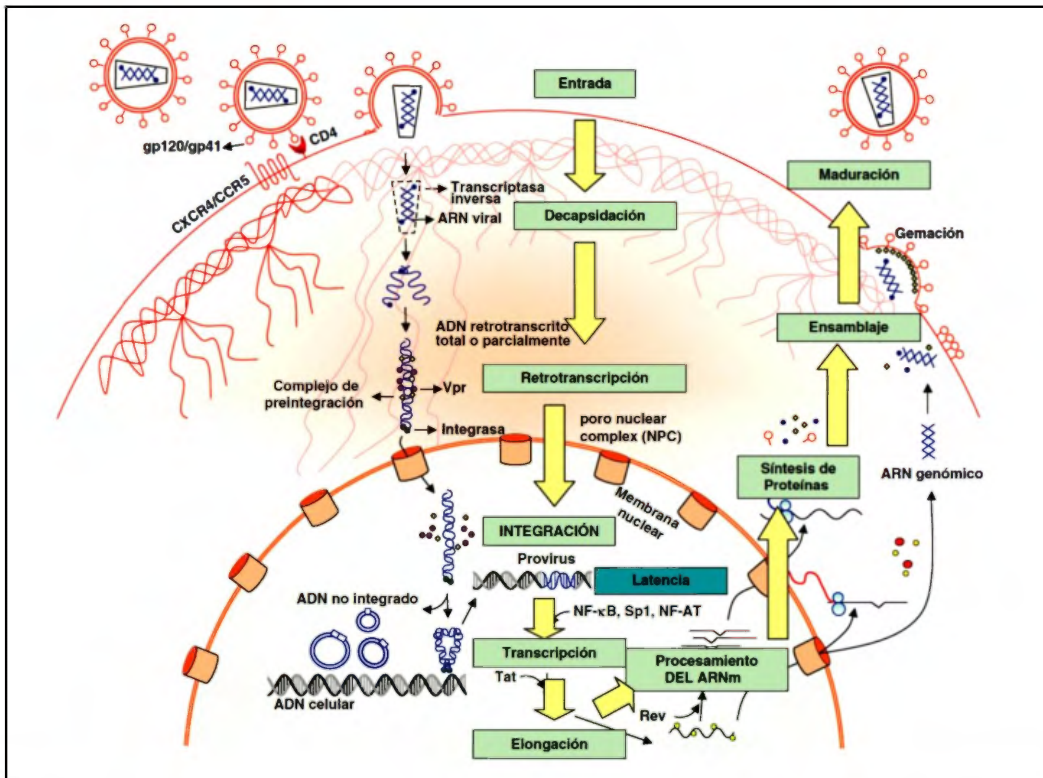


Figura 2. Ciclo de replicación del VIH. El ciclo del virus inicia con la unión de los receptores de membrana del virus a los de la célula blanco, una vez dentro el virus inicia el proceso de replicación donde utiliza sus enzimas y la maquinaria de la célula huésped para su replicación. ²⁵

1.6. Terapia antirretroviral

Al inicio de la epidemia en el año 1981, no existía tratamiento disponible para tratar la infección. Posteriormente, en el año 1985 la FDA aprobó la Zidovudina (AZT) como el primer tratamiento aprobado para el tratamiento de la infección por el VIH-1 ⁽²⁶⁾. A partir de ese momento, los esfuerzos por desarrollar antirretrovirales

incrementaron con el pasar de los años. Sin embargo, no existe un tratamiento antirretroviral que permita eliminar el virus de un sujeto infectado.

El desarrollo de antirretrovirales que actúan en diferentes etapas del ciclo replicativo del virus, ha contribuido a mejorar la calidad de vida de las PVVS ya que es posible tratar la infección del VIH-1 como una enfermedad tipo crónica y no como una enfermedad fatal.

Los antirretrovirales utilizados en los esquemas de tratamiento, se caracterizan por presentar menos efectos adversos, baja toxicidad y mayor eficacia en comparación con los administrados en el inicio de la epidemia.

Los principales objetivos de la terapia antirretroviral son mejorar y prolongar la vida del sujeto infectado, reducir la transmisión del virus, recuperar las defensas del organismo, disminuir la morbilidad y la mortalidad ²⁷.

En el año 2016, según las recomendaciones de la OMS, se establecieron nuevas directrices para el uso de los antirretrovirales en sujetos con diagnóstico reciente de VIH-1. Una de las principales recomendaciones se basa en la indicación de la TAR en adultos, independientemente del estado clínico y valores de linfocitos T CD4+ del individuo ²⁸.

1.6.1 Terapia antirretroviral en Panamá

Actualmente, en países desarrollados utiliza la terapia antirretroviral de gran efectividad (HAART, por sus siglas en inglés) la cual se caracteriza por utilizar antirretrovirales con diferentes mecanismos de acción, logrando mejores resultados que la terapia antirretroviral de un solo medicamento. La HAART ha sido utilizada desde mediados de los años 90 ⁽²⁹⁾. Sin embargo, en Panamá los esquemas más utilizados en población adulta son el TLD (conformado por Tenofovir (TDF)+ Lamivudina (3TC)+ Dolutegravir (DTG)) y la Atripla (conformada por Tenofovir (TDF), Efavirenz (EFV) + Emtricitabina (FTC)).

En Panamá, según las Normas de manejo terapéutico del año 2016 se basa en los siguientes esquemas:

- **Esquema de primera línea**

El esquema de elección o primera línea consiste en la administración de 2 Inhibidores nucleosídicos de la transcriptasa inversa (INTI) + 1 INNTI (Inhibidores no nucleosídicos de la transcriptasa inversa). Sin embargo, existen dos esquemas de manejo de primera elección.

La elección de los INTI dependerá de la disponibilidad del antirretroviral y la decisión clínica respecto a riesgo de anemia (en el caso del AZT) o de daño renal (en el caso del TDF).

- **Esquema 1:** Lamivudina (3TC) 150 mg o Emtricitabina (FTC) 200 mg/Tenofovir (TDF) 300 mg/EFV 600 mg 1 tableta vía oral al día (ATRIPLA).

Este esquema ha sido implementado en Panamá desde el año 1999 y actualmente se administra en población infectada con Tuberculosis, privados de libertad o sujetos que presentan contraindicaciones frente al esquema TLD.

Esquema TDL: conformado por Tenofovir (TDF) + Lamivudina (3TC) + Dolutegravir (DTG) utilizado en Panamá desde el año 2019.

- **Esquema 2:** Zidovudina (AZT) 300 mg/3TC 150 mg) 1 tableta VO cada 12 horas + Efavirenz (EFV) 600 mg Vía oral 1 tableta cada noche ³⁰.

- **Esquema de segunda línea**

Tratamiento de segunda línea en adolescentes y adultos viviendo con VIH: 2 INTR + 1 IP/r el cual debe ser recomendado por el especialista en enfermedades infecciosas.

Ritonavir (RTV) actúa como un potenciador del otro IP en los esquemas, permitiendo disminuir la dosis de este último y por lo tanto los efectos secundarios³⁰.

En caso de fallo virológico, confirmado con una prueba de carga viral:

- Si el paciente falla al tratamiento inicial usando Tenofovir (TDF) + Emtricitabina (FTC) o Lamivudina (3TC) + Efavirenz (EFV) se recomienda cambiar a:
 - Zidovudina (AZT) + Abacabir (ABC) o Didanosina (ddI) + Lopinavir (LPV/r)
 - Zidovudina (AZT) + Abacabir (ABC) o Didanosina (ddI) + Saquinavir (SQV) + Ritonavir (RTV)

- Zidovudina (AZT) + Abacabir (ABC) o Didanosina (ddI) + Atazanavir (ATV) + Ritonavir (RTV)

➤ Si el paciente falla al tratamiento inicial usando AZT/3TC + EFV se recomienda cambiar a:

- TDF + ABC + LPV/r
- TDF + ABC + SQV + RTV
- TDF + ABC + ATV + RTV

1.6.3 Mecanismo de acción de los antirretrovirales

1.6.3.1 Inhibidores nucleosídicos de la transcriptasa inversa (INTI)

Como indica su nombre, los antirretrovirales dentro de esta categoría son inhibidores de la enzima transcriptasa inversa. Estos antirretrovirales compiten con los nucleósidos endógenos por lo cual también se les conoce como análogos nucleosídicos. Al competir por el nucleósido durante la síntesis de ADN proviral en el sitio activo de la polimerasa, estos son fosforilados y por medio de este mecanismo de acción actúan como terminadores de cadena e interfieren en la extensión del ADN ^{31, 32}.

El grupo azido produce la terminación de la síntesis de ADN y de esta forma bloquea la replicación del virus.

Las más utilizadas en Panamá son: Lamivudina (3TC) y Emtricitabina (FTC), Zidovudina (AZT) y Didanosina (ddl).

1.6.3.2 *Inhibidores no nucleosídicos de la transcriptasa inversa (INNTI)*

Estos antirretrovirales también inhiben la transcriptasa inversa pero se diferencian de los INTI por la presencia de nucleótidos en lugar de los nucleósidos. Debido a esta diferencia, los INNTI presentan ventaja en el proceso inhibición ya que no deben realizar el paso de conversión de un nucleósido a nucleótido, lo cual le confiere menor toxicidad en comparación con los INTI. Su mecanismo de acción se basa en la unión a un sitio alostérico situado a 10 Å del sitio activo de la enzima Transcriptasa inversa, lo que interfiere con el proceso normal de la enzima ³³.

Entre los INNTI más comunes se encuentran: Nevirapina (NVP), efavirenz (EFV), etravirina (ETR) y rilpivirina (RPV).

1.6.3.3 *Inhibidores de la proteasa*

La introducción al mercado de los inhibidores de proteasa, inició en el año 1995 con Saquinavir, el cual fue utilizado en combinación con Inhibidores de la transcriptasa inversa como esquema HAART.

Los IP son inhibidores competitivos del sitio activo de proteasa del VIH-1, evitando que la enzima catalice la hidrólisis de la poliproteínas Gag y Gag/Pol las cuales son necesarias para convertir las nuevas partículas virales inmaduras no infecciosas, en partículas virales maduras e infecciosas.

1.6.3.4 *Inhibidores de la fusión*

En la membrana del virus, el dominio extracelular de gp41 contiene tres regiones importantes: péptido de fusión (FP), repeticiones heptada N-terminal (NHR) y C-terminales (CHR), siendo estas 2 últimas los principales objetivos de los antirretrovirales desarrollados para inhibir la fusión del virus con la célula huésped.

Por lo tanto, los inhibidores de la fusión pueden subdividirse en dos clases:

a) Se unen al dominio HR1 y HR2 de la glicoproteína viral gp41 impidiendo la fusión de la envoltura viral con la membrana celular. En este grupo se incluye el Enfuvirtida, el cual tiene una barrera genética baja y si no se administra con otros fármacos activos rápidamente aparecen mutaciones de resistencia, perdiendo su eficacia ³⁴.

b) Bloqueadores o antagonistas del correceptor CCR5: interactúan con la molécula CCR5, generando un cambio conformacional que evita la unión con la gp120 viral. Dentro de este grupo se encuentran: Maraviroc (aprobado por FDA en el año 2007) y Ceniciviroc (Aún en fase clínica II) que han demostrado su potencial eficacia en el bloqueo de la entrada del virus a la célula blanco. Otros antirretrovirales como Aplaviroc y Vicriviroc han sido estudiados para combatir la

infección por el virus, sin embargo, debido a la hepatotoxicidad y baja eficacia observadas en fases clínicas no lograron su aprobación ³⁵.

1.6.3.5 *Inhibidores de transferencia de la cadena de integrasa (INSTI)*

Los INSTI son los antirretrovirales con aprobación más reciente de la FDA. Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la enzima integrasa la cual se encarga de incorporar el ARN viral del VIH en el ADN de la célula huésped, proceso clave en la replicación del virus dentro del individuo por lo cual ha sido seleccionada como un blanco clave para detener el proceso replicativo ³⁶. Su mecanismo de acción se basa en la inhibición del segundo paso catalizado por la Integrasa (hebra de transferencia) uniéndose de manera competitiva al sitio activo de la enzima. Además, también son capaces de realizar el proceso de quelación del catión divalente (Mg^{2+} o Mn^{2+}) que es requerido para la actividad de la Integrasa ³⁷.

Raltegravir (RAL) fue el primer fármaco inhibidor de la Integrasa aprobado por la FDA en el año 2007. Sin embargo, con el paso de los años, otros fármacos han sido comercializados: elvitegravir (EVG, 2012), dolutegravir (DTG, 2013), bictegravir (BIC, 2018) y cabotegravir (CAB) ³⁸.

Estos fármacos actúan mediante distintos mecanismos:

- a) Interfiriendo en la unión de la Integrasa al ADNc final
- b) Interfiriendo en la oligomerización de la Integrasa

- c) Actividad 3-P
- d) Actividad de la hebra de transferencia
- e) Actividad entre interacciones de proteínas cofactores celulares-Integrasa.
- f) Sitio activo de la integrasa mediante metales quelantes ³⁹

1.7 Resistencia a los antirretrovirales

El VIH se caracteriza por presentar una alta capacidad de replicación y generación de variantes virológicas con errores generados por la transcriptasa inversa. La generación espontánea de mutaciones ha sido atribuida a la falta de un mecanismo de corrección de errores 3'-5' exonucleasa en el proceso de replicación viral y a alta tasa de errores producidos por la transcriptasa inversa ⁴⁰. Estos cambios en las secuencias del virus pueden conferir características beneficiosas como aumento en la tasa de replicación viral, resistencias o incrementar la barrera genética frente a los antirretrovirales. Por el contrario, estos cambios también pueden afectar negativamente las características propias del virus, disminuyendo la replicación del virus o generando cambios que causen menor resistencia frente a los antirretrovirales.

Los cambios producidos en la secuencia del virus pueden ocurrir de forma espontánea o por la presión selectiva que generan los antirretrovirales y pueden ser definidos de la siguiente manera:

- Polimorfismos: cada una de las diferentes variantes en las secuencias de un gen y en el VIH, pueden presentarse en sujetos que no han tomado tratamiento previo y no causan mayores implicaciones en la sensibilidad del virus frente a los antirretrovirales.
- Mutaciones: cambios que ocurren en la estructura genética el virus y están asociadas a la resistencia fenotípica frente a los antirretrovirales. Se expresan a modo de codones en donde se indica la posición del aminoácido en la cepa silvestre, la posición y por último el aminoácido que lo sustituye. En el VIH la presencia de una o más mutaciones son capaces de causar resistencia del virus frente a los antirretrovirales. Estos cambios en los nucleótidos del virus pueden ser adiciones, sustituciones o deleciones causadas por la presión selectiva de los antirretrovirales, baja adherencia al tratamiento, alta variabilidad del virus, interacciones entre antirretrovirales o factores farmacocinéticos ^(41,42).

Las mutaciones pueden clasificarse en:

- Mutaciones primarias: causan disminución en la unión del fármaco a su enzima diana y son las primeras mutaciones seleccionadas durante la terapia. Es necesario incrementar la cantidad de fármaco necesario para inhibir la enzima.
- Mutaciones secundarias: estas mutaciones contribuyen a la resistencia a los medicamentos mejorando la aptitud de los virus portadores de mutaciones primarias. Estas tienen poco efecto directo sobre la unión del inhibidor ⁴³.

Se han definido dos tipos de resistencias:

- Resistencia primaria o transmitida: mutaciones identificadas en sujetos que no han presentado exposición previa a los tratamientos antirretrovirales.
- Resistencia secundaria o adquirida: mutaciones presentes en sujetos con exposición previa a los tratamientos antirretrovirales. Estas variantes son producidas a partir de la cepa salvaje del virus y el individuo puede presentar una mezcla de la cepa salvaje y nuevas variantes generadas ⁴⁴.

1.7.1 Mecanismo de resistencia frente a los antirretrovirales

1.7.1.1 Mecanismos de resistencia a inhibidores nucleosídicos de la transcriptasa inversa (INTI)

Se han descrito 2 mecanismos genéticos de resistencia del VIH frente a los INTR:

- a) Mutaciones discriminatorias que permiten a la transcriptasa inversa, distinguir entre terminadores de cadena didesoxi-INTR y los dNTP propios de la célula; evitando así que los INTR logren incorporarse al ADN viral y cumplir su función dentro del ciclo. Entre las mutaciones más comunes se encuentran: M184V/I, K65R, K70E/G/Q, L74V/I, Y115F y el complejo de mutaciones Q151M ⁴⁵.
- b) Mutaciones de desbloqueo de cebadores: estas mutaciones facilitan la escisión fosforilítica de un INTR-trifosfato del ADN viral. Este grupo de mutaciones también se le conoce como mutaciones análogos de timidina (TAM por sus siglas en inglés) ya que son seleccionadas por análogos de timidina como la Zidovudina

(AZT) y estavudina (d4T) ⁴⁶. Entre las más comunes se encuentran: M41L, D67N, K70R, L210W, T215FY y K219QE.

Las mutaciones multi resistentes como la inserción T69 se observa frecuentemente en conjunto con las mutaciones análogos de Timidina. Por último, entre las mutaciones accesorias más comunes se encuentran: A62V, V75I, F77L y la F116Y.

1.7.1.2 Mecanismo de resistencia a inhibidores no nucleosídicos de la transcriptasa inversa (INNTI)

Los INNTI emplean un mecanismo de unión a un bolsillo hidrofóbico cercano al sitio catalítico de la enzima y mediante una inhibición alostérica desplazan residuos aspárticos asociados al sitio de unión a la polimerasa por lo que las mutaciones responsables de resistencia a estos ARVs se encuentran dentro del bolsillo hidrofóbico, reduciendo la afinidad de la droga a su sitio de unión en la enzima.

La presencia de una mutación puntual puede generar un alto nivel de resistencia a uno o todos los INNTI. Además, la presión terapéutica que ejercen los ARVs contribuye a que incremente el número de mutaciones rápidamente. Los INNTI de segunda generación se caracterizan por presentar una alta barrera genética debido a la elevada flexibilidad molecular que presentan estos ARVs, facilitando su adaptación a este espacio en presencia de mutaciones ⁴⁷.

Estas mutaciones se producen en el bolsillo al que apuntan los inhibidores, y reducen la afinidad de la droga a su sitio de unión en la enzima ⁴⁸. Las mutaciones más frecuentes dentro de esta categoría son: K103N que reduce la efectividad de Nevirapina (NVP) y Efavirenz (EFV); y las mutaciones L100I, K101EP, Y181C, Y181L, G190ASE, M230L que confiere resistencia a Nevirapina (NVP), Efavirenz (EFV), Etravirina (ETV) y Rilpivirina (RPV).

1.7.2 Mecanismo de resistencia a inhibidores de la proteasa

Las mutaciones de la proteasa del VIH-1 se pueden clasificar en 2 grupos:

a. Mutaciones primarias: estas mutaciones ocurren de forma temprana y afectan directamente el sitio de unión del inhibidor de proteasa a la enzima mediante sustituciones de aminoácidos, reduciendo la afinidad del sustrato por la proteasa. Estas mutaciones pueden localizarse en el sitio activo de la proteasa y las localizadas en regiones cercanas al sitio de corte de las poliproteínas Gag y Gag-pol. Debido a que la mayoría de los inhibidores de proteasa presentan pocas diferencias en su estructura química, es frecuente observar que algunas mutaciones primarias generan resistencia simultánea a varios inhibidores de proteasa.

Entre las más importantes se encuentran: D30N, V32I, M46I/L, I47V/A, G48V, I50L/V, I54V/T/A/L/M, L76/v, V82A/F/S/T/L, I84V, N88V/S y L90M ⁴⁹.

b. Mutaciones secundarias: se localizan fuera del lugar activo de la proteasa y en general aparecen más tarde que las primarias. La presencia única de estas

mutaciones no causa resistencia a los fármacos pero permiten al virus adaptarse al efecto producido por la mutación primaria.

Entre las más importantes se encuentran: L10I/V/F, K20R/M/I, L24I, V32I, M36I/L/V, M46I/L, I47V, F53L, I54V/L, A71V/T/I, G73C/S/T/A, and N88D/S/T.

1.7.3 Mecanismo de resistencia a inhibidores de la fusión

Las mutaciones predominantes en esta clasificación se ubican mayormente en el sitio de unión del inhibidor de la fusión, en este caso la Enfuvirtida (ENF) también conocida como T20. Estas mutaciones se localizan particularmente dentro del aminoácido hidrofóbico Gly36-Leu45.

Se pueden clasificar en:

- a) Mutaciones primarias: mutaciones del péptido repeticiones heptada N-terminal (NHR)
- b) Mutaciones secundarias: mutaciones del péptido repeticiones heptada H-terminal (CHR) como N126K y S138A ⁵⁰.

1.7.4 Mecanismo de resistencia a inhibidores de la integrasa

Se han descrito 3 mecanismos de resistencias principales del VIH frente a los inhibidores de la Integrasa:

- a) El primero: mutaciones que generan cambios conformacionales dentro del bolsillo catalítico de la integrasa (inhibición alostérica parcial).
- b) El segundo: cambio en dos aminoácidos ubicados cerca del sitio catalítico de la enzima, inhibiendo la unión del cofactor metálico y el magnesio, necesarios para la acción de la integrasa lo que puede conocerse como un mecanismo común de secuestro de metales ⁵¹.
- c) Tercero: es dirigido por mutaciones que disminuyen la unión entre raltegravir y la integrasa, interfiriendo directamente con la actividad del inhibidor de integrasa.

Entre las más importantes se encuentran: T66K/A/I, E92Q, G118R, E138K/A/T, G140S/A/c, Q148H/R/K, N155H y R263K que confieren resistencia a Bictegravir (BIC), Dolutegravir (DTG), Elvitegravir (EVG) y Raltegravir (RAL). La mutación Y143R/C y S147G, confieren resistencia a Raltegravir (RAL) y Elvitegravir (EVG) respectivamente.

1.8 Diagnóstico, pruebas de monitoreo y determinación de resistencia en personas viviendo con VIH /SIDA (PVVS)

El diagnóstico inicial de un sujeto VIH positivo, es determinado con la prueba confirmatoria. El monitoreo de las PVVS se realiza mediante las pruebas de conteo de Linfocitos T CD4+ la cual tiene como objetivo principal, conocer el estado inmunológico del sujeto. Por otra parte, determinar la carga viral ayuda a comprobar la eficacia de la terapia antirretroviral y respuesta del individuo.

La prueba de resistencia del VIH ante los antirretrovirales, cumple un papel determinante en el manejo clínico de esta población ya que permite conocer la resistencia o sensibilidad del virus a los medicamentos antirretrovirales. Según las recomendaciones de la OMS, esta prueba debe realizarse en pacientes que no han tomado TAR previa para determinar la presencia de mutaciones que puedan afectar la eficacia del TAR, permitiendo elegir la mejor opción de tratamiento para cada sujeto.

En Panamá, para el año 2016 se utilizaba como método de secuenciación la metodología de Sanger, la cual es considerada como referencia o estándar de oro para el genotipaje de VIH la cual detecta variantes virales en porcentajes del 15-20% de la población viral. Sin embargo, actualmente se utiliza la técnica de Secuenciación de próxima Generación (NGS Illumina), metodología altamente eficaz y sensible que permite identificar variantes virológicas presentes en

porcentajes ≤ 1 de la población viral en la muestra analizada. En el ICGES, la determinación de resistencia de VIH-1 se realiza en sujetos con diagnóstico reciente que no han tomado tratamiento antirretroviral (naïve), sujetos con falla virológica, recién nacidos con proviral positivo y embarazadas; con carga viral mayor a 1000 copias/ml en todos los casos antes mencionados.

