

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

**Facultad de Ciencias Químicas
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular**



**Variabilidad del virus de la inmunodeficiencia humana
tipo 1 (VIH-1).
Implicaciones en la aparición de variantes con
susceptibilidad reducida a inhibidores de la
retrotranscriptasa.**

Memoria presentada para optar al grado de
Doctor en Ciencias Químicas por:

Isabel Nájera Vázquez de Parga

Directores de la Tesis:

Dr. Cecilio López Galíndez

Servicio de Virología Molecular

Centro Nacional de Biología Celular y Retrovirus

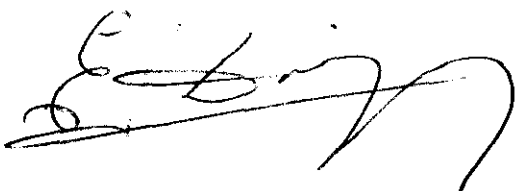
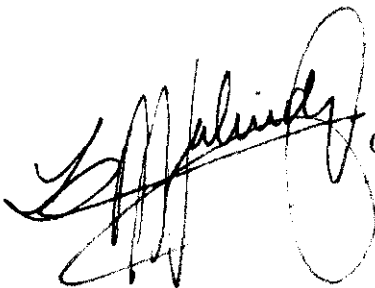
Instituto de Salud Carlos III

Dr. Esteban Domingo Solans

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa

Facultad de Ciencias

Universidad Autónoma de Madrid



Quiero expresar mi agradecimiento a aquellas personas que me han guiado y ayudado en la realización de este trabajo:

Agradezco a los doctores Cecilio López Galíndez, bajo cuya supervisión realicé el trabajo de caracterización de los aislados y Esteban Domingo Solans quien guió y supervisó el estudio de las cuasiespecies naturales su esfuerzo y ayuda.

A mi padre, el Dr. Rafael Nájera toda su ayuda y apoyo a lo largo de estos años.

Al Dr. Alvaro Martínez del Pozo por presentar este trabajo en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular para optar al grado de Doctor.

Agradezco muy especialmente a la Dra. Isabel Olivares toda su paciencia en mis comienzos en el laboratorio de bioquímica, así como a los demás componentes del Servicio de Virología Molecular, al Dr. José María Rojas, a la Dra. Sonsoles Sánchez Palomino, a Alicia Rodríguez y a Blanca González.

A Carmen, Ester, y en especial a Inés por su ayuda y apoyo en momentos difíciles y a Alex Vallejo entre otras muchísimas cosas por su ayuda en la escritura de esta Tesis.

A Angel del Pozo, Gabriel Jiménez, Pedro Aganzo y Antonio Zazo les agradezco el magnífico trabajo de fotografía y diseño realizado.

Quisiera agradecerles a la Dra Ascensión Bernal, a Angeles Pablos y a Marta Ortiz la guía de mis primeros pasos en el laboratorio de cultivos.

También quiero expresar mi agradecimiento al Dr Douglas Richman por su apoyo y ayuda en la realización de este trabajo.

A los futuros doctores Miguel Quiñones Mateu y Africa Holguín por todo el trabajo que hemos realizado en estrecha colaboración.

A las Dras Cristina Escarmís y Encarnación Martínez-Salas les agradezco su paciencia y ayuda.

Al Dr Juan Carlos Sáiz por su enorme ayuda al comienzo de la escritura de esta Tesis, a todos los compañeros del laboratorio 201/303 del CBM y a Juan Lama del 206 por su ayuda.

Esta Tesis se ha realizado gracias a una beca Predoctoral del Instituto de Salud Carlos III en un proyecto concertado con Bristol-Myers Squibb.