1.7 Secuenciación de próxima generación (NGS) Illumina

La tecnología de secuenciación de próxima Generación o NGS (Next Generation Sequencing, por sus siglas en inglés) es una herramienta de última generación, diseñada para la identificación de genes de ADN/ARN la cual permite detectar e identificar las variantes virológicas presentes hasta el 1% de la población viral estudiada. (52, 53, 54)

La técnica de NGS se basa en la secuenciación por síntesis con el uso de dideoxinucléotidos marcados con fluorescencia, adaptadores y una celda de flujo que funciona como una plataforma para el desarrollo de las reacciones llevadas a cabo dentro del equipo (Figura 3).

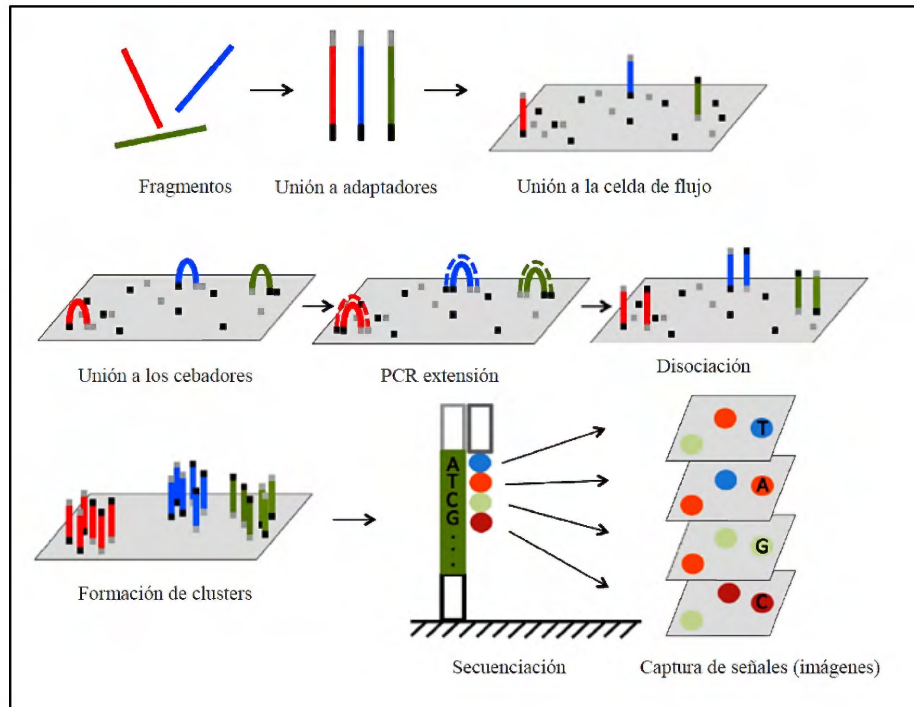


Figura 3. Representación esquemática de la secuenciación por síntesis. Inicialmente, los fragmentos de la librería se unen a adaptadores, los cuales a su vez se unen a adaptadores presentes en la celda de flujo. De esta forma, cada fragmento queda inmobilizado en la superficie. Luego, se produce una reacción de amplificación por síntesis hasta formar grupos de fragmentos idénticos. Finalmente se obtienen las secuencias generadas en la reacción mediante imágenes que capturan cada adición de los nucleótidos reversibles marcados con un fluoróforo ⁵⁵.

Una cámara altamente sensible, detecta la fluorescencia emitida durante las reacciones y documenta la adición de cada base durante el proceso, que luego puede ser observada mediante fotografías ⁵⁶.

Esta metodología ofrece ventajas como: menor cantidad y concentración requerida de la muestra a analizar (1 ng), ofrece mayor información genómica, secuenciación

de diversos organismos al mismo tiempo, alta sensibilidad, eficacia y capacidad para detectar alelos de baja frecuencia ⁵⁷.

El flujo de la secuenciación por NGS requiere una serie de procesos, iniciando desde la obtención del ADN blanco a secuenciar. El ARN es extraído de la muestra blanco para ser posteriormente amplificado y el fragmento es confirmado mediante electroforesis en gel. Una vez purificado el producto de ADN, el primer paso para inicial la preparación de librerías es la cuantificación de los productos a secuenciar (Figura 4).

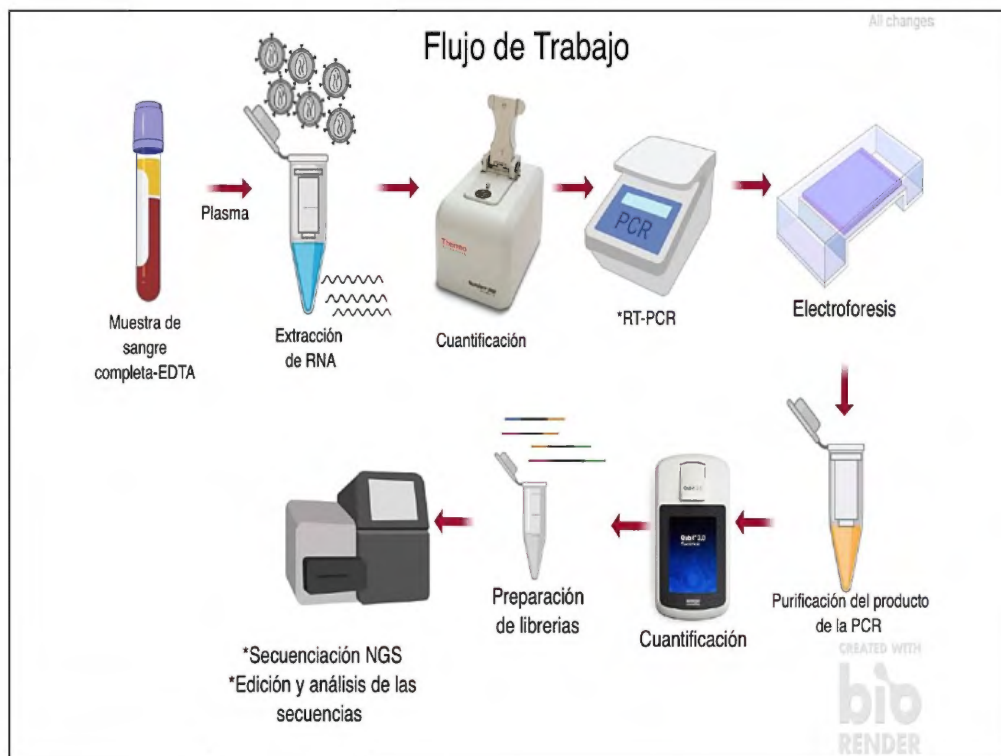


Figura 4. Flujo de Trabajo de Illumina NGS. Representación del proceso necesario para realizar la secuenciación de próxima generación, iniciando con la muestra base hasta obtener el análisis final mediante métodos bioinformáticos. Imagen cortesía: Mgter. Oris Chavarría ICGES.

La preparación de librerías incluye los siguientes procesos:

1. Tagmentación del ADN (amplicones o producto de PCR): La tagmentación es un proceso en el cual el ADN blanco es fragmentado y marcado con secuencias o adaptadores específicos. Las enzimas de restricción son las encargadas de cortar el ADN y generar fragmentos de tamaños pequeños al unirse a su sitio de reconocimiento. Estas enzimas crean roturas bicatenarias con extremos romos o colgantes en los cuales posteriormente se unirán los adaptadores.

El proceso de tagmentación ocurre por la acción de una molécula llamada Transposoma, metodología basada en el uso de perlas cubiertas con secuencias de adaptadores a los que se unen los fragmentos del ADN de un tamaño específico (350pb aproximadamente), lo que ofrece un proceso simultáneo de normalización, ligación de los adaptadores y selección de fragmentos para obtener lecturas óptimas en la secuenciación. Este proceso reduce el número de pasos en el flujo de trabajo y requiere baja concentración de ADN de la muestra a secuenciar, reduciendo así el tiempo de trabajo en la preparación ⁵⁸.

2. Amplificación de los fragmentos de PCR y unión a cebadores/adaptadores (Index): en este proceso se utiliza una enzima especializada para unir los Adaptadores 1 (i7) y Adaptadores 2 (i5) en ambos extremos de los fragmentos de ADN obtenidos. En los extremos romos de cada hebra se agrega una base 'A' para posteriormente ligarlo a los adaptadores de secuenciación. Cada adaptador de secuenciación contiene una base en 'T', que proporciona el complemento para ligar el adaptador al ADN fragmentado con una cola de 'A'.

3. Purificación de la librería: se utilizan perlas magnéticas que seleccionan el tamaño adecuado de los fragmentos de ADN. Esta selección dependerá de la proporción de perlas: muestra utilizada. El uso de etanol al 80% en esta etapa ayuda a eliminar los residuos de las reacciones de amplificación previas.

4. Normalización de la librería: Este proceso equilibra la cantidad de concentración de cada amplicon de la biblioteca, lo que permite garantizar una representación equitativa de cada muestra presente en la librería preparada para una formación óptima de grupos de secuencias y datos de calidad de cada muestra.

5. Preparación de control PhiX: La biblioteca PhiX Control se deriva del genoma de un bacteriófago pequeño (10 nM en 10 μ l) que tiene un tamaño aproximado de 500 pb y consta de una composición de base equilibrada a ~ 45% de GC y ~ 55% de AT. Debido a su composición equilibrada de nucleótidos, la biblioteca PhiX Control también funciona como control de secuenciación para conocer la calidad del experimento realizado. Para bibliotecas de baja diversidad, la biblioteca PhiX Control proporciona señales fluorescentes balanceadas en cada ciclo para mejorar la calidad de ejecución generada ⁵⁹.

Importancia del estudio de mutaciones minoritarias del VIH

Las resistencias primarias o secundarias del VIH-1 afectan negativamente la efectividad del tratamiento en el individuo, causando a largo plazo falla virológica, transmisión de mutaciones asociadas a resistencias y dificultades para alcanzar la supresión viral ⁴⁴.

La exposición a los fármacos antirretrovirales induce la presión selectiva en el virus presente en el individuo, lo que genera cambios y mutaciones en el virus que causan resistencias frente a los medicamentos antirretrovirales. Sin embargo, en ausencia de la terapia antirretroviral la población viral que presenta resistencia al tratamiento, son reemplazadas por la “cepa salvaje” del virus que por lo general presenta mayor capacidad de replicación, disminuyendo la capacidad de detectar estas variantes virales de menor porcentaje por metodologías de secuenciación de baja sensibilidad.

La OMS recomienda realizar estudios de resistencia a los antirretrovirales en sujetos con diagnóstico reciente de VIH-1 previo al inicio de la TAR con el fin de determinar la presencia o no de mutaciones asociadas a resistencia y ofrecer al sujeto el tratamiento más adecuado según su condición. Sin embargo, en países en desarrollo se utilizan métodos de secuenciación de Sanger que permiten detectar del 15-20% de las variantes del virus circulante en sangre. Sin embargo, las variantes minoritarias o también conocidas como variantes de baja frecuencia, no pueden ser detectadas mediante esta metodología ⁶⁰.

Esta limitación incrementa la importancia de la utilización de métodos que presentan mayor sensibilidad y capacidad de detección variantes minoritarias asociadas a resistencias las cuales a largo plazo podrían ser las causantes de fallo virológico ⁶¹.

Estudios previos sugieren que sujetos que no presentaban mutaciones asociadas a resistencias en su diagnóstico inicial con el método de Sanger pero que luego fueron analizadas con métodos más sensibles obteniendo mutaciones asociadas a resistencia en bajos porcentajes; presentaban más del doble de riesgo de desarrollar falla virológica después de iniciar el tratamiento ⁶². Estos estudios indican que las mutaciones minoritarias mayormente encontradas, afectan la efectividad de los inhibidores no nucleosídicos de la transcriptasa inversa (INNTI) los cuales son utilizados como primera línea de tratamiento a nivel mundial en pacientes recién diagnosticados ^(63, 64).

Factores asociados a falla terapéutica

La falla terapéutica en un individuo ocurre como consecuencia de un fallo virológico, condición que se define como carga viral > 1000 copias/ml luego de 6 meses de haber iniciado TAR, sin embargo, esta definición puede variar según los criterios establecidos por las instituciones de salud de cada país ³⁰.

Factores como la resistencia primaria, acceso a TAR previa, falta de adherencia al tratamiento y presencia de mutaciones minoritarias, podrían estar relacionados al desarrollo de falla virológica en PPVVS ^(65, 66). La detección temprana de estas

mutaciones minoritarias o de baja frecuencia, permite ofrecer un tratamiento dirigido con mayor eficacia y control en cada sujeto. Sin embargo, en países en desarrollo esta estrategia presenta dificultades para ser ejecutada en el sistema de salud.

La adherencia al tratamiento en PPVVS puede afectarse por diversos factores como; detección tardía, estigma, discriminación, olvidar la toma del medicamento, toma de múltiples píldoras, dificultad de acceso a instalaciones de salud, efectos adversos del medicamento, factores psicosociales, limitaciones económicas, el desabastecimiento de la terapia antirretroviral en las instalaciones de salud, influyendo negativamente en la efectividad del tratamiento ^(67,68,69,70).

Un meta análisis realizado en el año 2018, el cual comparó 53 estudios, 22,603 participantes y 25 países, determinó que la adherencia en Latinoamérica era alrededor del 70% de la población estudiada. Esto indica que el 30% de las PPVVS no lograban alcanzar la supresión viral, incrementando el riesgo de transmisión de mutaciones asociadas a resistencia ⁷¹.

Por otro parte, si los esquemas de TAR no se administran de manera efectiva las mutaciones asociadas a resistencia podría extenderse en el organismo, lo que tendría como resultado un aumento en el riesgo de desarrollar fallo virológico, falla terapéutica, la transmisión de virus resistentes a los medicamentos, disminución de las opciones terapéuticas, disminución de la efectividad del programa de tratamiento y disminución de la supervivencia del individuo infectado con el virus ⁷².

Capítulo II

Metodología

2.1. Consideraciones éticas del estudio

Las muestras utilizadas en este estudio forman parte del proyecto FID14-033 realizado en el año 2016 el cual incluye la evaluación de estudios como: conteo de linfocitos T CD4, carga viral y genotipaje de VIH-1; y cuenta con el consentimiento informado de cada paciente y el aval del Comité de Bioética del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud (ICGES) N°1044/CBI/ICGES/2015. La información facilitada por el participante guarda estricta confidencialidad y fue utilizada solamente para propósitos de vigilancia en salud.

Las muestras fueron anonimizadas y se evaluaron los resultados de las pruebas subsiguientes trabajando únicamente con el número de identificación de laboratorio.

2.2. Tipo de estudio

En el presente estudio de cohorte retrospectivo se identificaron y clasificaron variantes virales como causantes de fallo virológico en pacientes naïve reportados como sensibles al tratamiento en su diagnóstico inicial del año 2016 al 2017. Se utilizaron los datos del proyecto FID14-033, el cual ya contaba con la aprobación del Comité de Bioética del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud (ICGES).

Luego del análisis de los datos de sus resultados durante al menos de 12 meses de seguimiento, aquellos individuos que no lograron supresión viral fueron considerados para la búsqueda de variantes virológicas mediante secuenciación de

próxima generación NGS-Illumina. Se utilizó la alícuota de plasma con EDTA de la muestra inicial que se encontraba almacenada en el ICGES para la búsqueda de mutaciones asociadas a resistencia en baja frecuencia que no fueron detectadas en el genotipaje inicial en los participantes del estudio.

2.3 Ámbito del estudio

2.3.1 Universo

Nuestra población de estudio fue representada por todos los sujetos mayores de 18 años VIH positivos diagnosticados en el año 2016 que participaron en el proyecto realizado en el Instituto Conmemorativo Gorgas de estudio de la Salud, titulado: “Hepatitis virales que co-infectan a sujetos VIH positivos en Panamá, evaluación de la variabilidad del VHB, VHC y de la genética del sujeto infectado” FID14-033 y presentaron sensibilidad a los medicamentos antirretrovirales en su prueba de genotipaje inicial.

2.3.2 Población de estudio

La población de estudio está conformada por pacientes VIH positivos que en su prueba de Genotipaje de VIH inicial, presentaron sensibilidad a los tratamientos antirretrovirales y presentan una carga mayor a 1000 copias/mL en su muestra inicial.

2.3.3 Muestreo

Se seleccionaron 92 muestras de sujetos naïve atendidos durante el año 2016-2017 en el Instituto Conmemorativo Gorgas, reportados inicialmente como sensibles al tratamiento antirretroviral que no lograron supresión viral luego de 12 meses de seguimiento mediante muestreo aleatorio utilizando el programa Win Epi.

Cálculo de tamaño de muestra:

La población total del estudio FID14-033 fue de 735 sujetos, en base a una prevalencia de resistencia observada en Panamá del 15.6% con un nivel de confianza de 95% y un intervalo de confianza del 5%, estimando una prevalencia de 15% de sujetos que no alcancen supresión viral, se calculó un tamaño de muestra de 195 sujetos.

2.3.4 Sujetos de Estudio

Pacientes VIH positivos con diagnóstico reciente que formaron parte del proyecto FID14-033 realizado en el periodo 2016-2018 en el ICGES.

2.3.5 Criterios de inclusión

- Participantes del proyecto FID14-033, mayores de 18 años que presentaron sensibilidad a los esquemas de tratamiento empleados en Panamá en su prueba de resistencia inicial a los medicamentos y continúan sus pruebas de monitoreo rutinaria en el Instituto Conmemorativo Gorgas.
- Firma del consentimiento informado.

2.3.6 Criterios de Exclusión

- Edad menor a 18 años
- Pacientes que no participaron del estudio FID14-033.
- Participantes del proyecto FID14-033 que presentaron resistencia a los medicamentos antirretrovirales en su prueba de genotipaje de VIH inicial.

2.3.7 Criterios de Eliminación

- Muestras de pacientes que no amplifiquen el tamaño esperado en los protocolos utilizados.
- Pacientes que soliciten voluntariamente ser retirados del estudio.

Selección de muestras a evaluar y creación de tablas de datos

Se evaluó la base de datos del proyecto FID14-033 y se seleccionaron las muestras de aquellos sujetos naïve, con resultado sensible en la prueba de genotipaje realizada con la metodología de Sanger y que de acuerdo a su carga viral, no lograron supresión viral luego de 12 meses de seguimiento. En la Figura 5 se detalla el flujo de trabajo utilizado en este estudio.

Búsqueda y organización de muestras analizadas

Se creó una lista con el número único de identificación (GP) de las muestras a evaluar para realizar la búsqueda organizada en los congeladores del departamento de Genómica y Proteómica. Una vez colectadas, se evaluó la integridad y el volumen de plasma con EDTA de cada muestra. Las muestras no encontradas

fueron eliminadas del estudio y aquellas con volúmenes menores a 500µl fueron colocadas en la última lista de extracción y categorizadas como “extracción difícil”. Por último, todas las muestras identificadas con el número de GP fueron ordenadas en cajas correctamente rotuladas y almacenadas a -80°C hasta su uso.

Extracción de ARN

La extracción manual del ARN viral se realizó con el kit comercial de QIAmp viral RNA kit a partir de muestras de plasma con EDTA de pacientes VIH positivos. Las muestras fueron seleccionadas y verificadas de acuerdo a las listas de extracción, las muestras fueron descongeladas en hielo dentro de una hielera para preservar la integridad del ARN, evitando cambios bruscos de temperatura.

Una vez descongeladas, aquellas muestras con volumen suficiente se utilizaron 500µl para la extracción de ARN. Sin embargo, algunas muestras no presentaron el volumen requerido por el fabricante por lo que se utilizó el volumen disponible en los tubos de almacenamiento. Los volúmenes de las muestras que no cumplían el criterio necesario contenían entre 150-450 µl. Se utilizó etanol grado molecular para la preparación de reactivos y en la precipitación del ARN. Los procedimientos se realizaron de acuerdo a las instrucciones brindadas por el fabricante ⁷³.

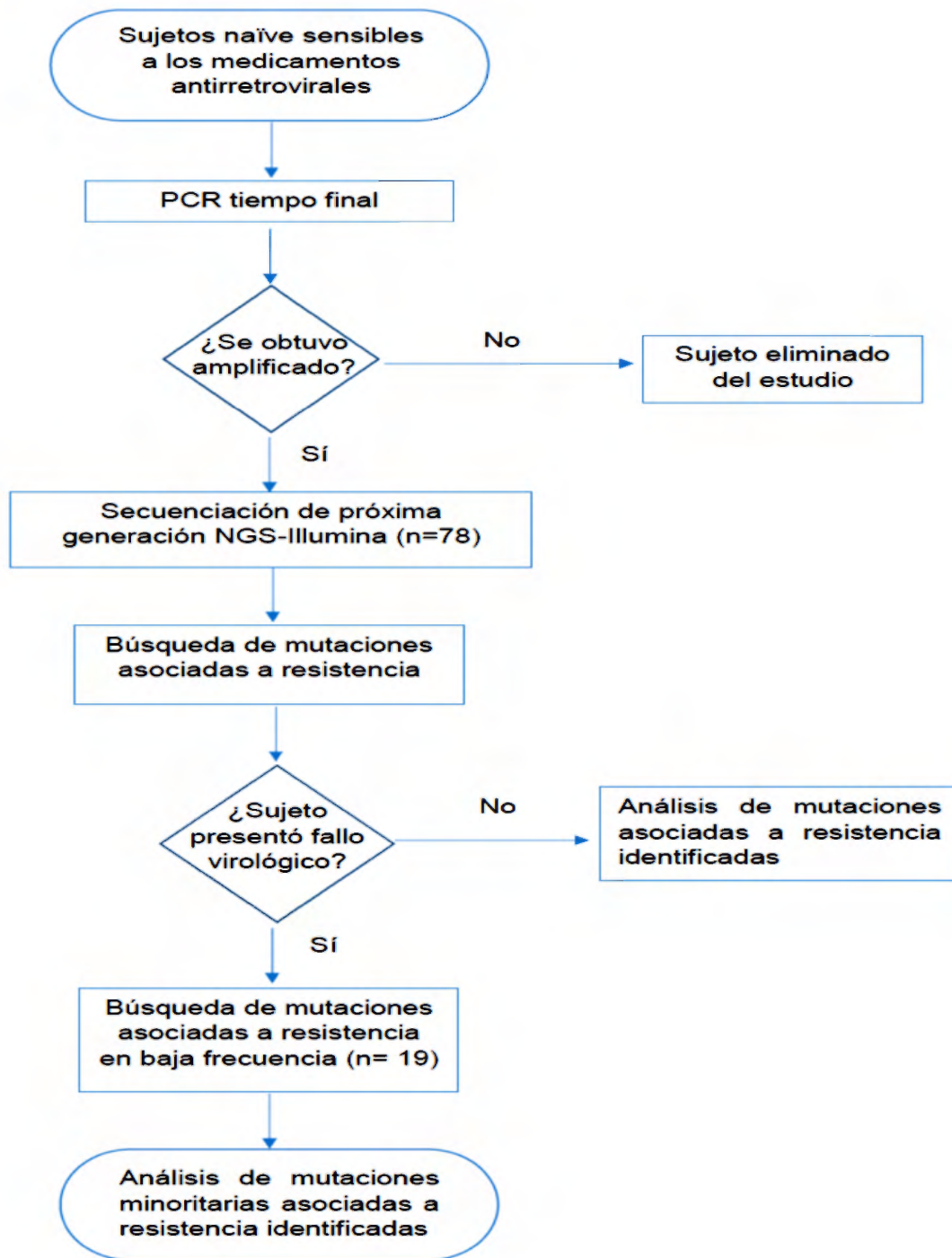


Figura 5. Flujo de trabajo utilizado para la búsqueda de mutaciones en baja frecuencia identificadas en este estudio.

Amplificación de ARN viral

En este protocolo, se utilizaron 2 metodologías de PCR tiempo final, una para la amplificación del fragmento parcial y otra para el fragmento completo del gen pol del VIH.

- **Amplificación del fragmento parcial del gen pol del VIH**

Para la amplificación del fragmento parcial (que incluye proteasa y transcriptasa inversa) se utilizó una metodología casera la cual fue previamente estandarizada en el Departamento de Genómica y Proteómica del Instituto Conmemorativo Gorgas de estudios de la Salud. Esta amplificación se compone de 3 pasos: una reacción de transcripción inversa y dos reacciones en cadena de polimerasa de tiempo final. Esta amplificación de tiempo final abarca la proteasa desde el codón 1 al 99 y la transcriptasa inversa del codón 1 al 260.

La transcripción reversa del ARN se realizó utilizando una mezcla inicial para la desnaturalización compuesta por agua grado molecular, deoxiribonucleótido trifosfato (dNTPs) a 10nM y el primer Reverse 3798. Seguido, se añadieron 8 µl de ARN de cada muestra y se incubaron por 5 minutos en el termociclador a 65°C para la desnaturalización y separación de las hebras. Finalizados los 5 minutos, se realizó una pausa manual o programada en el termociclador para añadir la mezcla de amplificación para la transcripción reversa compuesta de 1 µl de agua grado molecular, 0.5 µl de la enzima Super Script IV RT, 4 µl de tampón Super Script IV, 1 µl de ditiotreitól (DTT) y 1 µl de inhibidor de las Rnasas.

Para la primera y segunda amplificación del ADN complementario, se utilizó 35 μl de agua grado molecular, 0.2 μl de la enzima Platinum Taq High Fidelity (Taq HiFi), 5 μl de tampón 10X PCR, 1.8 μl de MgSO_4 a 50nM, 1 μl de dNTPs 10nM. Los cebadores utilizados para la primera PCR: Forward JA269 y reverse JA272 y para la segunda amplificación cebador Forward JA270 y cebador Reverse JA271, todos a concentración de 10 μM y un volumen de a 1 μl cada uno (Ver Tabla 1 para mayores detalles referente a los cebadores utilizados). Se añadieron 5 μl de ADN complementario en cada reacción de amplificación, obteniendo un volumen final de 50 μl .

El ciclaje utilizado para la transcripción reversa inició con una desnaturalización a 65°C por 5 minutos, la transcripción reversa se realizó a 50°C por 60 minutos, 85°C por 5 minutos y finaliza a 4°C preservación. La primera amplificación inició con la desnaturalización a 94°C por 2 minutos, 30 ciclos con 3 temperaturas de 94°C por 20 segundos, hibridación de cebadores a 50°C por 20 segundos y la elongación a 72°C por 1 minuto 30 segundos. Finalmente, 5 minutos más de elongación a 72°C y almacenamiento a 4°C.

El ciclaje utilizado para la segunda amplificación fue casi idéntico a la primera con la única diferencia en el número de ciclos para la hibridación y elongación, donde se utilizaron 40 ciclos.

Tabla 1. Cebadores utilizados para la amplificación de productos del fragmento parcial del VIH.

Cebadores	Gen blanco	Secuencia	Posición	Longitud del amplicon	Referencia
Transcripción inversa (RT)					
3798 (R)	Pol	5'CAAACCTCCCACTC AGGAATCCA3'	3780-3801		(Murillo et al., 2010)
PCR 1					
269 (F)	Pol	5'AGGAAGGACACCA RATGAARGA3'	2043-2064	1323 pb	(Murillo et al., 2010)
272 (R)	Pol	5'GGATAAATCTGAC TTGCCART3'	3345-3366		
PCR 2					
270 (F)	Pol	5'GCTTCCCTCARAT CACTCTT3'	2249-2268	1086 pb	(Murillo et al., 2010)
271 (R)	Pol	5'CCACTAAYTTCTGT ATRTCATTGAC3'	3311-3335		

- **Amplificación del fragmento completo del gen pol del VIH**

La metodología utilizada para la amplificación del fragmento completo del gen pol del VIH, que incluye la proteasa, transcriptasa inversa e integrasa, fue descrita previamente y adaptada para este estudio ⁷⁴. En esta metodología, los autores detallaron el uso de la enzima Super Script IV RT en conjunto con la enzima ezDnasa, la cual tiene como objetivo la eliminación de restos de ADN provenientes del paso previo de extracción de ADN a partir de plasma. Sin embargo, en este protocolo no se utilizó este último complemento.

En el proceso inicial de transcripción reversa del ARN se utilizaron 10 µl de ARN y se desnaturalizaron a 65°C durante 5 minutos, luego se realizó una pausa manual o programada y se colocó el plato de 96 pocillos en un bloque frío. Posteriormente, se agregó la mezcla para la transcripción reversa compuesta de 4.5 µl de agua grado molecular, 2 µl de deoxiribonucleótido trifosfato (dNTPs) a 10nM, 1 µl de inhibidor de las Rnasas, 0.5 µl de la enzima Super Script IV RT, 4 µl de tampón Super Script IV y 2 µl del cebador reverse 5575 a una concentración de 20pmol.

Para la amplificación del ADN complementario, para cada muestra se utilizó 35 µl de agua grado molecular, 0.2µl de la enzima Platinum Taq High Fidelity (Taq HiFi) en lugar de la enzima Platinum Hot Start PCR descrita por los autores, 5 µl de tampón 10X PCR, 1.8 µl de MgSO₄ a 50nM, 1 µl de dNTPs 10nM. Los cebadores utilizados para la primera PCR: Forward 1810 y reverse 5575 y para la amplificación

anidada se utilizó el cebador Forward 2006 y cebador Reverse 5264, todos a concentración de 20pmol y un volumen de 2 µl para cada uno, obteniendo un volumen total de 50 µl. (Ver Tabla 2 para mayores detalles referente a los cebadores utilizados).

El ciclaje utilizado para la transcripción inversa y primera PCR inició con una desnaturalización a 65°C por 5 minutos, la transcripción reversa se realizó a 50°C por 10 minutos, seguido de la amplificación inicial de 10 ciclos a 98° C por 10 segundos, ciclaje en gradiente de 62-52°C por 10 segundos y elongación a 72°C por 2 minutos. La amplificación final con la desnaturalización a 94°C por 2 minutos, 30 ciclos con 3 temperaturas de 98°C por 10 segundos, hibridación de cebadores a 52°C por 10 segundos y la elongación a 72°C por 2 minutos. Finalmente, 5 minutos más de elongación a 72°C y almacenamiento a 4°C.

Para la segunda PCR anidada con gradiente de temperatura se inició la desnaturalización a 94°C por 2 minutos, amplificación inicial de 10 ciclos a 94° C por 30 segundos, ciclaje en gradiente de 63-53°C por 30 segundos y elongación a 72°C por 3:30 minutos. La amplificación final con la desnaturalización a 94°C por 2 minutos, 30 ciclos con 3 temperaturas de 94°C por 30 segundos, hibridación de cebadores a 53°C por 30 segundos y la elongación a 72°C por 3:30 minutos. Finalmente, 5 minutos más de elongación a 72°C y almacenamiento a 4°C.

Tabla 2. Cebadores para amplificación fragmento completo del VIH: transcriptasa inversa, proteasa e integrasa.

Cebadores	Gen blanco	Secuencia	Posición	Longitud del amplicon	Referencia
RT PCR					
1810 (F)	Pol	5'GCTACAYTAGAAGAA ATGATGACAGCATG3'	1810-1838	3766	Chrysostomou y otros. 2020
5575 (R)	Pol	5'TCTGGGGCTTCCATC TATC3'	5554-5575		
PCR					
2006 (F)	Pol	5'GGGCCCTAGGAAA AAGGG3'	2006-2024	3259	Chrysostomou y otros. 2020
5264 (R)	Pol	5'CCTGTATGCAGACC CCAATATGTT3'	5241-5264		

Electroforesis en gel y verificación de productos amplificados

Una vez obtenidos los amplificados del VIH ya sea por fragmento parcial o completo, estos productos fueron verificados mediante electroforesis en gel de agarosa. El gel fue preparado con 0.5 gramos de agarosa ultrapura Promega y 50mL de tampón

TBE Biorad preparado al 0.5. Se utilizó Gel Red como colorante fluorescente para ácidos nucleicos y escalera de peso molecular de 1 kb para verificar productos de fragmento completo y de 100pb para el fragmento parcial, ambas Promega.

Se mezclaron 5 µl de productos amplificados de cada muestra con 3 µl de colorante de carga o migración (Loading Dye) 6X Invitrogen. Se sirvieron 8 µl de la mezcla de cada muestra y colorante de carga en el gel de agarosa y se inició la migración de productos a 90 voltios por 1 hora.

Los fragmentos esperados de aproximadamente 400 pb para el fragmento parcial (transcriptasa inversa y proteasa) y de 3259 pb para el fragmento completo (transcriptasa inversa, proteasa e integrasa), fueron confirmados mediante el equipo UV Gel doc it.

Purificación de productos de PCR

Se utilizó el kit comercial Qiaquick PCR Purification para la eliminación de contaminantes que pueden interferir en el procesamiento de las muestras como cebadores, dNTPs y sales presentes en el producto amplificado. Este proceso garantiza la obtención de productos amplificados de PCR de alta calidad para su posterior secuenciación.

La preparación de los reactivos se realizó como lo detalla el fabricante.

Se utilizaron tubos de 1.5ml para combinar 45 µl del producto amplificado con 225 µl de tampón PBI el cual actúa uniendo el ADN de doble cadena a la membrana de

sílice presente en la columna de purificación, incrementando las concentraciones de sales caotrópicas y mediante cambios de pH (pH ácido). Las muestras fueron mezcladas mediante vórtex y se verificó que el color de la mezcla presentara un color amarillo-naranja, lo que indica que el pH se mantenía en niveles óptimos ≤ 7.5 lo que garantiza una adsorción del ADN a la membrana de sílice en aproximadamente 95% ⁷⁵. Seguido, fueron centrifugadas a 13200 rpm por 1 minuto, se colocó un nuevo tubo colector y se sirvieron 750 μ l de tampón de lavado (PE) que contiene también etanol grado molecular, eliminando todos los contaminantes y excedentes presentes en el purificado. Se centrifugaron los tubos a 13200 rpm por un minuto, se colocó un nuevo tubo colector y se centrifugaron a la misma velocidad por 1 minuto extra para eliminar los restos de etanol presentes en la columna.

Para eluir, se utilizaron 50 μ l de agua grado molecular en cada muestra que presentó una banda gruesa y con alta fluorescencia en el gel. Aquellas muestras con bandas débiles fueron eluidas en 30 μ l de agua grado molecular. Se centrifugaron los tubos a 13200 rpm por un minuto, el eluido final fue almacenado en tubos de 1.5 ml y congelados a -80°C .

Preparación de librerías para Mi Seq Illumina

El término “librería” se refiere a la preparación del ADN o ADNc requerida para obtener una mezcla final en concentraciones óptimas con los amplificadores fragmentados e identificados para realizar la secuenciación en el equipo. En este

proceso, el ADN es fragmentado en secuencias de 350pb aproximadamente mediante métodos enzimáticos y estos fragmentos son marcados con adaptadores ligados a 5' y 3' mediante el proceso de tagmentación (Figura 5A).

La preparación de librerías fue realizada siguiendo los procesos a continuación:

1. Cuantificación de productos purificados:

Los amplificadores purificados en los cuales se observó una banda gruesa y con alta fluorescencia en el gel de agarosa, fueron diluidos 1/10 utilizando 90 µl de agua y 10 µl del amplificado, obteniendo un volumen final de 100 µl de ADN diluido.

Para la cuantificación inicial de los purificados se utilizó el fluorómetro Qubit con el dsDNA HS Assay de Invitrogen como se describe a continuación:

- a. Se rotularon los tubos de Qubit necesarios para la cantidad de muestras a cuantificar.
- b. Se preparó la solución de trabajo para el total de muestras a procesar, mezclando 199 µl del Tampón dsDNA HS y 1 µl de HS Reagent 200X por cada muestra en un tubo cónico de 50 ml. Una vez preparada la solución de trabajo, se sirvieron 198 µl en cada tubo de Qubit correspondiente a cada muestra.
- c. Se prepararon 2 estándares de lectura indicados por el fabricante, agregando 190 µl de solución de trabajo a cada tubo y 10 µl de Qubit dsDNA HS Standard #1 y #2 respectivamente.

d. Se añadieron 10 μ l de cada amplificado purificado a su tubo Qubit correspondiente, se mezclaron bien utilizando el vórtex y se incubaron en la oscuridad por 2 minutos. Los controles o estándares fueron procesados al mismo tiempo que las muestras.

e. Los estándares fueron medidos en el Qubit, seguido de las muestras y los valores obtenidos fueron tabulados en una tabla.

Una vez cuantificados todos los amplificados purificados a procesar, fueron diluidos con agua nanopura y llevados a una concentración de 0.2 ng/ μ l. Se sirvieron 30 μ l de cada producto amplificado diluido en un plato de 96 pocillos para optimizar el flujo de trabajo mediante el uso de pipetas multicanal.

2. Tagmentación del producto amplificado y purificado

Se utilizó un nuevo plato de 96 pocillos para servir 10 ng/ μ l del tampón de tagmentación de ADN (TDB, "Tagment DNA Buffer"), se agregaron 5 μ l de cada amplicon purificado y diluido previamente a 0.2 ng/ μ l y luego se añadieron 5 μ l de la mezcla de etiquetado de amplicon (ATM, "Amplicon tagment Mix) y fueron mezcladas con la pipeta multicanal. Se selló el plato con cobertor plástico "Microseal B adhesivo" y se centrifugó a 1000 rpm por 1 minuto para eliminar las gotas en las paredes del pocillo o exceso burbujas en la superficie. Con el volumen final de reacción de 20 μ l, se colocó el plato de 96 pocillos en el termociclador a 55°C por 5 minutos, seguido de una temperatura de almacenaje de 10°C. Una vez el termociclador alcanzó los 10°C, el plato de 96 pocillos fue removido del

termociclador para agregar inmediatamente el tampón de neutralización para detener la acción de la enzima.

Se agregaron 5 μ l por cada pocillo de tampón de neutralización (NTB, “Neutralize Tagment Buffer”) mezclando en cada muestra con la multicanal, se selló el plato con sello adhesivo y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. El volumen final obtenido fue de 25 μ l.

3. Ligación de índices-adaptadores

Luego de la tagmentación, es necesario etiquetar los extremos de cada muestra para lograr una identificación única correspondiente a cada muestra y lograr secuenciar varias muestras a la vez, permitiendo que el secuenciador identifique cada muestra individualmente. Mediante un proceso de amplificación, estos cebadores P5 (Forward) y P7 (Reverse), son adheridos a los extremos de cada muestra y estos son complementarios a los cebadores presentes en la celda de flujo donde ocurrirá la reacción de secuenciación por síntesis.

Siguiendo la programación establecida para las 96 muestras se seleccionaron los índices a utilizar, intercalando los índices del set A y B entre cada corrida.

Los índices fueron ordenados de menor a mayor siguiendo y se añadieron 5 μ l de cada uno por muestra, obteniendo una combinación única de 2 índices por cada muestra. Se agregaron 15 μ l de PCR master mix de Nextera (NPM) mezclando en

cada pocillo obteniendo un volumen final de 50 μ l. Se selló el plato con el adhesivo plástico, se centrifugó a 1000 rpm por 1 minuto y se colocó en el termociclador con las siguientes condiciones: Inactivación de la enzima de tagmentación a 72°C por 3 minutos, desnaturalización y activación de enzima de ligación a 95°C por 30 segundos, 12 ciclos de 95°C por 10 segundos, 55 °C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos. La extensión final se realizó a 72°C por 5 minutos y por último, almacenamiento a 4°C.

4. Purificación de librería

Este proceso se basa en la utilización de perlas magnéticas AMPure XP, la cual se basa en una química estandarizada que acelera y simplifica la selección del tamaño del ácido nucleico requerido mediante el uso de perlas para la preparación de la biblioteca de fragmentos para la secuenciación de próxima generación ⁷⁶. En este paso, mediante el uso de perlas magnéticas, los fragmentos con tamaño aproximado de 400 pb son seleccionados y el resto son eliminados de la librería.

Las perlas magnéticas fueron atemperadas 30 minutos antes de iniciar el proceso y mezcladas mediante vórtex. En un plato MIDI de 96 pocillos, se agregaron los 50 μ l del producto final de ligación previo y se añadieron 30 μ l de perlas con una pipeta multicanal. El plato MIDI fue sellado con el adhesivo plástico y se colocó en el agitador de platos a 1800 rpm por 2 minutos. Se realizó una incubación a temperatura ambiente durante 5 minutos. Luego, se colocó el plato MIDI sobre el

soporte magnético durante 2 minutos para obtener un botón de perlas en cada pocillo. Con el plato MIDI sobre el soporte, se descartó el sobrenadante de cada pocillo, teniendo el mayor cuidado al aspirar y no tocar el botón de perlas. Se utilizó etanol grado molecular al 80%, sirviendo 200 μ l en cada pocillo y luego de 30 segundos de incubación fue removido.

Se realizaron 2 lavados con etanol al 80%, siendo este último un paso importante en donde se removieron todos los restos de etanol presentes en los pocillos. El plato MIDI de 96 pocillos se dejó secar al aire durante 15 minutos sobre el soporte magnético para remover cualquier resto de etanol remanente. Luego, el plato MIDI de 96 pocillos fue removido del soporte magnético, se agregaron 52.5 μ l de tampón de resuspensión (RSB, "Resuspension buffer") mezclando y homogenizando la mezcla con la pipeta multicanal, se selló con el adhesivo plástico y se mezcló en el agitador magnético a 1800 rpm durante 2 minutos. Se incubó el plato MIDI de 96 pocillos a temperatura ambiente durante 2 minutos y luego fue colocado el soporte magnético durante 2 minutos para la formación del botón de perlas. Por último, con una pipeta multicanal se transfirieron 45 μ l del sobrenadante a un nuevo plato de 96 pocillos y fue almacenado a 20°C para su posterior procesamiento.

5. Normalización de librería

Este proceso es requerido para obtener una librería en concentraciones óptimas y concentraciones iguales para cada muestra para garantizar una óptima formación

de grupos de secuencias o “clusters” y datos de alta calidad. La normalización puede realizarse de forma manual, diluyendo cada muestra de forma individual o mediante el uso de perlas magnéticas, siendo esta última la utilizada en este protocolo.

En un nuevo plato MIDI de 96 pocillos, se añadieron 20 μ l a cada pocillo de los amplicones purificados y marcados con los índices del proceso anterior. El restante presente en el plato de 96 pocillos, fue sellado y almacenado a -20°C en caso de ser requerido nuevamente.

En un tubo cónico de 15 ml se agregaron 44 μ l de LNA1 (Library Normalization Additives 1) por cada muestra y 8 μ l de perlas LNB1. Las perlas LNB1 (Library Normalization Beads 1) se mezclaron por vórtex por 1 minuto y se mezcló por inversión hasta lograr una solución homogénea. El tubo cónico de 15 ml fue mezclado por inversión y se sirvió en un reservorio para agregar 45 μ l de la mezcla LNA1/LNB1 a cada muestra, inclinando el reservorio entre cada pipeteo para mantener las perlas en una mezcla homogénea. Se selló el plato con adhesivo plástico y el plato MIDI se colocó en el agitador de platos a 1800 rpm por 30 minutos. Al finalizar, se colocó el plato MIDI en el soporte magnético por 2 minutos para que las perlas formaran el botón. Se descartó el sobrenadante de cada pocillo, se retiró del soporte magnético y se procedió a realizar 2 lavados con tampón LNW1 (Library Normalization wash 1) para eliminar restos contaminantes en la librería.

Se preparó NaOH a 0.1 N y se añadieron 30 µl a cada pocillo. El plato MIDI fue sellado con adhesivo plástico y colocado en el agitador magnético a 1800 rpm por 5 minutos. Luego, se colocó 2 minutos en el soporte magnético para formar el botón de perlas y se sirvieron 30 µl del sobrenadante en un nuevo plato de PCR de 96 pocillos, evitando servir algún restante de perlas. Finalmente, al plato de PCR se agregaron 30 µl de LNS1 (Library Normalization Storage Buffer) y se mezclaron con la pipeta multicanal, obteniendo un volumen final de 60 µl. Este producto de PCR normalizado fue almacenado a -20°C para su posterior secuenciación en el MiSeq.

Secuenciación de próxima generación (NGS)

La librería es cargada en una celda de flujo donde los fragmentos de ADN fragmentados y marcados, se unen a adaptadores complementarios presentes en la superficie de la celda. Mediante una reacción de amplificación por puente o de síntesis, los fragmentos son amplificados en grupos de secuencias clonales (Figura 5B). La longitud de onda emitida e intensidad son utilizadas para identificar cada base y este proceso se repite de forma cíclica “n” cantidad de tiempos para crear lecturas de “n” longitud de bases

La secuenciación por síntesis utiliza terminadores de cadena reversible la cual detecta la unión individual de bases nitrogenadas una vez son incorporadas a la hebra de ADN (Figura 5C). Las uniones de los 4 terminadores de cadena reversibles (A, G, T, C) ocurren durante cada ciclo de secuenciación, lo que permite que la

competencia natural disminuya el sesgo de incorporación y reduzca en gran medida la tasa de errores comparados con otras metodologías.

Luego de la reacción de secuenciación se generan miles de millones de lecturas y cada una contiene la secuencia de típicamente ~ 100 bases de longitud, de un solo clon del fragmento amplificado. Posteriormente, se realiza el análisis y generación de archivos dentro del equipo que generalmente implica el procesamiento de imágenes para generar las secuencias de bases correspondientes a cada fragmento, la conversión de archivos de secuencias a archivos legibles y la alineación de las secuencias obtenidas con la secuencia de ADN de referencia para la identificación de variantes presentes en la secuencia de interés.

En este protocolo se utilizaron cartuchos de 500 ciclos Nextera V2 para la secuenciación y se utilizó la plataforma MiSeq.

Análisis de datos

Las secuencias obtenidas fueron alineadas y comparadas con la secuencia de referencia para identificar cambios como mutaciones, polimorfismos, inserciones y deleciones en las mismas (Figura 5D). Los archivos Fastaq generados por el Miseq fueron cargados a la plataforma de Jupyter, plataforma que contaba con los paquetes necesarios para realizar los análisis con el programa estadístico R. En este programa, se generaron carpetas de acuerdo a cada corrida realizada en el equipo y se inició el análisis de datos con el algoritmo desarrollado para análisis de

resistencias asociadas a VIH. Mediante el programa R, fue posible analizar las mutaciones asociadas a resistencia presentes en cada muestra en porcentajes menores a 1% hasta 99%, los polimorfismos identificados, cobertura individual y general en cada corrida, el rango de nucleótidos secuenciados en cada muestra analizada, los archivos consenso de cada muestra y un consenso final correspondiente a las muestras analizadas simultáneamente.

Para la determinación de las mutaciones de interés presentes en cada muestra, el algoritmo utilizado en el programa R, utiliza los datos contenidos en la base de datos HyDRA, sitio web utilizado para el análisis de datos Fastaq para la determinación de resistencias contra los medicamentos del VIH provenientes de la Secuenciación de próxima generación en la plataforma MiSeq.