ABREVIATURAS

α-APA:	α -anilino fenilacetamida
^{32}P:	Isótopo fósforo 32
^{35}S:	Isótopo azufre 35
3TC:	2'-desoxi-3'-tiacitidina, BCH189, Lamividina
A:	Alanina
aa:	Aminoácido
ADVP:	Adicto a drogas por vía parenteral
AmpliTaq:	DNA polimerasa de <i>Thermophilus Aquaticus</i>
ARV:	"AIDS associated retroviruses", retrovirus asociados con el SIDA, actualmente VIH
ATP:	Adenosina-5' - trifosfato
AZT:	3'-azido,3'-desoxitimidina, zidovudina, ZDV, Retrovir
BHAP:	Bis(heteroarilpiperazinas)
C:	Cisteína
CD4$^{+}$:	Linfocitos T que expresan la molécula CD4 en su superficie
CD8$^{+}$:	Linfocitos T que expresan la molécula CD8 en su superficie
cDNA:	DNA complementario de RNA
Ci:	Curio
CI$_{50}$:	Concentración de droga que inhibe la replicación vírica un 50%
CMSP:	Células mononucleares de sangre periférica
CRS:	Complejo relacionado con el SIDA
CTP:	Citosina-5'-trifosfato
D:	Acido aspártico
D4T:	2',3'-didesoxitimidina, Stavudina
Da:	Dalton
ddATP:	2',3'-didesoxiadenosina-5'-trifosfato
ddC:	2',3'-didesoxicitidina, Zalcitabina
ddCTP:	2',3'-didesoxicitidina-5'-trifosfato
ddG:	2',3'-didesoxiguanosina
ddGTP:	2',3'-didesoxiguanosina-5'-trifosfato
ddI:	2',3'-didesoxiinosina, Didanosina
ddNTP:	2',3'-didesoxinucleótido-5'-trifosfato
DDRA:	Detección de desapareamientos por digestión con RNasa A
ddTTP:	2',3'-didesoxitimidina-5'-trifosfato
DI$_{50}$:	Dosis infectivas 50, dosis víricas que inhiben la replicación celular un 50%
DNA:	Acido desoxirribonucleico
dNTP:	2'-desoxinucleótido-5' - trifosfato
Drogas L:	L-697,639; L697,661; L-696,229 (derivados de piridonas)
DTT:	Ditiotreitol
E:	Acido glutámico
ECP:	Efecto citopático
F:	Fenilalanina
FTC:	3'-fluoro-3'-desoxitimidina

G:	Glicina
gp120:	Glicoproteína de la envoltura de 120 KDa
gp160:	Glicoproteína de la envoltura de 160 KDa, precursor de las glicoproteínas gp41 y gp120
gp41:	Glicoproteína de la envoltura de 41 KDa
GTP:	Guanosina-5'-trifosfato
GuHCl:	Cloruro de guanidina
H:	Histidina
I:	Isoleucina
HEPT:	Hidroxietoximetilfeniltiotimina
Het:	Heterosexual
Hom:	Homosexual
HTLV-III:	"Human T-cell leukemia virus type III", virus linfotrópico humano tipo III, actualmente VIH
HTLV:	Virus linfotrópico humano
IL-2:	Interleuquina-2
K:	Lisina
L:	Leucina
M:	Metionina
N:	Asparagina
P:	Prolina
Q:	Glutamina
R:	Arginina
S:	Serina
T:	Treonina
V:	Valina
W:	Triptófano
Y:	Tirosina
IS:	Inductor de sincitios
KDa:	Kilo dalton
LA:	Linfoadenopatía
LAV:	"Lymphadenopathy associated virus", virus asociado a linfoadenopatía, actualmente VIH
LP:	Linfoadenopatía persistente
LTR:	"Long terminal repeat", zonas terminales repetidas
m.d.i:	Multiplicidad de infección
MOPS:	Acido (3-[N-morfolino]) propano sulfónico
NAN:	Inhibidores de la retrotranscriptasa no análogos de nucleósido
Nevirapina:	6,11-dihidro-11-ciclopropil-4-metildipirido[2,3-b2',3'-e]-[1,4] diazepin-6-ona, BI-RG-587
NFκβ:	Secuencia de 10 pb conservada implicada en la regulación de la expresión génica del VIH-1 o proteínas que se unen a dichos motivos
NIS:	No inductor de sincitios
p15:	Subunidad de la retrotranscriptasa de 15 KDa
p17/p18:	Nucleoproteína de la cápsida de 17/18 KDa
p24/p25:	Nucleoproteína de la cápsida de 24/25 KDa