Los datos generales y demográficos como sexo, edad, residencia, orientación sexual, valores de cuantificación de Linfocitos T CD4+ y valores de carga viral fueron analizados mediante algoritmos desarrollados en el programa R con el cual se crearon tablas, gráficas de barra, gráficas de bigotes y herramientas visuales para el análisis de datos.

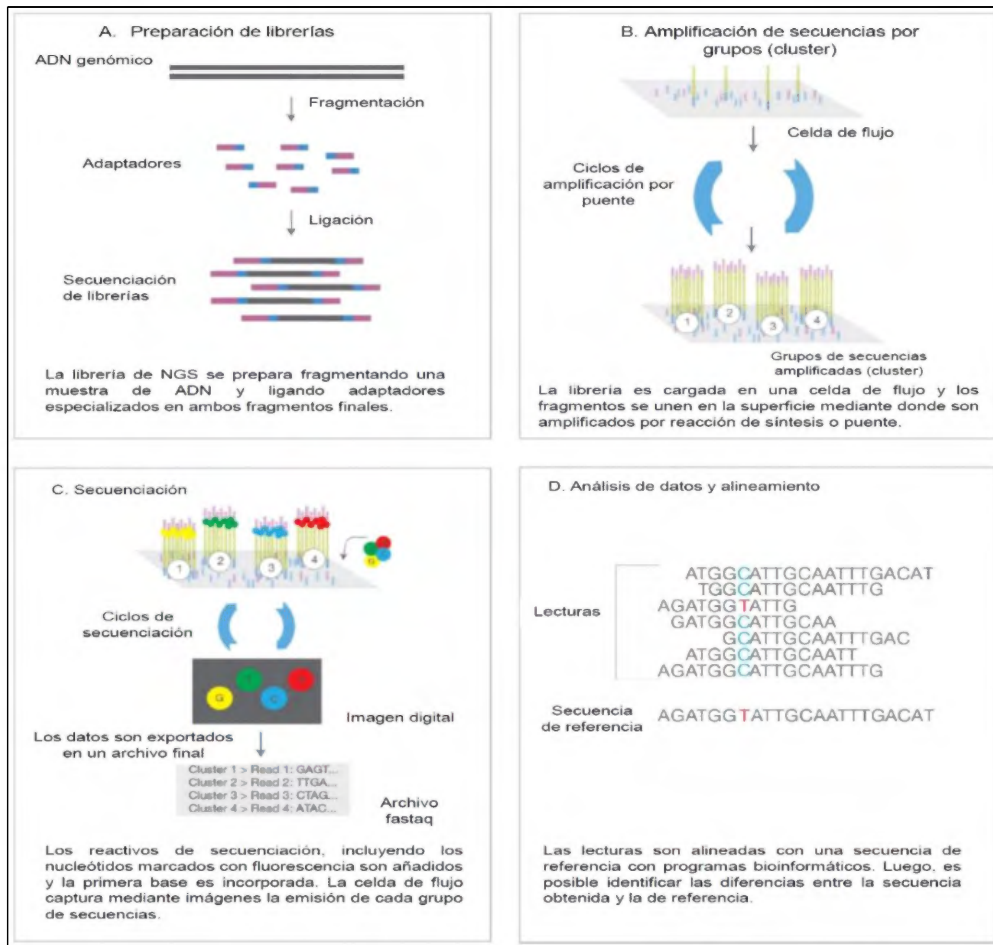


Figura 6. Esquema del flujo general de la secuenciación por NGS. La secuenciación por NGS comprende 4 pasos básicos: A) Preparación de librerías, B) Amplificación de secuencias por grupos (cluster), C) Secuenciación y D) Análisis de datos y alineamiento. ⁷⁷

2.4 Materiales y Métodos

Tabla 3. Materiales para extracción de ARN viral a partir de plasma con EDTA

Reactivos	Materiales	Equipos
<ul style="list-style-type: none"> • Control Positivo • Control Negativo • Carrier RNA • Buffer AVL • Etanol absoluto (100%) • Buffer AW1 • Buffer AW2 • Buffer AVE • Agua grado molecular libre de nucleasas 	<ul style="list-style-type: none"> • Bolsas de bioseguridad rojas • Piloto punta fina • Microtubos cónicos de 1.5 ml con tapa a presión “snap cap”) • Microtubos cónicos de 1.5 ml con tapa de rosca. • Gradilla para tubos cónicos de 1.5ml • Puntas de micropipetas de 100-1000 µl, 10-100µl, 0.5-10µl. • Tubos colectores de 2.0ml 	<ul style="list-style-type: none"> • Cabina de bioseguridad nivel 2 (CBS II) • Centrífuga refrigerada • Vórtex • Cronómetro • Nanodrop • Micropipetas de , 0.5-10µl, 100-1000 µl, 10-100µl

	<ul style="list-style-type: none">• Tubos cónicos de 15 ml• Tubos cónicos de 50 ml	
--	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------	--

Para realizar la limpieza se utiliza cloro al 10% y Alcohol al 70%.

Tabla 4. Materiales y reactivos para amplificación de ARN viral a partir de plasma con EDTA

Reactivos	Materiales	Equipos
<ul style="list-style-type: none"> • Agua grado molecular • dNTP 10Mm • Cebadores • Buffer Super Script IV • 2x Buffer Super Script IV RT • 10X PCR Buffer • 0.1DTT • Rnasa Inhibitor • Super Script IV rt • Taq HiFi • MgSO₄ 	<ul style="list-style-type: none"> • Platos de 96 pocillos • Tapas en tiras • Tubos 1,5 ml y 0.2 ml • Puntas de 10µl • Puntas de 100µ • Puntas de 200µl • Puntas de 1000µl • Bolsas rojas de bioseguridad • Gradilla fría para platos de 96 pocillos • Bloque frío para tubos de 1,5 ml y 0.2 ml 	<ul style="list-style-type: none"> • Micropipetas de 100-1000 µl, 200 µl, 10-100 µl, 0.5-10µl • Termocicladores tiempo final • Microcentrífuga • Vórtex • Cabina de bioseguridad tipo 2

Tabla 5. Reactivos, materiales y equipos necesarios para la preparación de librerías de Illumina

Reactivos	Materiales	Equipos
<ul style="list-style-type: none"> • Kit de cuantificación Qubit ds DN HS Assay • Kit de tagmentación Indexes A y B • Perlas magnéticas para purificación del producto • Etanol absoluto • NaOH 1 N • Kit de normalización • Kit de secuenciación Nextera XT versión 2 • Control PhiX 10pM • Cartuchos de 500 ciclos 	<ul style="list-style-type: none"> • Platos de 96 pocillos • Sellador de platos • Tubos para Qubit • Tubos 1,5 ml y 0.2 ml • Tubos cónicos de 15 ml y 50 ml • Platos MIDI • Magneto para purificación con perlas • Puntas de 10µl • Puntas de 100µ • Puntas de 200µl • Puntas de 1000µl • Reservorios • Bolsas rojas de bioseguridad • Pipeta serológica de 25ml 	<ul style="list-style-type: none"> • Micropipetas de 100-1000 µl, 200 µl, 10-100 µl, 0.5-10µl • Termocicladores tiempo final • Qubit • Secuenciador MiSeq • Microcentrífuga • Vórtex • Agitador de platos • Agitador/rotador de tubos • Balanza analítica • Cabina de bioseguridad tipo 2

	<ul style="list-style-type: none">• Gradillas para platos de 96 pocillos• Gradillas para tubos de 1,5 ml y 0.2 ml	<ul style="list-style-type: none">• Cámara de extracción de gases• Cámara electroforética• Generador de voltajes
--	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

CAPÍTULO III

RESULTADOS

Datos clínicos y demográficos de los participantes del estudio

En este estudio, se analizaron los datos de historia clínica y resultados de monitoreos de carga viral y conteo de CD4+ en las 78 muestras analizadas. Todos los sujetos eran pacientes naïve en el momento de su participación del estudio y fueron reclutados en su primera cita de monitoreo en el ICGES luego de aceptar participar del estudio FID14-033.

La mayoría eran hombres (78.48%, n= 62). La edad promedio fue de 25 y 30 años mujeres y hombres, respectivamente. Los datos clínicos y demográficos se muestran en la Tabla 5.

La mediana de la carga viral basal fue de log₁₀ 4.75 copias/ml.

Datos clínicos y demográficos	
Número de muestras	78
Sexo	Hombres: 78.2%, n=61
	Mujeres: 21.8%, n=17
Edad	Hombres: 25 años
	Mujeres: 30 años
Conteo linfocitos T CD4+ inicial	Mediana: 330 células/ μ l
	Mínimo-máximo: 10-1265 células/ μ l
Carga viral	Mediana: \log_{10} 4.76 copias/ml
	Mínimo-máximo: \log_{10} 3.10- 6.23 copias/ml
Nacionalidades	Panamá: 85.9%, n=67
	Colombia: 7.8%, n=6
	Venezuela: 3.8%, n=3
	Nicaragua: 2.5%, n=2
Residencia	Panamá Centro: 87.18%, n=68
	Panamá Oeste: 6.41%, n=5
	Región Central: 3.85%, n=3
	Panamá Este: 2.56%, n=2
Grupos de riesgo	Heterosexuales: 48.72%, n=38
	Homosexuales: 46.15%, n=36
	Bisexuales: 5.12%, n=4

Tabla 6. Datos clínicos y demográficos de los 78 participantes naïve VIH-1 positivos y sensibles a la terapia antirretroviral en su diagnóstico inicial.

Extracción de ARN viral

La extracción de ARN viral del VIH-1 se realizó de forma manual con el kit de QIAGEN QIAamp viral RNA. Se utilizaron 500µl de plasma con EDTA en la mayoría de las muestras, sin embargo, 4 muestras no presentaban el volumen requerido por lo que la extracción se realizó con volúmenes entre 140-400µl siguiendo las recomendaciones detalladas por el fabricante para la extracción de ARN con volúmenes bajos de plasma.

Amplificación del ARN fragmento completo del gen pol VIH

De las 102 muestras seleccionadas inicialmente, 22 muestras no fueron encontradas en los congeladores de almacenamiento del ICGES y 2 muestras no amplificaron con ninguno de los 2 protocolos utilizados por lo que fueron eliminadas de este estudio por lo que nuestro tamaño de muestra final fue de 78 muestras.

Luego de la extracción del ARN viral de VIH-1, se realizó la PCR de tiempo final y se obtuvieron 21/78 para la transcriptasa inversa del codón 1-560 y proteasa del codón 1-99 mediante una metodología de PCR tiempo final casero utilizada en el Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud (ICGES). 57/78 muestras fueron amplificadas por la metodología antes descrita (artículo de referencia) para obtener el fragmento completo de VIH (transcriptasa inversa codón 1-560, proteasa codón 1-99 e integrasa codón 1-288).

Los 78 amplificados fueron confirmados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y tampón TBE al 0.5X, con fragmentos esperados de aproximadamente 1200 pb para el fragmento parcial del gen pol (transcriptasa inversa y proteasa) y de 1300 pb para el fragmento completo del gen pol (transcriptasa inversa, proteasa e integrasa) (Ver Figura 6).

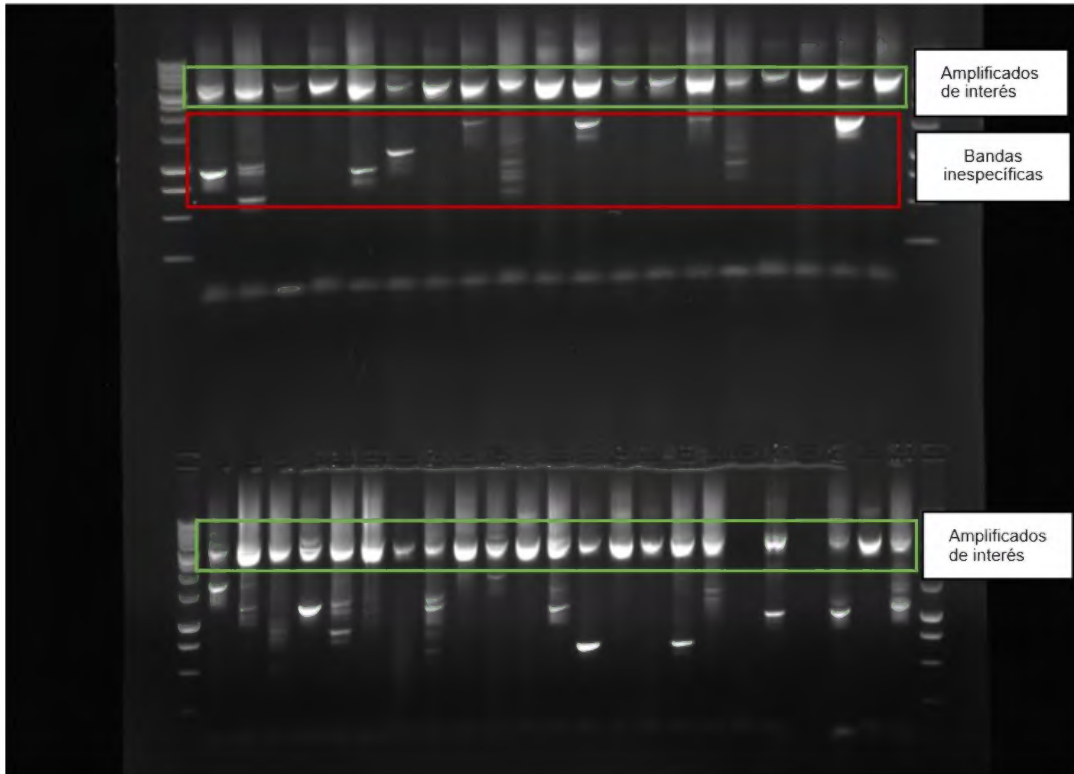


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa para los productos amplificados de la proteasa, transcriptasa inversa e integrasa (amplificación completa del gen pol). Se observan las bandas con tamaños aproximados de 3000 pb, utilizando escaleras de peso molecular de 1kb.

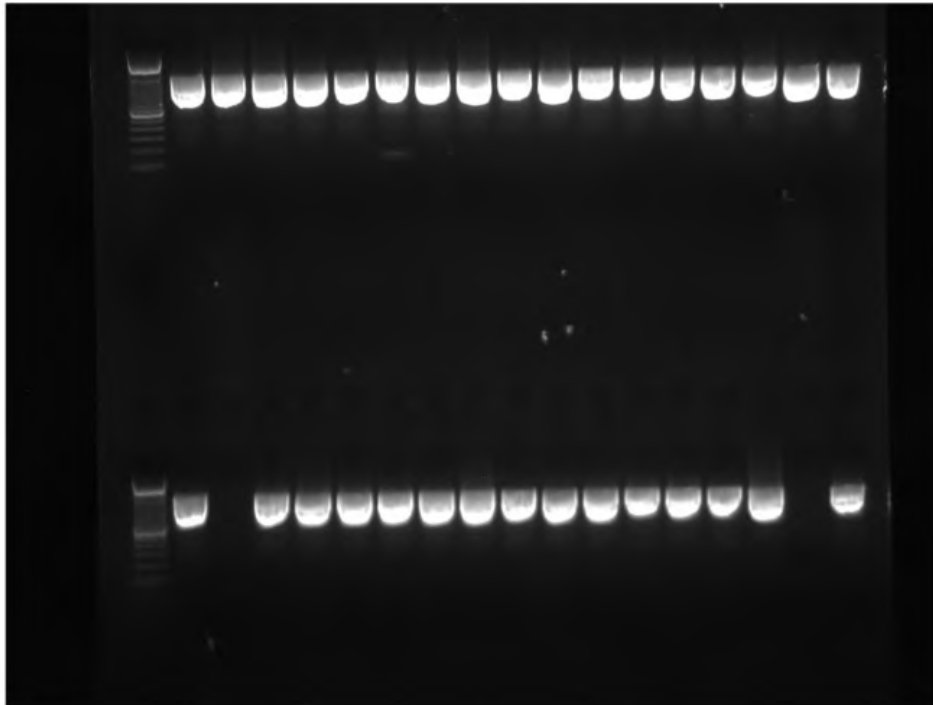


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa para los productos amplificados la proteasa y transcriptasa inversa (amplificación parcial del gen pol). Se observan las bandas con tamaños aproximados de 1200 pb, utilizando escaleras de peso molecular de 100 pb.

Purificación de productos de PCR

Los 78 amplificados fueron purificados satisfactoriamente mediante el kit comercial PCR Qiaquick Purification, obteniendo un volumen total aproximado de 50 μ l para las bandas fuertes y 30 μ l para las bandas débiles obtenidas en el gel de agarosa.

Secuenciación de Illumina NGS MiSeq

Las 78 muestras analizadas en este estudio, fueron secuenciadas previamente mediante la metodología de Sanger para la proteasa y transcriptasa, en un estudio previo realizado en el ICGES (FID14-033). Los resultados de su genotipaje inicial indicaron que las 78 muestras presentaban sensibilidad frente a los antirretrovirales.

Los 78 purificados obtenidos fueron preparados en librerías de Nextera-Illumina y posteriormente secuenciadas de manera satisfactoria utilizando la plataforma MiSeq. Las métricas de la secuenciación obtenida en los 4 ensayos, se representan en la Tabla 6. Las métricas de secuenciación obtenidas en todos los ensayos fueron aceptables, el porcentaje de error fue bajo, el valor Q30 obtenido en todas las corridas fue aceptable y los valores obtenidos de lecturas que pasaron el filtro (PF%, por sus siglas en inglés), indican que hubo una formación adecuada y balanceada de grupos de secuenciación (cluster, por sus siglas en inglés).

Corridas	Rendimiento final estimado (Gb)	Rendimiento obtenido (Gb)	Alineamiento (%)	Rango de error (%)	Valor de Q30
Ensayo 1					
Lectura 1	2.50	2.50	2.87	1.32	93.30
Lectura 2	2.50	2.50	2.83	1.36	
Ensayo 2					
Lectura 1	6.25	6.25	5.21	1.08	81.3
Lectura 2	6.25	6.25	4.96	2.70	
Ensayo 3					
Lectura 1	6.14	6.14	5.32	1.04	83.6
Lectura 2	6.14	6.14	5.20	1.25	
Ensayo 4					
Lectura 1	4.37	4.37	8.72	0.92	88.5
Lectura 2	4.37	4.37	8.55	1.50	

Tabla 7. Métricas de la secuenciación MiSeq obtenidas en cada corrida

Análisis de secuencias NGS MiSeq

La data obtenida de todas las muestras secuenciadas, fue analizada mediante el programa R utilizando un algoritmo basado en la base de datos de la Universidad de Stanford de Canadá para la búsqueda de mutaciones asociadas a resistencia de VIH-1. Estos resultados fueron comparados con los obtenidos previamente en la secuenciación de Sanger.

Para la búsqueda de mutaciones minoritarias en general, se identificaron aquellas mutaciones con frecuencias $\geq 5\%$ en las muestras analizadas. Además, en aquellos pacientes que luego de 12 meses de monitoreo no lograban alcanzar supresión viral sostenida, se identificaron mutaciones de interés en valores $\leq 1\%$ de la población viral. Mutaciones presentes en valores 1-20% fueron consideradas como mutaciones minoritarias.



Figura 9. Datos de cobertura y profundidad de lecturas obtenidos en las muestras analizadas. Se observa una mayor cobertura del fragmento en las muestras con amplificación de la proteasa, transcriptasa inversa y proteasa a diferencia de la cobertura obtenida en las muestras en las que se obtuvo el amplificado mediante la metodología de fragmento parcial, en la que se observa un fragmento pequeño.

Análisis de fragmentos obtenidos

- **Proteasa 1-99**

Se obtuvieron 78 amplificados de las muestras analizadas para la proteasa, desde la posición 1 a la 99 de aminoácidos que conforman esta enzima.

En la Figura 6 se muestra la frecuencia de mutaciones identificadas en porcentajes $\geq 5\%$ presentes en la proteasa.

Se identificaron mutaciones accesorias de vigilancia en más de 40 muestras como la L63P, M36I, V77I y la mutación I93L. Además, se identificaron otras mutaciones que presentaban alta frecuencia como V3I, S37N y la R41K sin embargo, estas mutaciones no están asociadas a resistencia.

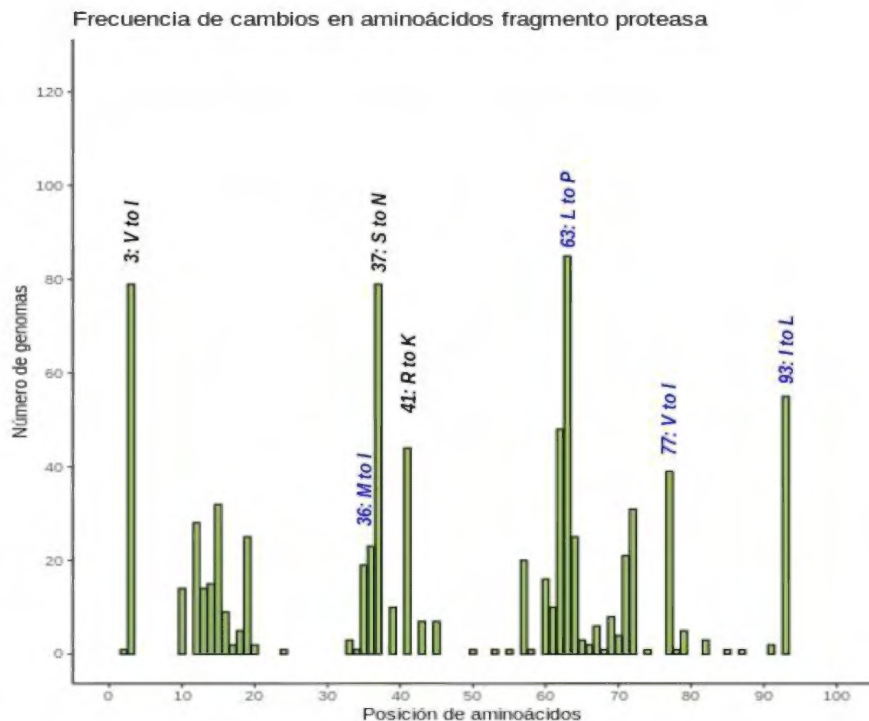


Figura 10. Gráfico de frecuencia de cambios en aminoácidos en la proteasa. Se observa la distribución de frecuencias en los cambios de aminoácidos desde la posición 1-99. En color azul se indican los cambios que son de vigilancia

epidemiológica pero no confieren resistencia y en color negro, cambios de aminoácidos en alta frecuencia que no confieren resistencia.

- **Transcriptasa inversa 1-560**

Para esta enzima, se obtuvo la secuenciación del fragmento completo de las 78 muestras analizadas cubriendo desde la posición 1 a la 560.

En la Figura 7 se muestra la frecuencia de mutaciones identificadas en porcentajes $\geq 5\%$ presentes en la transcriptasa inversa en las muestras analizadas. Las posiciones con mayor frecuencia de cambios de aminoácidos fueron L214F, E122K, R277K y T376A, sin embargo estos cambios no están asociados a resistencia a los inhibidores de la transcriptasa inversa.