p51:	Subunidad de la retrotranscriptasa de 51 KDa
p66:	Subunidad de la retrotranscriptasa de 66 KDa
p7:	Nucleoproteína de la cápsida de 7 KDa
p9:	Nucleoproteína de la cápsida de 9 KDa
pb:	Par(es) de bases
PBS:	"Primer binding site", sitio de unión del iniciador
PBS:	Solución salina tamponada con fosfatos
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG:	Poli(etil)énglicol
PI:	Primoinfección
pol:	Polimerización
poli(A):	Poli adenina
PTT:	"Poly purine track", fragmento de poli purinas
rATP:	Ribo adenina-5'-trifosfato
RNA:	Acido ribonucleico
RNA_m:	RNA mensajero
RNasa A:	Ribonucleasa A
RNasa H:	Ribonucleasa H
RNA_t:	RNA de transferencia
RRE:	"Rev responsive element"
RT:	Retrotranscriptasa, transcriptasa inversa
rUTP:	Ribouracil-5'-trifosfato
SBF:	Suero bovino fetal
SIDA:	Síndrome de la inmunodeficiencia adquirida
TAR:	"Transactivation response region"
TdT:	Desoxinucleotidiltransferasa
THF:	"Thymic humoral factor", factor humoral del timo
TIBO:	Tetrahydro-imidazo(4,5,1-jk)(1,4)-benzodiazepin-2(1H)-ona y-tiona
TTP:	Timidina-5'-trifosfato
u:	Unidad
UTP:	Uracilo-5'-trifosfato
VIF:	Virus de la inmunodeficiencia felina
VIH:	Virus de la inmunodeficiencia humana
VIH-1:	Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1
VIH-2:	Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 2
VIS:	Virus de la inmunodeficiencia del simio
VLA:	Virus de la leucemia aviar
VLB:	Virus de la leucemia bovina
VLM:	Virus de la leucemia murina

1. INTRODUCCION	1
1.1 RETROVIRUS Y VIH-1	2
1.1.1 <i>Retroviridae</i>	2
1.1.2 El virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 es el agente causal del síndrome de inmunodeficiencia adquirida	4
1.1.2.1 Progresión de la infección por el VIH	4
1.1.2.2 Estructura genómica del VIH-1	6
1.1.2.2.1 Genes estructurales	6
1.1.2.2.2. Genes reguladores	8
1.1.2.2.3 Genes accesorios	9
1.2 TRANSCRIPCION INVERSA Y RETROTRANSCRIPTASA DEL VIH	10
1.2.1 Proceso de transcripción inversa	10
1.2.2 La retrotranscriptasa del VIH-1	13
1.3 LA RETROTRANSCRITASA COMO DIANA DE TRATAMIENTOS FRENTE A LA INFECCION POR EL VIH	16
1.3.1 Inhibidores de la RT análogos de nucleósido	17
1.3.2 Inhibidores de la RT no análogos de nucleósido	21
1.4 DISMINUCION DE LA SUSCEPTIBILIDAD A INHIBIDORES DE LA RT	23
1.4.1 Inhibidores análogos de nucleósido	23
1.4.1.1 Resistencia a AZT	23
1.4.1.2 Resistencia a ddC	27
1.4.1.3 Resistencia a ddI	27
1.4.1.4 Resistencia a D4T	28
1.4.1.5 Resistencia a 3TC/FTC	28
1.4.2 Inhibidores no análogos de nucleósido	29
1.4.3 Reversión de la resistencia a AZT	32
1.5 VARIABILIDAD DEL VIH-1	33
1.5.1 Variabilidad genética	33
1.5.2 Variabilidad fenotípica	37
1.5.3 Variabilidad antigénica	39
1.5.4 La importancia de la variabilidad genética en el ciclo infectivo del VIH-1	39