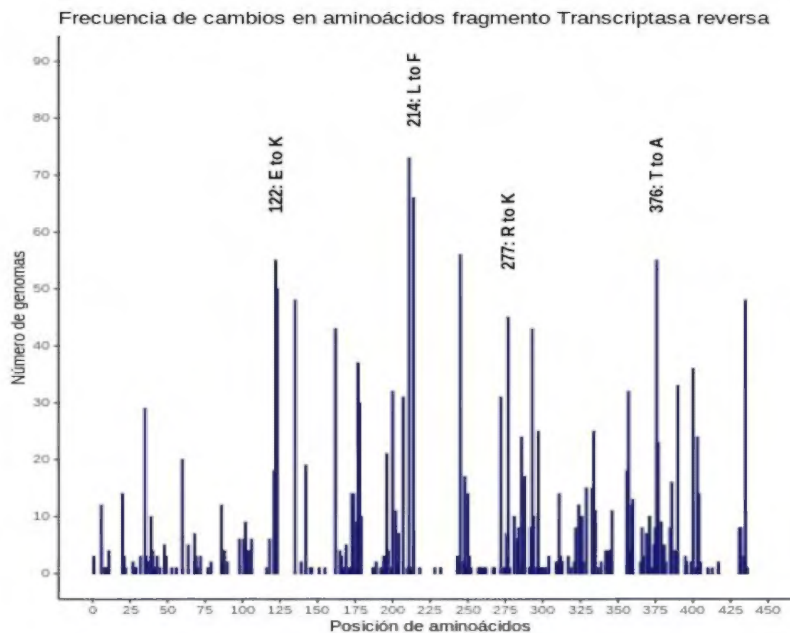


Figura 11. Histograma de frecuencia de cambios en aminoácidos en el fragmento de la Transcriptasa inversa. Se observa la distribución de frecuencias en los cambios de aminoácidos desde la posición 1-560. En color negro se indican los cambios de aminoácidos en alta frecuencia, sin embargo, no confieren resistencia.

- **Integrasa 1-288**

Para esta enzima, se obtuvo la secuenciación del fragmento completo del gen por 57 muestras analizadas desde la posición 1 a la 288.

En la Figura 8 se muestra la frecuencia de mutaciones identificadas en porcentajes $\geq 5\%$ presentes en la integrasa. En el análisis de los cambios de aminoácidos presentes en esta enzima, se identificaron D10E, A124N, A124T y N232D como los de mayor frecuencia los cuales no están asociados a resistencia frente a los inhibidores de la integrasa.

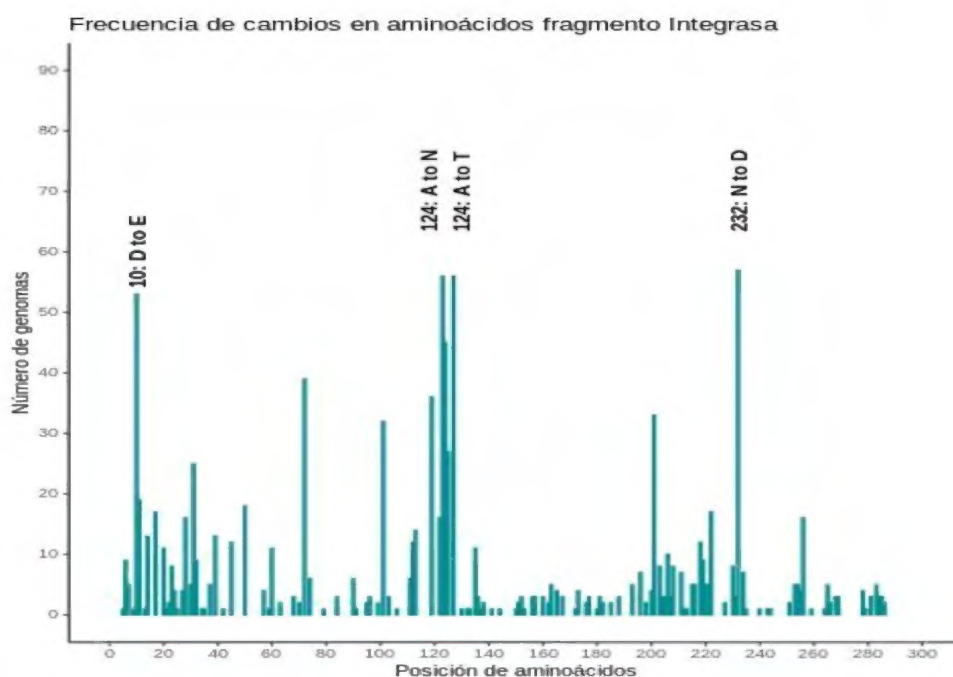


Figura 12. Histograma de frecuencia de cambios en aminoácidos en la integrasa. Se observa la distribución de frecuencias en los cambios de aminoácidos desde la posición 1-288. En color negro se indican los cambios de aminoácidos observados en alta frecuencia, sin embargo, no confieren resistencia.

Análisis de mutaciones minoritarias asociadas a resistencia en porcentajes \geq 5 % de la población viral

- **Inhibidores de la proteasa (INPR)**

Los análisis realizados en el programa R indicaron que 75/78 de las muestras analizadas presentaron al menos 1 mutación menor o accesoria asociada a resistencia de los inhibidores de la proteasa con frecuencia igual o mayor al 5%. Ninguna de estas mutaciones fue detectada previamente por la metodología de Sanger debido a su baja frecuencia en la población viral del individuo.

Se identificaron 21 mutaciones accesorias de vigilancia asociadas a resistencia a los INPR, siendo I93L la mutación accesoria más frecuente, detectada en 55 muestras.

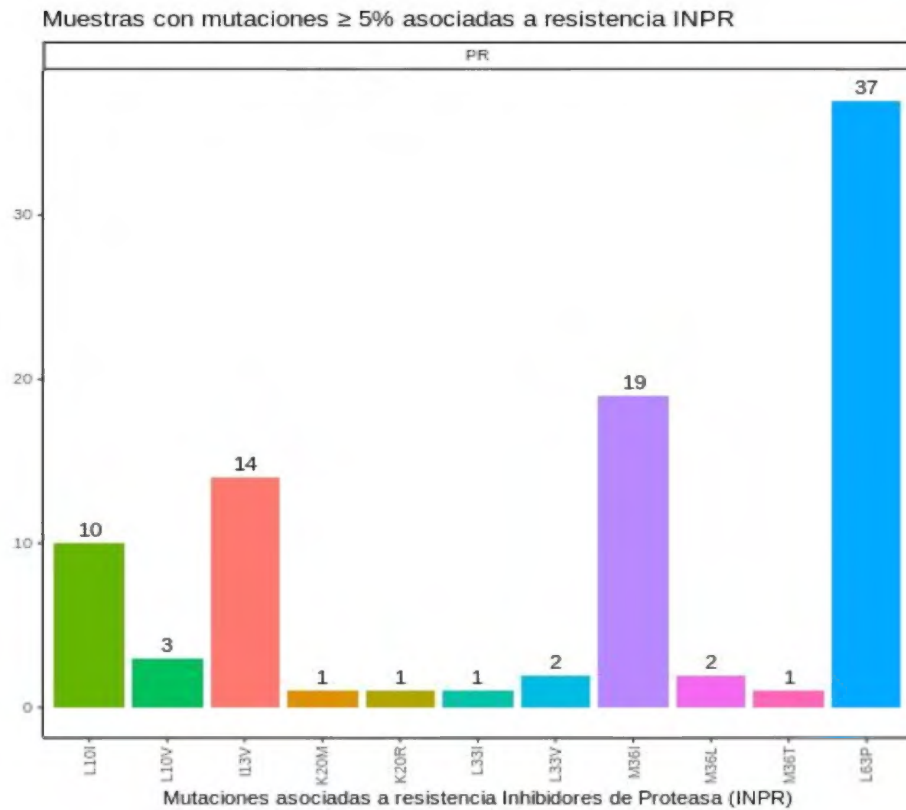


Figura 13. Frecuencia de mutaciones asociadas a resistencia identificadas en la proteasa en los sujetos de estudio

- **Inhibidores de la transcriptasa inversa (ITI)**

De 78 muestras analizadas, 17 presentaron 1 mutación asociada a resistencia a la transcriptasa inversa con frecuencia $\geq 5\%$. En la Tabla 7 se presentan las muestras en las que se identificaron mutaciones asociadas a resistencia de INTI en frecuencia $\geq 5\%$ de la población viral. Se identificaron 7 mutaciones asociadas a resistencia en total. 8 muestras presentaron 1 mutación asociada a resistencia a los INTI y 9 a INNTI. De acuerdo a la base datos de la Universidad de Stanford, se observan cambios a “altamente resistente” y “resistencia potencial baja”.

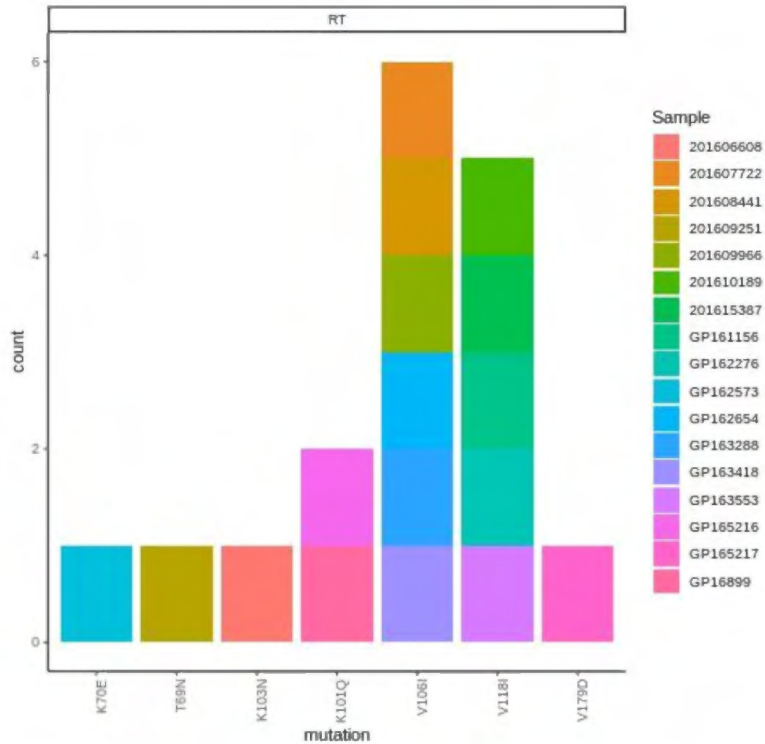


Figura 14. Frecuencia de mutaciones asociadas a resistencia identificadas la transcriptasa inversa en los sujetos de estudio

La mutación accesoria asociada a resistencia INTI más frecuente en las 79 muestras analizadas fue la mutación accesoria V118I, la cual al presentarse únicamente no causa cambios en los niveles de sensibilidad al tratamiento por parte del virus. La mutación asociada a resistencia de los INNTI más común fue la mutación mayor V106I la cual causa resistencia potencial baja a NVP. No se observaron muestras con mutaciones para ambos inhibidores. De manera interesante, en la muestra 201606608 se identificó la mutación mayor K103N que se caracteriza por disminuir la sensibilidad a los INNTI, presentando una resistencia alta a EFV y NVP. Por otro lado, en la muestra GP162573 se identificó la mutación no polimórfica poco común K70E la cual causa resistencia alta a ABC y TDF.

				Antirretroviral					
ID muestras		Mutaciones identificadas		Abacabir (ABC)	Lamivudina (3TC)	Tenofovir (TDF)	Zidovudina (AZT)	Efavirenz (EFV)	Nevirapina (NVP)
				INTI	INNTI				
1.	201606608		K103N	S	S	S	S	RA	RA
2.	201607722		V106I	S	S	S	S	S	RP
3.	201608441		V106I	S	S	S	S	S	RP
4.	201609251	T69N		S	S	S	S	S	S
5.	201609966		V106I	S	S	S	S	S	RP
6.	201610189	V118I		S	S	S	S	S	S
7.	201615387	V118I		S	S	S	S	S	S
8.	GP161156	V118I		S	S	S	S	S	S
9.	GP162276	V118I		S	S	S	S	S	S
10.	GP162573	K70E		RA	RP	RA	S	S	S
11.	GP162654		V106I	S	S	S	S	S	RP
12.	GP163288		V106I	S	S	S	S	S	RP
13.	GP163418		V106I	S	S	S	S	S	RP
14.	GP163558	V118I		S	S	S	S	S	S
15.	GP165216		K101Q	S	S	S	S	S	S
16.	GP165217		V179D	S	S	S	S	RP	RP
17.	GP16899		K101Q	S	S	S	S	S	S

Tabla 7. Listado de muestras con mutaciones minoritarias de los INTI con frecuencia $\geq 5\%$

de la población viral y su interpretación en la TAR.

S Sensible;
 RP Resistencia potencial;
 RB Resistencia baja;
 RI Resistencia intermedia;
 RA Resistencia alta

- **Inhibidores de integrasa (INSTI)**

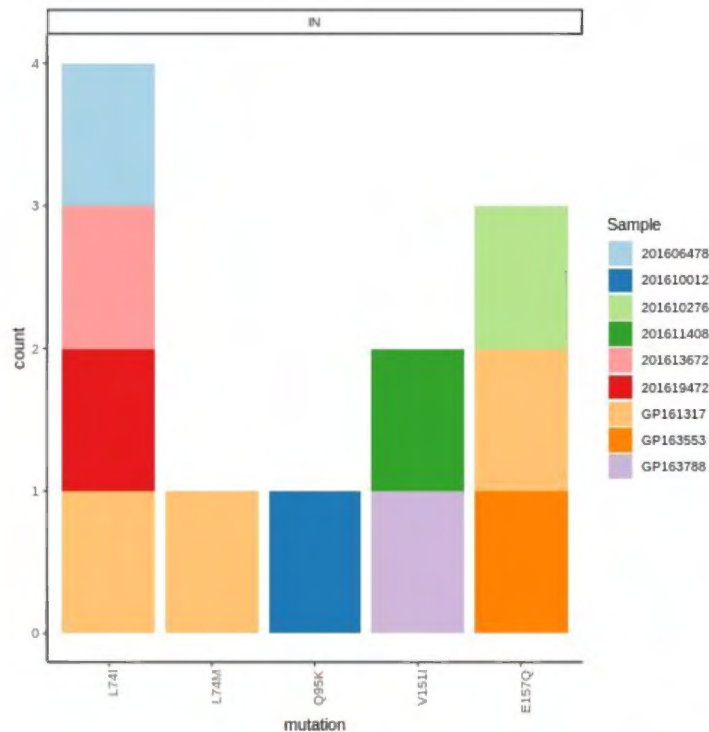


Figura 15. Frecuencia de mutaciones asociadas a resistencia identificadas en la integrasa en los sujetos de estudio.

9/78 muestras presentaron al menos 1 mutación accesorias o polimórfica asociada a inhibidores de integrasa. En la Tabla 8 se presentan las muestras en las que se identificaron mutaciones asociadas a resistencia de INSTI en frecuencia $\geq 5\%$ de la población viral y su interpretación frente a los antirretrovirales.

Se identificaron 5 mutaciones mayores y accesorias en las 78 muestras analizadas. La mutación asociada a resistencia con mayor frecuencia fue L74I, mutación polimórfica accesorias que es comúnmente detectada en sujetos naïve en porcentajes entre 0.5 al 5%. Por si sola, no causa cambios en la sensibilidad de la TAR. De un total de 9 muestras, 8 presentaron 1 sola mutación y únicamente la

muestra GP161317 muestra presentó 3 mutaciones asociadas a resistencia de los INSTI.

Los cambios en la sensibilidad a los INSTI, se observaron en las muestras 201610012, 201610276, GP161317 y GP163553 en donde presentaron resistencia potencial a RAL y EVG debido a la presencia de mutaciones como Q95K, E157Q y L74IM.

			Antirretroviral		
	ID muestras	Mutaciones identificadas	Dolutegravir (DTG)	Raltegravir (RAL)	Elvitegravir (EVG)
1.	201606478	L74I (accesoria polimórfica)	S	S	S
2.	201610012	Q95K (no polimórfica)	S	RP	RP
3.	201610276	E157Q (polimórfica)	S	RP	RP
4.	201611408	V151I (accesoria)	S	S	S
5.	201613672	L74I (accesoria polimórfica)	S	S	S
6.	201619472	L74I (accesoria polimórfica)	S	S	S
7.	GP161317	L74I, L74M, E157Q	S	RP	RP
8.	GP163553	E157Q (polimórfica)	S	RP	RP
9.	GP163788	V151I (accesoria)	S	S	S

Tabla 8. Listado de muestras con mutaciones accesorias minoritarias o polimórficas de los INSTI con frecuencia $\geq 5\%$ de la población viral y su interpretación frente a los antirretrovirales.

S Sensible;
 RP Resistencia potencial;
 RB Resistencia baja;
 RI Resistencia intermedia;
 RA Resistencia alta

Búsqueda de mutaciones minoritarias en sujetos que no lograron supresión viral sostenida durante al menos 12 meses de monitoreo.

De los 78 sujetos de estudio, se realizó una búsqueda de sujetos que presentaban carga viral mayor a 1000 copias/ml luego de su diagnóstico inicial. Para la búsqueda de las muestras, se realizó un filtro a la base de datos utilizando el programa estadístico R en donde se incluyeron todos los monitoreos de carga viral de VIH de los 78 sujetos de estudio en un periodo de al menos 12 meses.

Un total de 19 sujetos presentaron al menos un monitoreo con carga viral ≥ 1000 copias/ml luego de 2 meses de monitoreo tomando TAR y se realizó la búsqueda de mutaciones minoritarias como posible causa de fallo virológico en estos participantes. El fallo virológico es definido como un aumento de la carga viral en niveles > 1000 copias/ml luego de 6 meses de haber iniciado la TAR. En la Figura 9 se muestran la distribución de la carga viral y la cuantificación de Linfocitos T CD4+ en los 19 sujetos.

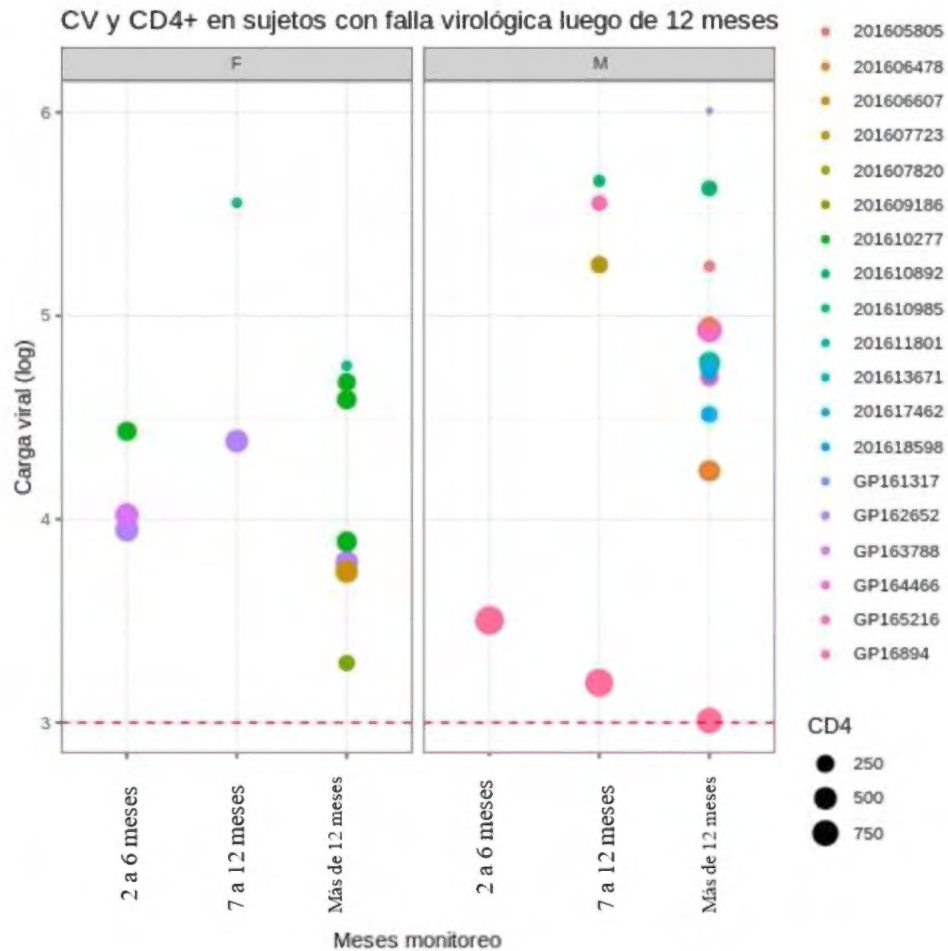


Figura 16. Distribución y correlación entre los monitoreos de la carga viral y los Linfocitos T CD4+ en sujetos con posible fallo virológico. En el diagrama se representa en el eje de las ordenadas, la carga viral en escala logarítmica mientras que en el eje de las abscisas se representan los meses en donde se realizó las pruebas de monitoreo. Cada participante se diferencia por un color específico, se dividen por sexo y los linfocitos T CD4+ están representado por el tamaño de los puntos indicados en la imagen.

- **Inhibidores de la transcriptasa inversa**

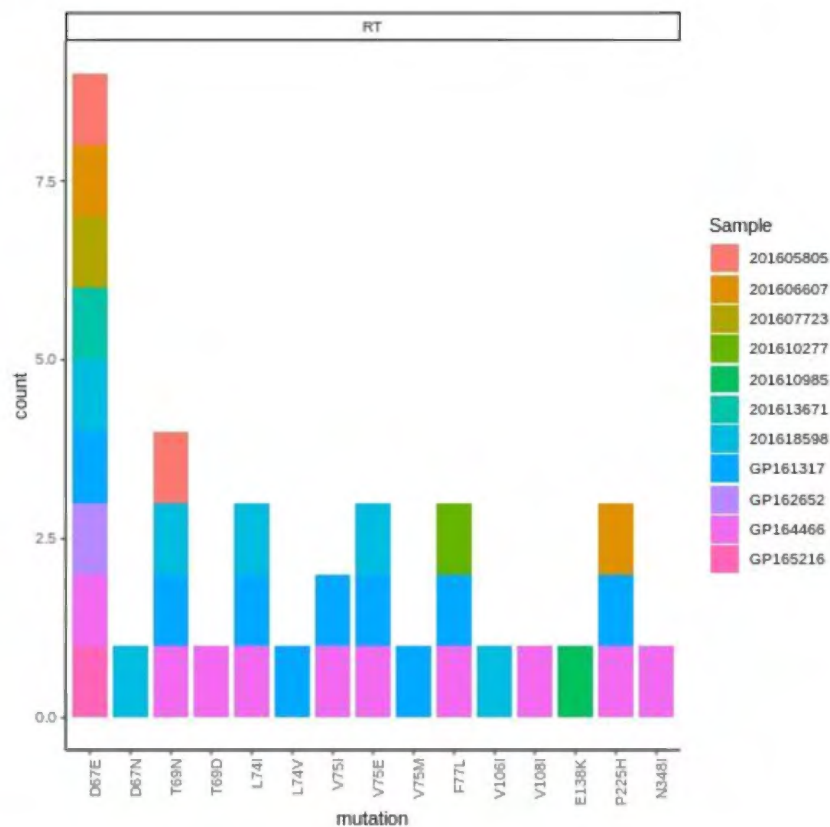


Figura 17. Frecuencia de mutaciones minoritarias asociadas a resistencia identificadas en la transcriptasa inversa en sujetos con fallo virológico.

Se identificaron 11/19 muestras con al menos una mutación minoritaria asociada a resistencia de ITI. En análisis se detectaron 10/11 muestras con al menos 1 mutación minoritarias asociada a INTI y 5/11 muestras con al menos una mutación minoritaria asociada a INNTI con frecuencia igual o menor al 1%.

Entre las 11 muestras con mutaciones minoritarias asociadas a INTI, 3 muestras presentaban una combinación de INTI, INNTI y otras mutaciones de interés, 1 muestra presentaba 1 mutación minoritaria de los INTI y 1 mutación de INNTI, 6

muestras solo presentaban 1 mutación asociada a INTI y por último, 1 muestra presentaba 1 mutación minoritaria asociada a INNTI.

En cuanto a los cambios en la sensibilidad frente a los antirretrovirales, por ejemplo, la muestra GP164466 presenta resistencia alta para NVP, resistencia intermedia a ABC y EFV, resistencia baja a TDF y AZT y resistencia potencial a 3TC y FTC debido a la presencia de mutaciones accesorias minoritarias y discriminatorias asociadas a INTI e INNTI: D67E, L74I, V75EI, F77L y N348I, P225H, V108I, respectivamente. De igual manera, la muestra GP161317 presentó cambios en la susceptibilidad a la TAR como resistencia intermedia a ABC, AZT, EFV y NVP; resistencia baja a TDF y resistencia potencial a 3TC y FTC como resultado de la presencia de mutaciones minoritarias a INTI e INNTI en porcentajes $\leq 1\%$ como D67E, L74IV, V75MEI, F77L y la P225H. En la Tabla 9 se detallan las mutaciones encontradas en el resto de las muestras analizadas.

				Antirretroviral							
ID muestras		Mutaciones			Abacabir (ABC)	Lamivudina (3TC)	Emtricitabina (FTC)	Tenofovir (TDF)	Zidovudina (AZT)	Efavirenz (EFV)	Nevirapina (NVP)
		INTI	INNTI	Otras							
1.	201605805	D67E		T69N (TAMs)	S	S	S	S	RP	S	S
2.	201606607	D67E	P225H		S	S	S	S	RP	RI	RI
3.	201607723	D67E			S	S	S	S	RP	S	S
4.	201610277	F77L			S	S	S	S	RP	S	S
5.	201610985		E138K		S	S	S	S	S	S	RP
6.	201613671	D67E			S	S	S	S	RP	S	S
7.	201618598	D67EN, L74I (discriminatoria)	V106I (mayor)	T69N (TAMs), V75E	RI	S	S	RP	RB	S	RP
8.	GP161317	D67E, L74IV (discriminatoria), V75MEI, F77L	P225H	T69N	RI	RP	RP	RB	RI	RI	RI
9.	GP162652	D67E			S	S	S	S	RP	S	S
10.	GP164466	D67E, L74I (discriminatoria), V75EI, F77L, T69D	N348I, P225H, V108I	T69N	RI	RP	RP	RB	RB	RI	RA
11.	GP165216	D67E			S	S	S	S	RP	S	S

Tabla 9. Listado de muestras de seguimiento con carga viral ≥ 1000 copias/mL luego de 2 meses de monitoreo con mutaciones minoritarias de los inhibidores de la transcriptasa inversa con frecuencia $\leq 1\%$ de la población viral y su interpretación frente a los antirretrovirales.

S Sensible;
 RP Resistencia potencial;
 RB Resistencia baja;
 RI Resistencia intermedia;
 RA Resistencia alta

Las lecturas obtenidas para cada sitio donde se ubica la mutación, fueron analizadas en el programa R mediante un algoritmo donde se obtuvieron valores mayores a 30,000 lecturas para cada mutación (Ver Figura 18)

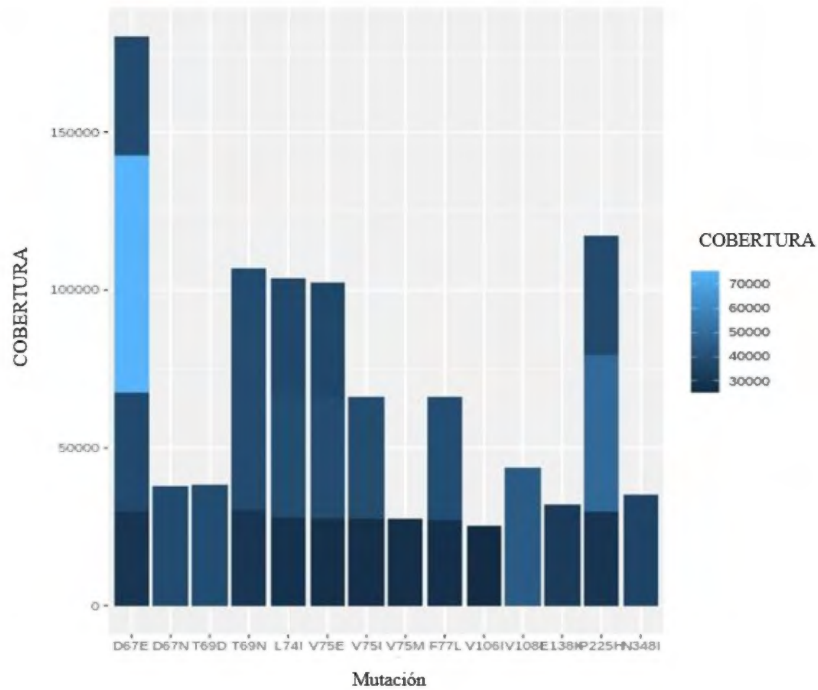


Figura 18. Lecturas obtenidas en cada mutación identificada en baja frecuencia. En el eje de las x se presentan las mutaciones minoritarias identificadas en la transcriptasa inversa y el cuadro con el gradiente de colores, se identifica el total aproximado de lecturas obtenidas.

Inhibidores de la proteasa (INPR)

De un total de 19 muestras que presentaban fallo virológico, 5 presentaban al menos 1 mutación mayor asociada a inhibidores de la proteasa (INPR) con frecuencia $\leq 1\%$. De estas 5 muestras, 2 presentaron 2 mutaciones en total y 3 presentaron 1 mutación mayor asociada a resistencia.

Se identificaron 4 mutaciones mayores asociadas a resistencia de los INPR y la más frecuente fue M46I. En la Tabla 10 se muestra una comparación en los niveles de resistencia a los INPR al tomarse en consideración estas mutaciones mayores identificadas en las muestras analizadas.

En su diagnóstico inicial, estas muestras presentaron sensibilidad a todos los esquemas de terapia antirretroviral con la metodología de secuenciación de Sanger. Sin embargo, en el análisis de éstas mutaciones minoritarias, la muestra 201605805 presenta una resistencia intermedia para Atazanavir (ATV) y resistencia baja para Lopinavir (LPV/r). Las 4 muestras restantes, cambian de sensible a presentar una potencial resistencia a Atazanavir (ATV) y Lopinavir (LPV). Todas las muestras mantienen el estado sensible frente a Darunavir (DRV).

Tabla 10. Listado de muestras con mutaciones minoritarias de los INPR con frecuencia $\leq 1\%$ de la población viral y su interpretación frente a los antirretrovirales.

						Antirretroviral		
	ID muestras	Mutaciones identificadas				Atazanavir (ATV)	Dorunavir (DRV)	Lopinavir (LPV)
		G48V	154T	M46I	M46L			
1.	201605805					RI	S	RB
2.	201610277					RP	S	RP
3.	201610985					RP	S	RP
4.	GP161317					RP	S	RP
5.	GP162652					RP	S	RP

S Sensible;
 RP Resistencia potencial;
 RB Resistencia baja;
 RI Resistencia intermedia;
 RA Resistencia alta

Las lecturas obtenidas para cada sitio donde se ubica la mutación, fueron analizadas en el programa R mediante un algoritmo donde se obtuvieron valores mayores a 30,000 lecturas para cada mutación (Ver Figura 19)

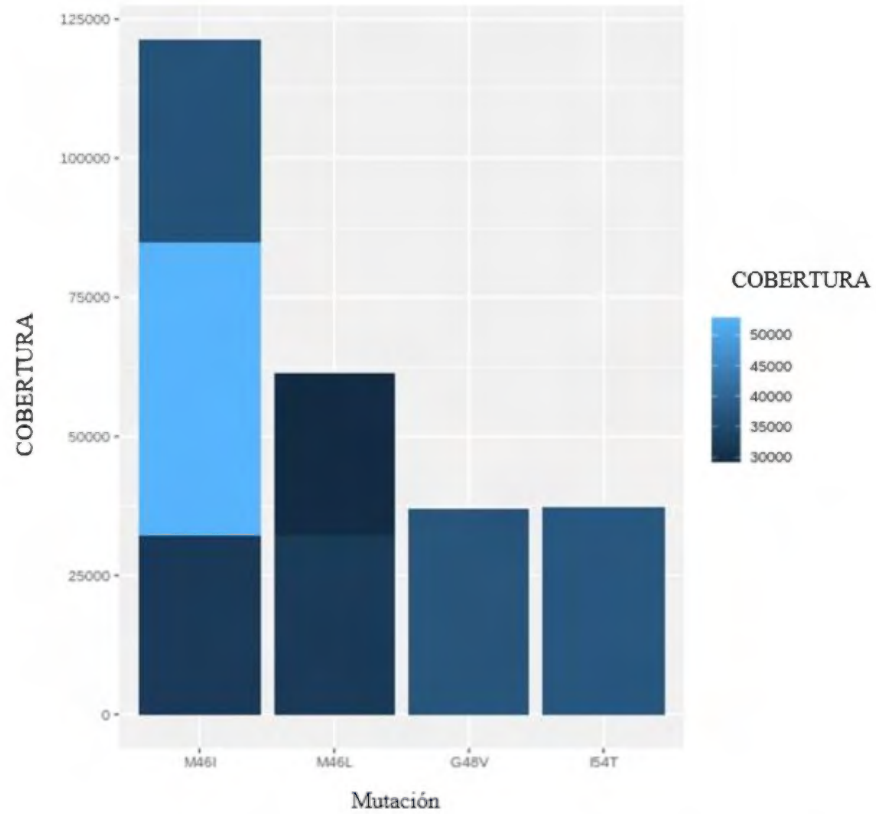


Figura 19. Lecturas obtenidas en cada mutación identificada en baja frecuencia. En el eje de las x se presentan las mutaciones minoritarias identificadas en la proteasa y el cuadro con el gradiente de colores ubicado a la derecha de la figura, se identifica el total aproximado de lecturas obtenidas.

Detección e identificación de mutaciones minoritarias Análogos de Timidina (TAMs) en sujetos del estudio

Del total de 79 muestras analizadas, 5 presentaron 1 mutación asociada a resistencia de los Análogos de Timidina (TAMs) las cuales se detallan en la Tabla 11 La presencia de mutaciones como M41L, D67N y L210W en las muestras identificadas, resultaron en cambios en el tratamiento de susceptible a tener una resistencia baja a Zidovudina (AZT).

De estas 5 muestras, solo la muestra 201618598 presentó fallo virológico luego de al menos 12 meses de seguimiento.

					Antirretroviral						
ID muestra	Mutaciones TAMs			%	Abacabir (ABC)	Lamivudina (3TC)	Emtricitabina (FTC)	Tenofovir (TDF)	Zidovudina (AZT)	Efavirenz (EFV)	Nevirapina (NVP)
	M41L	D67 N	L210 W								
1. 201611408				1-5	S	S	S	S	RB	S	S
2. 201616714				≤ 1	S	S	S	S	RB	S	S
3. 201618598				≤ 1	S	S	S	S	RB	S	S
4. GP161318				≤ 1	S	S	S	S	RB	S	S
5. GP162277				≤ 1	S	S	S	S	RB	S	S
6. GP162875				≤ 1	S	S	S	S	RB	S	S

S Sensible;
 RP Resistencia potencial;
 RB Resistencia baja;
 RI Resistencia intermedia;
 RA Resistencia alta

Tabla 11. Listado de muestras con TAMS identificadas en los sujetos del estudio.

- **Inhibidores de integrasa (INSTI)**

En el seguimiento de pacientes con fallo virológico, se identificaron 3/11 muestras que presentaron 1 mutación accesoria asociadas a resistencia a los INSTI. Las mutaciones encontradas L74M, Q95K y V151I no generan mayores cambios en la susceptibilidad en la TAR, excepto por esta última que causa resistencia potencial a RAL y EVG. En la Tabla 12 se detallan las muestras y mutaciones encontradas en frecuencia $\leq 1\%$ y su interpretación frente a los antirretrovirales.

			Antirretroviral			
	ID muestras	Mutaciones identificadas	Bictegravir (BIC)	Dolutegravir (DTG)	Ralvitegravir (RAL)	Elvitegravir (EVG)
1.	201606478	L74M	S	S	S	S
2.	201610277	Q95K	S	S	RP	RP
3.	GP164466	V151I	S	S	S	S

Tabla 12. Listado de muestras de seguimiento luego de 2 meses de monitoreo con mutaciones minoritarias de los INSTI con frecuencia $\leq 1\%$ de la población viral y su interpretación frente a los antirretrovirales.

Análisis comparativo entre secuencias obtenidas por metodología de Sanger e Illumina

Se analizaron los monitoreos de los Linfocitos T CD4+ y carga viral en los 78 sujetos del estudio durante al menos 12 meses. Aquellos que no lograron obtener valores menores a 1000 copias/ml fueron seleccionados se compararon los hallazgos obtenidos con la secuenciación de Illumina y los resultados de la secuenciación de Sanger para la transcriptasa inversa y proteasa.

- **Proteasa**

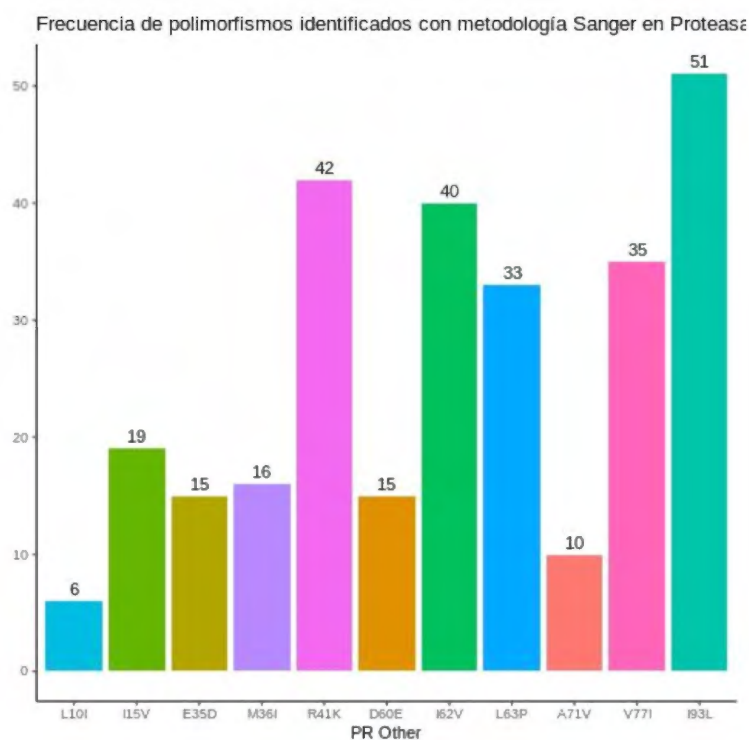


Figura 20. Polimorfismos con mayor frecuencia identificados en la proteasa en los sujetos de estudio con la secuenciación de Sanger (datos disponibles)

Se analizaron los datos fasta de la metodología de Sanger correspondiente a cada muestra y se identificaron mutaciones asociadas a resistencia de como I93L en 50 muestras, V77I en 35 muestras y la L63P en 33 muestras. Además, se detectaron polimorfismos como R41K en 42 muestras, I62V en 40 muestras, I15V en 18 muestras y otros polimorfismos en menor frecuencia.

En la **Tabla 13** se detallan las mutaciones y polimorfismos como resultado del análisis comparativo entre la metodología de Sanger e Illumina en 19 sujetos que presentaron fallo virológico. De las 19 muestras identificadas, 5 presentaban mutaciones menores asociadas a resistencia de los INPR.

	ID muestra	Metodología	Mutación/polimorfismo	Tipo
1.	201605805	Sanger	G16E, P39S, K43R, L63A, I64V, V77I, I93L	P
		Illumina	G16E, P39S, K43R, L63A, I64V, V77I, I93L, G48V (≤ 1%), I54T (≤ 1%), M46L (1-5%)	P/R
2.	201610277	Sanger	I15V, L19Q, M36I, R41, D60E, Q61D, I62V, L63Q, L63Q, A71T, I93L	P
		Illumina	I15V, L19Q, M36I, R41, D60E, Q61D, I62V, L63Q, L63Q, A71T, I93L, M46I (≤ 1%)	P/R
3.	201610985	Sanger	R41R, R41K, I62V, L63P, I64L, A71A, A71V, T74S, V77I, I93L	P
		Illumina	R41R, R41K, I62V, L63P, I64L, A71A, A71V, T74S, V77I, I93L, M46I (≤ 1%)	P/R
4.	GP161317	Sanger	I13V, K14R, I15V, <i>N37T</i> , R57K, I62V, L63P, V77I	P
		Illumina	I13V, K14R, I15V, <i>S37T</i> , R57K, I62V, L63P, V77I, M46IL (≤ 1%)	P/R
5.	GP162652	Sanger	<i>E35E</i> , E35D, <i>N37S</i> , R57K, D60E, Q61E, L63P	P
		Illumina	E35D, R57K, D60E, Q61E, L63P, M46L (≤ 1%)	P/R

P: polimorfismos, R: mutaciones asociadas a resistencia. **Negrita:** mutaciones asociadas a resistencia

Tabla 13. Comparación entre Sanger e Illumina en muestras con mutaciones asociadas a resistencia de los Inhibidores de la proteasa presentes en sujetos que no logran supresión viral luego de 2 meses de monitoreo.

Comparando los hallazgos de mutaciones y polimorfismos identificados la secuenciación de Sanger e Illumina, obtuvimos un 100% de concordancia en los resultados. Además, se identificaron mutaciones mayores asociadas a resistencia de los INPR como G48V, I54T, M46I en porcentajes $\leq 1\%$ y la mutación M46L en porcentaje $\leq 1\%$ y entre 1 a 5% mediante la secuenciación de Illumina.

Distribución de carga viral y conteo de linfocitos T CD4+

Entre las 5 muestras que presentaron mutaciones mayores y accesorias para INPR, 3 eran de sexo femenino y 2 de sexo masculino. En general, los 5 sujetos presentaron conteo de Linfocitos T CD4+ menores a 500 células/ μ l y 3 sujetos lograron alcanzar valores de carga viral menores a 1000 copias/ml durante al menos 2 meses de seguimiento. Los 2 sujetos restantes no lograron valores de carga viral menores a 1000 copias/ml en el periodo evaluado.

CV y CD4+ en sujetos con mutaciones minoritarias en PR

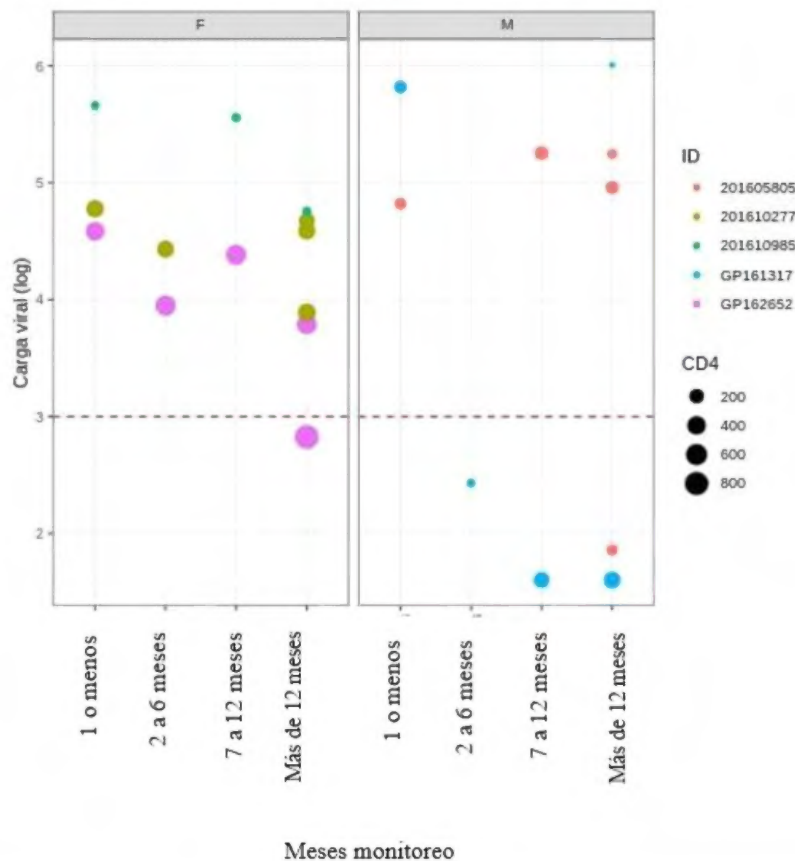


Figura 21. Distribución y correlación entre los monitoreos de la carga viral y los Linfocitos T CD4+ en sujetos con mutaciones minoritarias asociadas a resistencia en la proteasa.

- **Transcriptasa inversa**

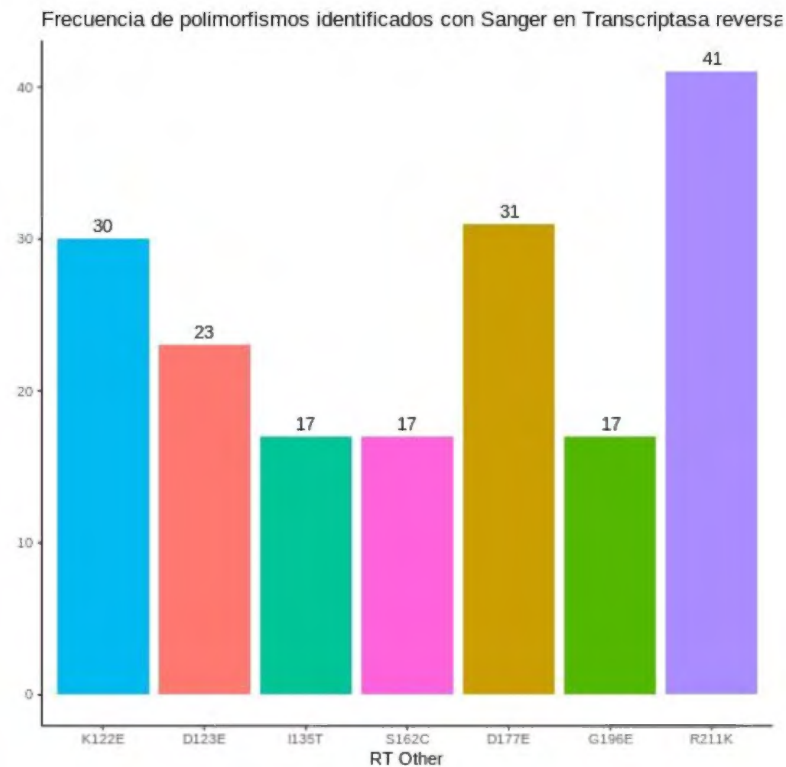


Figura 22. Polimorfismos de mayor frecuencia identificados en la transcriptasa inversa en los sujetos de estudio con la secuenciación de Sanger (datos disponibles)

Para la transcriptasa inversa de igual manera se analizaron los datos fasta de la metodología de Sanger correspondiente a cada muestra y se identificaron polimorfismos como R211K en 41 muestras, D177E en 31 muestras, I35T en 30 muestras, D123 en 2 muestras y otros polimorfismos en menor frecuencia.