1.6 OBJETIVOS	40
2. <u>MATERIALES Y METODOS</u>	42
2.1 MUESTRAS	43
2.2 AISLAMIENTO DEL VIH-1	47
2.3 REPLICACION DE AISLADOS DE VIH-1 EN CELULAS MT-2	47
2.4 PRODUCCION DE INOCULOS VIRICOS	47
2.5 TITULACION DE LOS INOCULOS VIRICOS	48
2.6 ENSAYOS DE SUSCEPTIBILIDAD A DROGAS	48
2.7 PASES SERIADOS DE AISLADOS RESISTENTES A AZT	48
2.8 METODO DE DETECCION DE DESAPAREAMIENTOS POR DIGESTION CON RIBONUCLEASA A	49
2.8.1 Obtención de RNA	50
2.8.2 Síntesis de ribosondas radiactivas	51
2.8.2.1 Preparación del plásmido para la síntesis de la ribosonda RT 5´	51
2.8.2.2 Preparación del plásmido para la síntesis de la ribosonda RT 3´	51
2.8.2.3 Transcripción <i>in vitro</i>	51
2.8.3 Hibridación de la ribosonda con el RNA muestra y digestión con RNasa A	52
2.8.4 Incorporación de radiactividad al marcador de peso molecular ϕ X174-Hae III	52
2.9 REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA Y SECUENCIACION CICLICA	53
2.9.1 Obtención de ácido desoxirribonucleico	53
2.9.2 Reacción en cadena de la polimerasa	53
2.9.3 Secuenciación cíclica de productos de PCR	54
2.10 CLONADO MOLECULAR	57
2.10.1 Clonado molecular de muestras de VIH-1	

amplificadas en células MT-2	57
2.10.1.1 Preparación del inserto y ligación	57
2.10.1.2 Transformación de bacterias competentes	57
2.10.1.3 Obtención de DNA de plásmidos en pequeña escala	58
2.10.2 Clonado molecular de VIH-1 procedente de CMSP	58
2.10.2.1 Obtención de DNA plasmídico en gran escala	58
2.10.2.2 Preparación de bacterias competentes	59
2.10.2.3 Preparación de inserto y vector y ligación de extremos cohesivos	59
2.10.2.4 Preparación de inserto con extremos romos por quinasación de iniciadores y posterior reparación de los extremos	59
2.10.2.5 Ligación de extremos romos y transformación de bacterias competentes	60
2.10.2.6 Muestreo de colonias recombinantes por hibridación con un oligonucleótido específico del inserto	60
2.10.2.7 Secuenciación de plásmidos	61
2.11 SOLUCIONES	62
2.12 MEDIOS DE CULTIVO DE BACTERIAS	62
2.13 OTROS PRODUCTOS	63
2.14 MICROSCOPIO	63
3. RESULTADOS	64
3.1 ESTUDIO DE VARIANTES DEL VIH-1 RESISTENTES A INHIBIDORES DE LA RT	65
3.1.1 Estudio de resistencia a AZT	66
3.1.1.1 Muestreo molecular por el método de detección de desapareamientos por digestión con RNasa A	66
3.1.1.2 Estudio de la población provírica global	69
3.1.1.2.1 Muestras analizadas tras su replicación en células MT-2	69
3.1.1.2.2 Muestras procedentes de CMSP sin cultivar	73
3.1.1.2 Susceptibilidad biológica a AZT	75
3.1.2 Estudio molecular de resistencia a ddI y a ddC	75
3.1.3 Estudio de la alteración genética debida al cultivo celular	76