En la Tabla 14 se detallan las comparaciones de los análisis entre la metodología de Sanger e Illumina en los 19 sujetos que presentaron fallo virológico, de los cuales

5 presentaron mutaciones asociadas a resistencia en baja frecuencia viral (< 1 % y de 1-5%) frente los inhibidores de la transcriptasa inversa.

Tabla 14. Comparación entre polimorfismos identificados mediante a metodología de Sanger e Illumina de los inhibidores de la transcriptasa inversa.

ID muestra		Metodología	Mutación/polimorfismo	Tipo
1.	201606607	Sanger	<i>K122E</i> , <i>D123S</i> , <i>Q145M</i> , <i>S162C</i> , <i>D177E</i> , <i>I95L</i> , <i>T200Q</i> , <i>R211K</i> , <i>K281K</i> , <i>T286A</i> , <i>E297K</i> , <i>S322T</i> , <i>I329L</i> , <i>G335D</i>	P
		Illumina	<i>D123S</i> , <i>Q145M</i> , <i>S162C</i> , <i>D177E</i> , <i>T200Q</i> , <i>R211K</i> , <i>T286A</i> , <i>E297K</i> , <i>S322T</i> , <i>I329L</i> , <i>G335D</i> , <i>D67E</i> ($\leq 1\%$) , <i>P225H</i> ($\leq 1\%$)	P/R
2.	201610985	Sanger	<i>K43N</i> , <i>K49R</i> , <i>D121H</i> , <i>K122E</i> , <i>I135T</i> , <i>S162C</i> , <i>D177E</i> , <i>I178M</i> , <i>Q207E</i> , <i>Q207K</i> , <i>R211K</i>	P
		Illumina	<i>K43N</i> , <i>K49R</i> , <i>D121H</i> , <i>K122E</i> , <i>I135T</i> , <i>S162C</i> , <i>D177E</i> , <i>I178M</i> , <i>Q207E</i> , <i>Q207K</i> , <i>R211K</i> , <i>E138K</i> ($\leq 1\%$) , <i>V106I</i> (1-5%)	P/R
3.	201618598	Sanger	<i>E6E</i> , <i>E6K</i> , <i>K22K</i> , <i>K22R</i> , <i>T27T</i> , <i>T27S</i> , <i>V35V</i> , <i>V35I</i> , <i>K122E</i> , <i>D123E</i> , <i>I135I</i> , <i>I135V</i> , <i>S162C</i> , <i>D177E</i> , <i>I178M</i> , <i>Q207E</i> , <i>V245Q</i>	P
		Illumina	<i>E6E</i> , <i>E6K</i> , <i>K22K</i> , <i>K22R</i> , <i>T27T</i> , <i>T27S</i> , <i>V35V</i> , <i>V35I</i> , <i>K122E</i> , <i>D123E</i> , <i>I135I</i> , <i>I135V</i> , <i>S162C</i> , <i>D177E</i> , <i>I178M</i> , <i>Q207E</i> , <i>V245Q</i> , <i>D67NE</i> , <i>T69N</i> , <i>L74I</i> , <i>V75E</i> y <i>V106I</i> (todas $\leq 1\%$)	P/R
4.	GP161317	Sanger	<i>V35T</i> , <i>W88S</i> , <i>D121H</i> , <i>K122E</i> , <i>D123D</i> , <i>D123E</i> , <i>I178L</i> , <i>R211S</i> , <i>F214L</i>	P

		Illumina	V35T, W88S, D121H, D123E, I178L, R211S, D67E, T69N, L74IV, V75MEI, F77L y P225H (todas $\leq 1\%$)	P/R
5.	GP164466	Sanger	E122Q, I135T, I142V, S162Y, T200A, Q207N, R211K, V245K	P
		Illumina	E122Q, I135T, I142V, S162Y, T200A, Q207N, R211K, V245K, D67E, T69DN, L74I, V75EI, F77L, V108I, P225H y N348I (todas $\leq 1\%$).	P/R

P: polimorfismos, R: mutaciones asociadas a resistencia. **Negrita:** mutaciones asociadas a resistencia.

De los 59 polimorfismos detectados por Sanger, 54 fueron detectados por Illumina logrando una concordancia del 91.52% entre ambas metodologías. Además, se detectaron mutaciones asociadas a resistencia a los inhibidores de la Transcriptasa inversa en porcentajes $\leq 1\%$ como E138K, D67NE, T69N, L74IV, V75MEI, F77L, V106I, P225H y N348I y la mutación V106I en porcentajes entre 1 y 5%.

Distribución de carga viral y conteo de linfocitos T CD4+

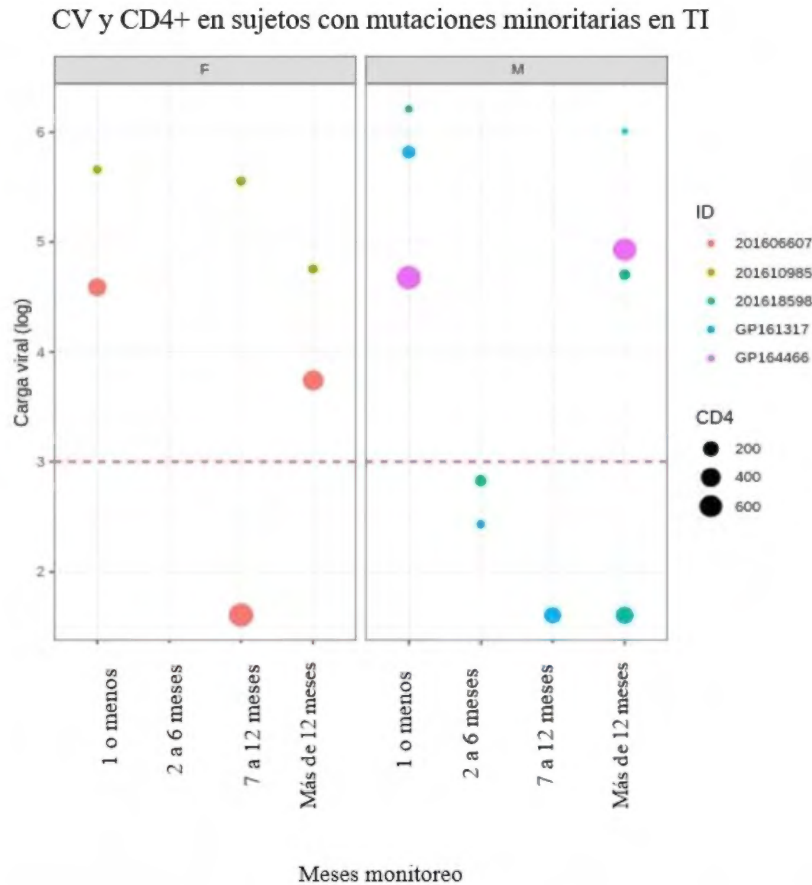


Figura 23. Distribución y correlación entre los monitoreos de la carga viral y los Linfocitos T CD4+ en sujetos con mutaciones minoritarias asociadas a resistencia en la transcriptasa inversa.

Entre las 5 muestras que presentaron mutaciones mayores a inhibidores de la transcriptasa inversa, 2 eran de sexo femenino y 3 de sexo masculino. Del total de 5 sujetos, 4 presentaron conteo de Linfocitos T CD4+ menores a 500 células/ μ l y 1 sujeto se mantuvo con valores mayores a 500 células/ μ l. En cuanto a la carga viral, 2 sujetos no llegaron a valores menores a 1000 copias/ml durante al menos 12 meses de seguimiento.

CAPITULO IV

DISCUSSION

Datos clínicos y demográficos

La mediana de edad de los sujetos del estudio indica que los hombres acuden a las instalaciones de Salud para su diagnóstico inicial con edad menor (25 años) en comparación con las mujeres (30 años). Debido a que ICGES se localiza en la ciudad de Panamá y fue el lugar de reclutamiento de sujetos del estudio FID14-033, se esperaba que la mayoría de los participantes residieran en esta región con 87.18% (n=68). No se observó una diferencia marcada en la distribución de grupos de riesgo entre heterosexuales y homosexuales con 48.10% (n=38) y 46.84% (n=36), respectivamente.

Amplificación de ARN para la proteasa, transcriptasa inversa e integrasa

Se obtuvieron amplificadores de las 78 muestras con la metodología de fragmento parcial para la amplificación de la transcriptasa inversa y proteasa. Sin embargo, para la integrasa se lograron amplificar 57/78 muestras, 21/78 no fueron amplificadas exitosamente.

Entre las causas posibles consideramos la antigüedad de las muestras de plasma las cuales a pesar de mantenerse congeladas a -80°C , no se contaba con un registro de las veces que las muestras fueron descongeladas previamente o si durante los años de almacenamiento, fueron trasladadas a otros congeladores con distinta temperatura de congelación. El volumen de muestra también fue un factor que influyó en la extracción del ARN debido a que algunas de las alícuotas de plasma

no contaban con los 500 µl de volumen necesarios para realizar la extracción con el kit comercial. La integridad del plasma en algunas muestras no era óptima ya que algunas alícuotas de plasma con EDTA presentaban coágulos de fibrina, estaban lipémicas o hemolizadas. Otro factor a considerar son los reactivos utilizados por los autores Chrysostomou y otros, que han descrito previamente el protocolo para la amplificación del fragmento completo del VIH. Estos autores estandarizaron la metodología utilizando la enzima Super Script IV RT-PCR One Step (Thermo Fisher) que contiene la ezDNasa la cual ayuda a eliminar cualquier residuo de ADN genómico proveniente de la extracción de ARN, sin embargo, esta enzima no fue utilizada en este estudio. Estos factores y cambios realizados en la metodología, pudieron afectar la amplificación satisfactoria del total de muestras analizadas.

Mapas de cambio de aminoácidos

Con respecto a los mapas de cambio de aminoácidos para cada fragmento, los resultados fueron los esperados debido a que todos los sujetos del estudio eran pacientes naïve que no habían tomado tratamiento antirretroviral previo a su diagnóstico inicial.

Análisis de cuasiespecies virales presentes en más del 5% de las lecturas en una posición asociada a resistencia.

En cuanto a la proteasa se identificaron mutaciones menores o accesorias como I93L, V77I y la L63P, estas están ubicadas en una región lejana del sitio activo de la proteasa asociado al inhibidor, por lo tanto no causan resistencia por si solas ⁷⁸.

En la transcriptasa inversa se identificó una muestra con la mutación asociada a resistencia a inhibidores nucleosídicos K103N la cual ha sido descrita en estudios previos en Panamá y otros países de la región y es considerada una mutación prevalente en sujetos naïve ^(13,79,80,81). La mutación K103N se caracteriza por causar alta resistencia a los inhibidores no nucleosídicos de la transcriptasa inversa, como Efavirenz (EFV) y Nevirapina (NVP).

La mutación discriminatoria K70E se identificó en una muestra, este cambio causa potencial resistencia Emtricitabina (FTC) y Lamivudina (3TC) y resistencia baja frente a Tenofovir (TDF).

La detección de variantes minoritarias con evidencia de las mutaciones K103N y K70E en pacientes con diagnóstico reciente afectan negativamente la efectividad del esquema de tratamiento base utilizado en Panamá, el cual está basado en ATRIPLA (formulado como Efavirenz (EFV) + Emtricitabina (3TC) y Tenofovir (TDF)). Este esquema ha sido utilizado en Panamá desde el año 1999 y continúa siendo el indicado en el país en población adulta con la tuberculosis, en el sistema

penitenciario en el país y personas que presenten contraindicaciones frente al esquema TLD ⁸².

Es importante mencionar que la mutación K70E también podría afectar la efectividad del tratamiento TLD de primera línea basado en Tenofovir (TDF) + Lamivudina (3TC) + Dolutegravir (DTG) utilizado en Panamá desde el año 2019, esquema con un enfoque adicional frente a los inhibidores de integrasa ⁸³.

En integrasa se identificaron mutaciones accesorias (polimórficas y no polimórficas) que no causan mayores cambios por sí solas en la susceptibilidad de los esquemas de tratamiento para esta enzima como E157Q y la Q95K, estudios previos indican su presencia en pacientes que no han tomado tratamiento previo en porcentajes \geq 20% de la población viral. Estas mutaciones en conjunto con la mutación mayor N155H potencian su efecto inhibitor, sin embargo, esta no fue identificada en este estudio. Otra mutación polimórfica identificada fue la L74IM la cual potencia su efecto inhibitor con la mutación Q148H la cual tampoco fue encontrada. Por último, detectamos la mutación polimórfica L74IM y la mutación accesorias V151I, que por sí solas no causan incremento en la resistencia frente a los inhibidores ⁸⁴.

Búsqueda de mutaciones minoritarias asociadas a fallo virológico luego de 12 meses de monitoreo <1%

Las mutaciones mayores y accesorias asociadas a los inhibidores de la transcriptasa inversa de acción nucleosídica y no nucleosídica: D67E, L74I, V75E1, F77L, T69D y N348I, P225H, V108I en conjunto con la mutación D69N conocida como análogo de Timidina (TAMs) fueron identificadas en un paciente. Estas mutaciones en conjunto causan resistencia intermedia a Efavirenz (EFV), resistencia baja a Tenofovir (TDF) y resistencia potencial a Emtricitabina (FTC), medicamentos que forman parte de los esquemas primarios ofrecidos a los pacientes naïve en Panamá. Estas mutaciones han sido descritas previamente como mutaciones transmitidas en sujetos con diagnóstico reciente, identificándose en mayor frecuencia la mutación D67NE, T69D, P225H y V108I ⁸⁵.

De forma similar, en otro participante se identificó mutaciones asociadas a inhibidores de la transcriptasa inversa como D67E, L74IV, V75MEI, F77L, la mutación no nucleosídica P225H y la mutación T69N, todas estas mutaciones en conjunto causan resistencia baja a Tenofovir (TDF) y resistencia potencial a Lamivudina (3TC).

En cuanto a la búsqueda de TAMs en este estudio, se identificaron las mutaciones M41L, D67N y L210W en un total de 7 sujetos pero no presentaron cambios significativos en las resistencias frente a los inhibidores de la transcriptasa inversa.

Se observó resistencia baja a Zidovudina (AZT), antirretroviral que forma parte de los esquemas de tratamiento de segunda línea en Panamá en sujetos que presentan fallo virológico. Estudios previos sugieren que la combinación de mutaciones TAMs como M41L, L210W y T215Y causan resistencia cruzada a Tenofovir, disminuyendo la sensibilidad del virus frente a este antirretroviral. Sin embargo, no identificamos la mutación T215Y en las muestras analizadas y tampoco identificamos una combinación de mutaciones análogos de timidina en un solo sujeto ⁸⁶.

Detectamos mutaciones minoritarias asociadas a resistencia la proteasa: M46I/L la cual no disminuyen la sensibilidad al tratamiento por si sola, sin embargo, se detectó la mutación G48V asociada a resistencia intermedia a Atazanavir (AZT) y la I54T asociada a resistencia baja a Lopinavir (LPV/r), en el mismo paciente. Sin embargo, estos tratamientos antirretrovirales no forman parte del esquema de primera línea utilizado en Panamá por lo que su efecto a largo plazo en la resistencia frente a los inhibidores de la proteasa en esta población podría ser objeto de futuros estudios.

No se identificaron mutaciones asociadas a inhibidores de integrasa, específicamente frente a Dolutegravir (DTG), medicamento que forma parte del esquema TLD utilizado en el país. Las 3 mutaciones identificadas, a pesar de no ser mutaciones mayores, la presencia de la V151I causa resistencia potencial a Raltegravir (RAL) y Elvitegravir (EVG) los cuales no forman parte de los esquemas primarios de VIH en Panamá. Sin embargo, el Raltegravir es comúnmente utilizado

en pacientes embarazadas con diagnóstico reciente de VIH en el tercer trimestre, labor de parto o que no hayan tomado tratamiento antirretroviral previo.

En otro sujeto identificamos mutaciones en porcentajes ≤ 1 en los inhibidores de la transcriptasa inversa como D67E, L74I, V75E, F77L, T69DN, N348I, P225H y la V108I y la integrasa la V151I, siendo las mutaciones frente a los inhibidores de la integrasa las causantes de los mayores cambios en la susceptibilidad del virus frente a los antirretrovirales. Este sujeto presentó cambios en resistencia potencial baja frente a Emtricitabina (FTC) y Lamivudina (3TC), resistencia baja a Zidovudina (AZT) y Tenofovir (TDF), resistencia intermedia a Abacabir (ABC), Doravirina (DOR) y Efavirenz (EFV) y resistencia alta a Nevirapina (NVP).

Implicaciones y potencial de la secuenciación masiva por Illumina para el genotipaje de VIH

En cuanto a las posiciones polimórficas identificados con la metodología Sanger, se observó un 100% de concordancia con la metodología de Illumina para la proteasa. Sin embargo, se identificaron en 5 sujetos mutaciones minoritarias (≤ 1 % y ≥ 5) que podrían considerarse como causantes de posible fallo virológico. Adicionalmente, al analizar la carga viral y la cuantificación de Linfocitos T CD4+ durante los 12 meses posteriores a su diagnóstico inicial, 3 participantes del sexo femenino mantuvieron sus niveles de carga viral mayores a 1000 copias/ml en donde solo un sujeto logró obtener valores menores en uno de sus últimos

monitoreos (Ver Figura 15). En cuanto a los dos sujetos de sexo masculino, uno sí logró valores menores a 1000 copias/ml luego de 6 meses de monitoreo. El segundo no logró alcanzar valores de carga viral menores a 1000 copias/ml sino hasta su último monitoreo.

Por otra parte, en cuanto a los valores de cuantificación de Linfocitos T CD4+ se observó una mejor distribución en 2 de 3 sujetos de sexo femenino con valores aproximados de 400 células/ml en donde un sujeto de sexo femenino mantuvo valores de Linfocitos T CD4+ en 200 células/ml. Comparando estos hallazgos con los 2 sujetos de sexo masculino, ambos mantuvieron valores aproximados a 200 células/ml durante los 12 meses de monitoreo, en donde uno presentó valores aproximados a 400 células/ml a partir de los 7 meses de monitoreo.

Los hallazgos para los polimorfismos identificados para la transcriptasa inversa presentaron un 89.8% de concordancia con 53/59 polimorfismos identificados mediante la metodología de Illumina. Los 3 polimorfismos no identificados podrían ser consecuencia de la baja amplificación de los productos en esa región debido a la presencia de ARN fragmentado obtenido de las muestras o en el proceso de secuenciación como los errores enzimáticos y sobre posición de grupos de secuencias, los cuales han sido descritos previamente ⁸⁷. Sin embargo, se identificaron mutaciones minoritarias asociadas a resistencia frente a los inhibidores de la transcriptasa inversa en porcentajes ≤ 1 y ≥ 5 en la población viral. En cuanto a la distribución de la carga viral, los 3 sujetos de sexo masculino presentaron mejor

evolución alcanzando valores menores a 1000 copias/ml (Ver Figura 16). En la distribución del conteo de Linfocitos T CD4+, no se observó una diferencia marcada entre sujetos del sexo femenino y masculino ya que en general presentaron valores < a 500 copias/ml a lo largo de los 12 meses de monitoreo. Solo 1 sujeto de sexo masculino, logró obtener valores de CD4+ mayores a 600 células/ml.

Estudios previos sugieren que aquellos pacientes con diagnóstico reciente que iniciaban la terapia antirretroviral temprana, presentan mayor probabilidad de mejorar sus niveles de CD4+ a lo largo del tiempo en comparación con aquellos que iniciaban la TAR de manera tardía ⁸⁰. Sin embargo, con este estudio pudimos demostrar mediante evidencia científica que la presencia de mutaciones en baja frecuencia podrían ser un factor que impacta la efectividad de los esquemas de primera línea en sujetos que no han tomado tratamiento antirretroviral previo, como ha sido reportado en otros estudios ⁸⁸. A pesar de contar con una prueba de resistencia inicial y comenzar el tratamiento antirretroviral a tiempo, la presencia de estas mutaciones no detectadas podrían estar afectando negativamente la evolución del sujeto infectado, pasando por posibles cambios en su esquema de tratamiento sin conocer la causa base del fallo virológico. Una de las limitaciones de este estudio fue no contar con información referente a la adherencia de estos sujetos al tratamiento lo cual también podría ser un factor causante de fallo virológico. Otra limitante fue no poder realizar una encuesta adicional a los sujetos de estudio para conocer sus inquietudes o inconvenientes al momento de la toma del tratamiento, ya que factores como los efectos adversos y desabastecimiento son muy importantes al considerar una falla en la efectividad del mismo.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y

RECOMENDACIONES

Conclusiones

- Nuestro estudio es la primera evaluación realizada en sujetos naïve en población adulta en Panamá analizando de manera completa el gen pol del VIH, incluyendo las 3 enzimas en las cuales la terapia antirretroviral está basada (transcriptasa inversa, proteasa e integrasa).
- Detectamos mutaciones mayores y menores asociadas a resistencia frente a los Inhibidores de la proteasa, transcriptasa inversa e integrasa en valores $\leq 1\%$ y $\geq 5\%$, no detectados en su prueba de genotipaje inicial.
- Identificamos una causa del fallo virológico presentado en 19 sujetos analizados en este estudio, en los cuales 5/19 presentaron mutaciones asociadas a inhibidores de la proteasa, 11/19 con mutaciones asociadas a resistencia de la transcriptasa inversa y 3/19 con mutaciones menores de vigilancia epidemiológica asociadas a inhibidores de la integrasa.
- Determinamos que la probabilidad de que un sujeto naïve con mutaciones asociadas a resistencia desarrolle fallo virológico fue de 1.4224
- Comparamos y evaluamos la especificidad de la metodología de próxima generación (NGS) Illumina con la metodología de Sanger para la región de la proteasa y transcriptasa inversa del VIH-1, obteniendo porcentajes de concordancia mayores al 90% entre ambas metodologías.

Recomendaciones

- Realizar una encuesta a los sujetos del estudio para conocer la adherencia y disponibilidad del tratamiento durante los meses del estudio.
- Utilizar los mismos reactivos de los autores de la metodología para amplificar el fragmento completo del gen pol del VIH podría mejorar el número de amplificadas, incrementando el porcentaje de amplificaciones satisfactorias para este fragmento.
- Realizar una prueba de genotipo con una muestra actual mediante la metodología de Illumina para conocer la evolución de las mutaciones de interés identificadas en este estudio.
- Desarrollar experimentos in vitro a realizarse en el ICGES que permitan determinar la resistencia o no causada por mutaciones no descritas previamente.