3.2. ESTABILIDAD <i>in vitro</i> DEL GENOTIPO DE RESISTENCIA A AZT EN AUSENCIA DE DROGA	78
3.2.1 Estudio molecular de la población global	78
3.2.1.1 Muestreo molecular por el método de detección de desapareamientos por digestión con RNasa A	78
3.2.1.2 Estudio de la población provírica global	80
3.2.2 Estudio molecular de cuasiespecies	82
3.2.3 Estudio fenotípico de la población global	85
3.2.3.1 Efecto citopático y curso de la infección	85
3.2.3.2 Sensibilidad biológica a AZT	85
3.3 IDENTIFICACION DE VARIANTES DEL VIH-1 RESISTENTES A nevirapina, ddC y D4T EN PACIENTES SIN TRATAR O TRATADOS UNICAMENTE CON AZT	88
3.3.1 Estudio de la secuencia provírica global	88
3.3.1.1 Identificación de mutaciones de resistencia a nevirapina, ddC y D4T en la secuencia consenso de muestras procedentes de pacientes tratados con AZT	88
3.3.2 Susceptibilidad biológica a drogas	91
3.3.3.1 Susceptibilidad biológica a nevirapina	91
3.3.3.2 Susceptibilidad biológica a ddC	91
3.3.3.3 Susceptibilidad biológica a D4T	91
3.4 ESTUDIO DE CUASIESPECIES NATURALES DEL VIH-1	93
3.4.1 Identificación de mutantes relacionados con resistencia a AZT, ddC, 3TC/FTC, ddI y a inhibidores no análogos de nucleósido en muestras de pacientes no tratados con inhibidores de la RT	93
3.4.2 Identificación de mutantes relacionados con resistencia a AZT, ddC, 3TC/FTC, ddI, ddG y a inhibidores no análogos de nucleósido en muestras de pacientes tratados con AZT, ddC o ddI	94

3.4.3	Análisis del espectro de mutantes en cuasiespecies originales en muestras de pacientes no tratados con inhibidores de la RT	99
3.4.3.1	Muestra V75-5	99
3.4.3.2	Muestra 137	99
3.4.3.3	Muestra 49	100
3.4.4	Análisis del espectro de mutantes en la cuasiespecie original de un paciente tratado con AZT	100
3.4.4.1	Muestra D17/+20	100
3.4.5	Cuantificación de frecuencias de mutación	102
3.4.5.1	Muestras replicadas en células MT-2	102
3.4.5.1.1	Cuasiespecies replicadas en células MT-2	102
3.4.5.1.2	Poblaciones individuales	104
3.4.5.2	Muestras no adaptadas a cultivo	105
3.4.5.2.1	Cuasiespecies originales	105
3.4.5.2.2	Poblaciones individuales	105
4.	DISCUSION	107
5.	CONCLUSIONES	119
6.	BIBLIOGRAFIA	122

1. INTRODUCCION

1.1 RETROVIRUS Y VIH-1

1.1.1 *Retroviridae*

Según el "**dogma central de la biología molecular**" descrito por Watson y Crick en 1953, la transferencia de información en el mundo biológico transcurre de DNA a RNA y a proteína.

Sin embargo, en 1970 Temin y Mizutani (1970) y Baltimore (1970) establecieron que los retrovirus, virus con genoma RNA entonces denominados virus tumorales RNA, podían introducir su información en el DNA de la célula infectada. Esta reacción enzimática nueva se denominó transcripción inversa y está catalizada por la enzima *retrotranscriptasa (RT)*, presente en las partículas víricas. Posteriormente los virus tumorales RNA fueron rebautizados como retrovirus, indicando que la información genética va hacia atrás (retro) según el mencionado dogma.