Referencias bibliográficas

1. Girard MP, Osmanov S, Assossou OM, Kieny MP. Human immunodeficiency virus (HIV) immunopathogenesis and vaccine development: A review. *Vaccine*. 2011;29(37):6191-6218. doi:10.1016/j.vaccine.2011.06.085
2. UNAIDS. Global HIV Statistics 2020. *End AIDS epidemic*. 2020;(June):1-3. <https://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>
3. B T, E S, F M, S H. The Challenge of HIV-1 Subtype Diversity Barbara. 2015;21(1):1-15. doi:10.1056/NEJMra0706737.The
4. Tang R, Yu Z, Ma Y, et al. Genetic source completeness of HIV-1 circulating recombinant forms (CRFs) predicted by multi-label learning. *Bioinformatics*. 2020;(October):1-9. doi:10.1093/bioinformatics/btaa887
5. Victoriano AFB, Okamoto T. Transcriptional Control of HIV Replication by Multiple Modulators and Their Implication for a Novel Antiviral Therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2012;28(2):125-138. doi:10.1089/aid.2011.0263
6. Hemelaar J. Implications of HIV diversity for the HIV-1 pandemic. *J Infect*. 2013;66(5):391-400. doi:10.1016/j.jinf.2012.10.026
7. Sluis-Cremer N, Wainberg MA, Schinazi RF. Resistance to reverse transcriptase inhibitors used in the treatment and prevention of HIV-1 infection. *Future Microbiol*. 2015;10(11):1773-1782. doi:10.2217/fmb.15.106
8. Francesco R. Simonettia b and MFK aHIV. Review: influence of ART on HIV genetics. *Curr Opin HIV AIDS*. 2015;8(11):2523-2527. doi:10.1097/00001756-199707280-00021

9. Luan H, Han X, Yu X, et al. Dual Infection Contributes to Rapid Disease Progression in Men Who Have Sex with Men in China. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2017;75(4):480-487. doi:10.1097/QAI.0000000000001420
10. Abram ME, Ferris AL, Das K, et al. Mutations in HIV-1 Reverse Transcriptase Affect the Errors Made in a Single Cycle of Viral Replication. *J Virol.* 2014;88(13):7589-7601. doi:10.1128/JVI.00302-14
11. ONUSIDA. ESTADÍSTICAS MUNDIALES SOBRE EL VIH. *UNAIDS.org.* Published online 2020:1-7.
12. Chamorro Mojica F, Rodriguez Díaz F, De Leon Richardson R. Factores Relacionados Con Actitudes Discriminatorias Hacia Personas Que Viven Con VIH En Panamá. *Rev Médica Panamá - ISSN 2412-642X.* 2018;1(38):2-9. doi:10.37980/im.journal.rmdp.2018491
13. Mendoza Y, Castillo Mewa J, Martínez AA, et al. HIV-1 Antiretroviral Drug Resistance Mutations in Treatment Naïve and Experienced Panamanian Subjects: Impact on National Use of EFV-Based Schemes. *PLoS One.* 2016;11(4):e0154317. doi:10.1371/journal.pone.0154317
14. Menéndez-Arias L. Molecular basis of human immunodeficiency virus type 1 drug resistance: Overview and recent developments. *Antiviral Res.* 2013;98(1):93-120. doi:10.1016/j.antiviral.2013.01.007
15. Musumeci D, Riccardi C, Montesarchio D. G-Quadruplex forming oligonucleotides as Anti-HIV agents. *Molecules.* 2015;20(9):17511-17532. doi:10.3390/molecules200917511

16. Wynn JE, Santos WL. HIV-1 drug discovery: Targeting folded RNA structures with branched peptides. *Org Biomol Chem.* 2015;13(21):5848-5858. doi:10.1039/c5ob00589b
17. Chen B. Molecular Mechanism of HIV-1 Entry. 2020;27(10):878-891. doi:10.1016/j.tim.2019.06.002.Molecular
18. Arts EJ, Hazuda DJ. HIV-1 antiretroviral drug therapy. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2(4). doi:10.1101/cshperspect.a007161
19. Kleinpeter AB, Freed EO. HIV-1 maturation: Lessons learned from inhibitors. *Viruses.* 2020;12(9). doi:10.3390/v12090940
20. Engelman AN, Singh PK. Cellular and molecular mechanisms of HIV-1 integration targeting. *Cell Mol Life Sci.* 2018;75(14):2491-2507. doi:10.1007/s00018-018-2772-5
21. Li Y, Xuan S, Feng Y, Yan A. Targeting HIV-1 integrase with strand transfer inhibitors. *Drug Discov Today.* 2015;20(4):435-449. doi:10.1016/j.drudis.2014.12.001
22. Ghosn J, Taiwo B, Seedat S, Autran B, Katlama C. Hiv. *Lancet.* 2018;392(10148):685-697. doi:10.1016/S0140-6736(18)31311-4
23. Kurapati KR V., Samikkannu T, Atluri VSR, Nair MPN. Cell cycle checkpoints and pathogenesis of HIV-1 infection: A brief overview. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 2015;26(1):1-11. doi:10.1515/jbcpp-2014-0018
24. Martín JB. HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. *Ge-Conservacion.* 2013;2013(4):146-164. doi:10.4415/ANN

25. Alcamí J, Coiras M. Inmunopatogenia de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29(3):216-226. doi:10.1016/j.eimc.2011.01.006
26. Young FE. The role of the FDA in the effort against AIDS. *Public Health Rep*. 1988;103(3):242-245.
27. Melhuish A, Lewthwaite P. Natural history of HIV and AIDS. *Med (United Kingdom)*. 2018;46(6):356-361. doi:10.1016/j.mpmed.2018.03.010
28. OMS, OPS. *Directrices Unificadas Sobre El Uso de Los Antirretrovirales Para El Tratamiento y La Prevención de La Infección Por El VIH.*; 2016. <http://bit.ly/2Dv3d55q>
29. Lu D-Y, Wu H-Y, Yarla NS, Xu B, Ding J, Lu T-R. HAART in HIV/AIDS Treatments: Future Trends. *Infect Disord - Drug Targets*. 2018;18(1):15-22. doi:10.2174/1871526517666170505122800
30. MINSA Panama. Normas para el manejo terapéutico de las personas con VIH en la república de Panamá. 2011;53(9):111. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
31. Gu SX, Xiao T, Zhu YY, Liu GY, Chen FE. Recent progress in HIV-1 inhibitors targeting the entrance channel of HIV-1 non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor binding pocket. *Eur J Med Chem*. 2019;174:277-291. doi:10.1016/j.ejmech.2019.04.054
32. Singh A, Verma AS, Kumar V. *HIV and Antiretroviral Drugs*. INC; 2020. doi:10.1016/b978-0-12-811710-1.00009-4

33. Jiang X, Huang B, Olotu FA, et al. Exploiting the tolerant region I of the non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI) binding pocket. Part 2: Discovery of diarylpyrimidine derivatives as potent HIV-1 NNRTIs with high Fsp3 values and favorable drug-like properties. *Eur J Med Chem.* 2020;(xxxx):113051. doi:10.1016/j.ejmech.2020.113051
34. Ribera E, Tuset M, Martín M, Del Cacho E. Características de los fármacos antirretrovirales. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011;29(5):362-391. doi:10.1016/j.eimc.2011.02.004
35. Garbelli A, Riva V, Crespan E, Maga G. How to win the HIV-1 drug resistance hurdle race: Running faster or jumping higher? *Biochem J.* 2017;474(10):1559-1577. doi:10.1042/BCJ20160772
36. Orta-Resendiz A, Rodriguez-Diaz RA, Angulo-Medina LA, Hernandez-Flores M, Soto-Ramirez LE. HIV-1 acquired drug resistance to integrase inhibitors in a cohort of antiretroviral therapy multi-experienced Mexican patients failing to raltegravir: A cross-sectional study. *AIDS Res Ther.* 2020;17(1):4-11. doi:10.1186/s12981-020-0262-y
37. Anstett K, Brenner B, Mesplede T, Wainberg MA. HIV drug resistance against strand transfer integrase inhibitors. *Retrovirology.* 2017;14(1):1-16. doi:10.1186/s12977-017-0360-7
38. Józwiak IK, Passos DO, Lyumkis D. Structural Biology of HIV Integrase Strand Transfer Inhibitors. *Trends Pharmacol Sci.* 2020;41(9):611-626. doi:10.1016/j.tips.2020.06.003

39. Trivedi J, Mahajan D, Jaffe RJ, Acharya A, Mitra D, Byrareddy SN. Recent Advances in the Development of Integrase Inhibitors for HIV Treatment. *Curr HIV/AIDS Rep.* 2018;17(1):63-75. doi:10.1007/s11904-019-00480-3
40. Wainberg MA, Zaharatos GJ. *Development and Transmission of HIV Drug Resistance*. 2nd ed. Elsevier Inc.; 2012. doi:10.1016/B978-1-4557-0695-2.00012-2
41. Karki R, Pandya D, Elston RC, Ferlini C. Defining “mutation” and “polymorphism” in the era of personal genomics. *BMC Med Genomics.* 2015;8(1):1-7. doi:10.1186/s12920-015-0115-z
42. Luo X lu, Mo L da, Su G sheng, et al. Incidence and types of HIV-1 drug resistance mutation among patients failing first-line antiretroviral therapy. *J Pharmacol Sci.* 2019;139(4):275-279. doi:10.1016/j.jphs.2018.11.016
43. World Health Organization. Drug Resistance: Part 1. *HIV/AIDS Antiretrovir Newsl.* 2001;(6):1-4. <https://www.who.int/3by5/en/Dec2001.pdf?ua=1>
44. Machnowska P, Meixenberger K, Schmidt D, et al. Prevalence and persistence of transmitted drug resistance mutations in the German HIV-1 Seroconverter Study Cohort. *PLoS One.* 2019;14(1):1-19. doi:10.1371/journal.pone.0209605
45. Rhee S-Y, Gonzales MJ, Kantor R, Betts BJ, Ravela J, Shafer RW. Mayor HIV-1 Drug Resistance Mutations. *Stanford HIVDB.* 2020;75(1):170-182. doi:10.1093/jac/dkz417
46. Clutter DS, Jordan MR, Bertagnolio S, Shafer RW. HIV-1 drug resistance and resistance testing. *Infect Genet Evol.* 2016;46:292-307. doi:10.1016/j.meegid.2016.08.031

47. Alejandro Afani S, Ana M Gallardo O. Resistencia a la terapia antiretroviral en la infección por virus de inmunodeficiencia humana. *Rev Chil Infectol.* 2011;28(5):461-469. doi:10.4067/S0716-10182011000600011
48. Blaise P, Clevenbergh P, Vaira D, Moutschen M, Dellamonica P. HIV resistance to antiretroviral drugs: Mechanisms, genotypic and phenotypic resistance testing in clinical practice. *Acta Clin Belg.* 2002;57(4):191-201. doi:10.1179/acb.2002.041
49. de Faria Romero Soldi G, Ribeiro IC, Ahagon CM, et al. Major drug resistance mutations to HIV-1 protease inhibitors (PI) among patients exposed to PI class failing antiretroviral therapy in São Paulo State, Brazil. *PLoS One.* 2019;14(10):1-15. doi:10.1371/journal.pone.0223210
50. Su Y, Chong H, Qiu Z, Xiong S, He Y. Mechanism of HIV-1 Resistance to Short-Peptide Fusion Inhibitors Targeting the Gp41 Pocket. *J Virol.* 2015;89(11):5801-5811. doi:10.1128/jvi.00373-15
51. Quashie PK, Mesplède T, Wainberg MA. HIV Drug Resistance and the Advent of Integrase Inhibitors. Published online 2013:85-100. doi:10.1007/s11908-012-0305-1
52. Shaw WH, Lin Q, Muhammad ZZBR, et al. Identification of HIV mutation as diagnostic biomarker through next generation sequencing. *J Clin Diagnostic Res.* 2016;10(7):DC04-DC08. doi:10.7860/JCDR/2016/19760.8140
53. Behjati S, Tarpey PS. What is next generation sequencing? *Arch Dis Child Educ Pract Ed.* 2013;98(6):236-238. doi:10.1136/archdischild-2013-304340

54. Chen X, Zou X, He J, Zheng J, Chiarella J, Kozal MJ. HIV drug resistance mutations (DRMs) detected by deep sequencing in virologic failure subjects on therapy from Hunan Province, China. *PLoS One*. 2016;11(2):1-12. doi:10.1371/journal.pone.0149215
55. Lu Y, Shen Y, Warren W, Walter R. Next Generation Sequencing in Aquatic Models. *Next Gener Seq - Adv Appl Challenges*. Published online 2016. doi:10.5772/61657
56. Brumme CJ, Poon AFY. Promises and pitfalls of Illumina sequencing for HIV resistance genotyping. *Virus Res*. 2017;239:97-105. doi:10.1016/j.virusres.2016.12.008
57. Fonager J, Larsson JT, Hussing C, Neess Engsig F, Nielsen C, Fischer TK. Identification of minority resistance mutations in the HIV-1 integrase coding region using next generation sequencing. *J Clin Virol*. 2015;73:95-100. doi:10.1016/j.jcv.2015.11.009
58. Illumina. Nextera XT DNA Library Prep Reference Guide. *Nextera XT DNA Libr Prep Ref Guid*. 2019;(May):Document # 15031942 v05.
59. Illumina I, Headquartered S, Diego, California USA. Using a PhiX Control for HiSeq® Sequencing Runs [Materiały informacyjne]. Published online 2016. <https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/technotes/hiseq-phix-control-v3-technical-note.pdf>
60. Zhou Z, Tang K, Zhang G, et al. Detection of minority drug resistant mutations in Malawian HIV-1 subtype C-positive patients initiating and on first-line antiretroviral therapy. *Afr J Lab Med*. 2018;7(1):1-9. doi:10.4102/ajlm.v7i1.708

61. Silver N, Paynter M, McAllister G, et al. Characterization of minority HIV-1 drug resistant variants in the United Kingdom following the verification of a deep sequencing-based HIV-1 genotyping and tropism assay. *AIDS Res Ther.* 2018;15(1):1-18. doi:10.1186/s12981-018-0206-y
62. Jonathan Z. Li M, Roger Paredes, MD P, Heather Ribaud P, Evguenia S. Svarovskaia P, Lars Ostergaard MP, Bernard Masquelier P. Minority HIV-1 Drug Resistance Mutations and the Risk of NNRTI-based Antiretroviral Treatment Failure : A Systematic Review and Pooled Analysis. *Nih-Pa.* 2012;305(13):1327-1335. doi:10.1001/jama.2011.375.Minority
63. Mzingwane ML, Tiemessen CT, Richter KL, Mayaphi SH, Hunt G, Bowyer SM. Pre-treatment minority HIV-1 drug resistance mutations and long term virological outcomes: is prediction possible? *Virology J.* 2016;13(1):1-9. doi:10.1186/s12985-016-0628-x
64. Clutter DS, Zhou S, Varghese V, et al. Prevalence of drug-resistant minority variants in untreated HIV-1-infected individuals with and those without transmitted drug resistance detected by sanger sequencing. *J Infect Dis.* 2017;216(3):387-391. doi:10.1093/infdis/jix338
65. Jorge AR, Jorge PB, Elsa GL, et al. Risk factors associated with virologic failure in HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy at a public hospital in Peru. *Rev Chil infectología.* 2014;30(1):1-9. doi:10.4067/S0716-10182013000100006.

66. Beck IA, Levine M, McGrath CJ, et al. Pre-treatment HIV-drug resistance associated with virologic outcome of first-line NNRTI-antiretroviral therapy: A cohort study in Kenya. *EClinicalMedicine*. 2020;18. doi:10.1016/j.eclinm.2019.100239
67. Basti B, Mahesh V, Bant D, Bathija G. Factors affecting antiretroviral treatment adherence among people living with human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome: A prospective study. *J Fam Med Prim Care*. 2017;6(3):482. doi:10.4103/2249-4863.222014
68. Altice F, Evuarherhe O, Shina S, Carter G, Beaubrun AC. Adherence to HIV treatment regimens: Systematic literature review and meta-analysis. *Patient Prefer Adherence*. 2019;13:475-490. doi:10.2147/PPA.S192735
69. Azevedo LN, Ximenes RA de A, Monteiro P, Montarroyos UR, Miranda-Filho D de B. Factors associated to modification of first-line antiretroviral therapy due to adverse events in people living with HIV/AIDS. *Brazilian J Infect Dis*. 2020;24(1):65-72. doi:10.1016/j.bjid.2019.11.002
70. Okuku MO, Dan-Jumbo A. Forgetfulness and Non-Adherence to Antiretroviral Therapy in Nigeria: A Review. *Asian J Adv Res Reports*. 2021;4(1):19-25. doi:10.9734/ajarr/2021/v15i130354
71. Costa JDM, Torres TS, Coelho LE, Luz PM. Adherence to antiretroviral therapy for HIV/AIDS in Latin America and the Caribbean: Systematic review and meta-analysis. *J Int AIDS Soc*. 2018;21(1). doi:10.1002/jia2.25066
72. Liégeois F, Vella C, Eymard-Duvernay S, et al. Virological failure rates and HIV-1 drug resistance patterns in patients on first-line antiretroviral treatment in semirural and rural Gabon. *J Int AIDS Soc*. 2012;15(2). doi:10.7448/IAS.15.2.17985

73. QIAGEN. QIAamp Viral RNA Mini Handbook. 2020;(July):26-29.
<http://www.google.de/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CCIQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.qiagen.com%2Fresources%2Fdownload.aspx%3Fid%3Dc80685c0-4103-49ea-aa72-8989420e3018%26lang%3Den&ei=DAEdVdyjHMafPZmDgWA&usg=AFQjCNE5vbTQc8ZGRg1yr4EJw-IVqQgYYw&b>
74. Chrysostomou AC, Topcu C, Stylianou DC, Hezka J, Kostrikis LG. Development of a new comprehensive HIV-1 genotypic drug resistance assay for all commercially available reverse transcriptase, protease and integrase inhibitors in patients infected with group M HIV-1 strains. *Infect Genet Evol.* 2020;81(December 2019):104243. doi:10.1016/j.meegid.2020.104243
75. Qiagen. QIAquick ® Spin Handbook QIAGEN. 2008;(March):19-20.
76. Beckma Coulter. Agencourt AMPure XP Protocol, PN B37419AA. *Econ Stud* 63(2) 97-109. 2013;(August):1-86. www.beckmancoulter.com
77. Illumina Inc. Illumina sequencing introduction. *Illumina Seq Introd.* 2017;(October):1-8.
https://www.illumina.com/documents/products/illumina_sequencing_introduction.pdf
78. Weikl TR, Hemmateenejad B. Accessory mutations balance the marginal stability of the HIV-1 protease in drug resistance. *Proteins Struct Funct Bioinforma.* 2020;88(3):476-484. doi:10.1002/prot.25826

79. Palma V, Leiva I, Durán M, et al. Prevalencia de resistencia transmitida a drogas antirretrovirales en pacientes con infección por VIH en Chile (2014-2018). *Rev Med Chil*. Published online 2020:1550-1557.
80. Soria J, Mugruza R, Levine M, et al. Pretreatment HIV Drug Resistance and Virologic Outcomes to First-Line Antiretroviral Therapy in Peru. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2019;35(2):150-154. doi:10.1089/aid.2018.0239
81. Arruda MB, Boulosa LT, Cardoso CC, et al. Brazilian network for HIV drug resistance surveillance (HIV-BresNet): A survey of treatment-naive individuals. *J Int AIDS Soc*. 2018;21(3):1-8. doi:10.1002/jia2.25032
82. Panama: modern antiretroviral treatment will be available. *AIDS Treat News*. 1999;320(8).
83. ONUSIDA. Estrategias diferenciadas de prestación de servicios de VIH en América Latina y el Caribe en tiempos de COVID-19. *Onusida*. Published online 2021.
84. Inzaule SC, Hamers RL, Noguera-Julian M, et al. Primary resistance to integrase strand transfer inhibitors in patients infected with diverse HIV-1 subtypes in sub-Saharan Africa. *J Antimicrob Chemother*. 2018;73(5):1167-1172. doi:10.1093/jac/dky005
85. Moscona R, Ram D, Wax M, et al. Comparison between next-generation and Sanger-based sequencing for the detection of transmitted drug-resistance mutations among recently infected HIV-1 patients in Israel, 2000-2014. *J Int AIDS Soc*. 2017;20(1):1-9. doi:10.7448/IAS.20.1.21846

86. Margot NA, Wong P, Kulkarni R, et al. Commonly transmitted HIV-1 drug resistance mutations in reverse-transcriptase and protease in antiretroviral treatment-naive patients and response to regimens containing tenofovir disoproxil fumarate or tenofovir alafenamide. *J Infect Dis.* 2017;215(6):920-927. doi:10.1093/infdis/jix015
87. Salk JJ, Schmitt MW, Loeb LA. Enhancing the accuracy of next-generation sequencing for detecting rare and subclonal mutations. *Nat Rev Genet.* 2018;19(5):269-285. doi:10.1038/nrg.2017.117
88. Alidjinou EK, Deldalle J, Hallaert C, et al. RNA and DNA Sanger sequencing versus next-generation sequencing for HIV-1 drug resistance testing in treatment-naive patients. *J Antimicrob Chemother.* 2017;72(10):2823-2830. doi:10.1093/jac/dkx232

Anexos

Anexo 1. Hoja de trabajo para amplificación de fragmento parcial del VIH.

TRANSCRIPCIÓN REVERSA					AMPLIFICACIÓN						
DENATURALIZACIÓN	(Vtotal=12µl)	Rxns	INCUBACIÓN RTmix	(Vtotal=20µl)	Rxns	PCR 1	(Vtotal=50µl)	Rxns	PCR nested	(Vtotal=50µl)	Rxns
H2O	1		H2O	1		H2O	35		H2O	35	
dNTP 10mM	2		Buffer Superscript IV	4		10X PCR buffer	5		10X PCR buffer	5	
RT3798	1		0,1M DTT	1		MgSO4 50mM	1.8		MgSO4 50mM	1.8	
			Rnase Inhib.	1		dNTP 10mM	1		dNTP 10mM	1	
			Superscript IV RT, 15U/ul	0.5		Primer JA269 10µM	1		Primer JA270 10µM	1	
						Primer JA272 10µM	1		Primer JA271 10µM	1	
REACTIVO POR TUBO	4		REACTIVO POR TUBO	8		Platinum Taq, 5U/µl	0.2		Platinum Taq, 5U/µl	0.2	
RNA, 10pg-5µg	8	-	Denaturalizado	12	-	REACTIVO POR TUBO	45		REACTIVO POR TUBO	45	
						cDNA	5	-	Producto de PCR-1	5	-
Programa de reacción de RT			Nota: Después de los 5 min de incubación debe realizarse una pausa ya sea programada en el termociclador o de forma manual para servir el RTmix.			Programa de reacción de PCR 1			Programa de reacción de PCR nested		
RT						PCR1			PCR2		
Por/Fecha						Por/Fecha			Por/Fecha		

Anexo 2. Hoja de trabajo para amplificación de fragmento completo del VIH.

TRANSCRIPCIÓN REVERSA				AMPLIFICACIÓN							
	INCUBACIÓN RTmix	(Vtotal=25µl)	Rxns	PCR 1	(Vtotal=50µl)	Rxns	PCR nested	(Vtotal=50µl)	Rxns		
	H2O	4.5		H2O	35		H2O	35			
RNA, 10pg-5µg	10	dNTP 10mM	2	10X PCR buffer	5		10X PCR buffer	5			
Nota: Servir el ARN e incubar a 65°C. Realizar una pausa manual o programada, colocar en bloque frío por 1 minuto y luego servir el RT mix.	Buffer Superscript IV	4		MgSO ₄ 50mM	1.8		MgCl ₂ 50mM	1.8			
	Primer 5575 (R) 20 pmol	2		dNTP 10mM	1		dNTP 10mM	1			
	Rnase Inhib.	1		Primer 1810 (F) 20 pmol	2		Primer 2006 (F) 20 pmol	1			
	Superscript IV RT, 15U/ul	0.5		Primer 5575 (R) 20 pmol	2		Primer 5264 (R) 20 pmol	1			
				Platinum Taq HIFI, 5U/µl	0.2		Platinum Taq, 5U/µl	0.2			
				REACTIVO POR TUBO	45		REACTIVO POR TUBO	45			
Programa de reacción de RT				Programa de reacción de PCR 1				Programa de reacción de PCR nested			
RT				PCR 1				PCR2			
Por/Fecha				Por/Fecha				Por/Fecha			