El material genético de los retrovirus está en forma de RNA en la partícula vírica y en forma de DNA cuando se haya integrado en el DNA cromosómico de la célula hospedadora como provirus. Los viriones tienen una envoltura de naturaleza lipídica que deriva de la membrana plasmática en el proceso de salida de los viriones de la célula. Su diámetro es de ~ 100 nm y en su interior se encuentran dos moléculas idénticas de RNA de cadena simple de polaridad positiva y de 7 a 10 Kb (Coffin, 1992). Además del RNA genómico, hay una molécula de RNA de transferencia (RNAt) asociada al genoma, que actúa de iniciadora de la reacción de transcripción inversa. El DNA presenta dos zonas terminales repetidas ("Long terminal repeat", LTR) a ambos extremos de la molécula. Estas regiones contienen secuencias reguladoras de la transcripción, del procesamiento del RNA y de la integración del DNA vírico en el DNA cromosómico.

Las primeras clasificaciones de los retrovirus se basaron en la forma de la nucleocápsida, distinguiéndose partículas de tipo A, B, C o D. Posteriormente, los retrovirus se clasificaron en tres familias dependiendo de su patogenicidad: *Oncovirinae*, *Lentivirinae* y *Spumavirinae*. Actualmente, basándose en la secuencia nucleotídica y de aminoácidos, la familia *Retroviridae* se ha clasificado en siete géneros que a su vez están divididos en subgéneros (Tabla 1.1).

Como revisiones generales sobre retrovirus ver Weiss y cols, 1985; Fields y cols, 1990.

Tabla 1.1. Clasificación de la familia *Retroviridae* (ICTV, 1990)

Género	Subgénero	Ejemplos
Tipo B de mamífero		Virus del tumor mamario de ratón
Relacionado con VLM	Tipo C de mamífero Reticuloendoteliosis Tipo C de reptiles	Virus de la leucemia murina Virus de la reticuloendoteliosis aviar Retrovirus de víbora
Tipo D	Tipo D de primates Tipo D de ovinos	Retrovirus simio, Virus de mono Mason-Pfizer Retrovirus Jaagsiekte
Relacionado con VLA		Virus relacionados con la leucemia y sarcoma aviar
Spumavirus		Virus "espumosos" humano, simio y felino
HTLV-VLB		Virus linfotrópico humano, virus de la leucemia bovina
Lentivirus	Virus de la inmunodeficiencia primate (humana, simia) Lentivirus ovino y caprino Lentivirus equinos Lentivirus felinos Lentivirus bovinos	Virus de la inmunodeficiencia humana, virus de la inmunodeficiencia del simio Virus Visna/Maedi Virus de la anemia infecciosa equina Virus de la inmunodeficiencia felina Virus de inmunodeficiencia bovina

VLM: virus de la leucemia murina. VLA: virus de la leucemia aviar. HTLV: virus linfotrópico humano. VLB: virus de la leucemia bovina.

1.1.2. El virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 es el agente causal del síndrome de inmunodeficiencia adquirida

1.1.2.1 Progresión de la infección por el VIH

El primer indicio de que el síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA) podía estar causado por un retrovirus, data de 1983 cuando se aisló un retrovirus a partir del nódulo linfático de un paciente con linfadenopatía persistente (LP) (Barre-Sinoussi y cols, 1983). Este virus se incluyó inicialmente en el grupo de los ya conocidos retrovirus humanos HTLV (virus linfotrópicos humanos, "human T-cell leukemia virus") (Gallo y cols, 1983). Estudios posteriores identificaron que el causante del síndrome de inmunodeficiencia, aunque con la misma capacidad de infectar células que expresan la molécula CD4 que los HTLV, tiene ciertas características diferentes y lo denominaron, dependiendo de los autores, virus asociado a linfadenopatía ("lymphadenopathy-associated virus", LAV) (Montagnier y cols, 1984), virus de la leucemia de células T humanas tipo III (HTLV-III) (Gallo y cols, 1984) y retrovirus asociados con el SIDA (AIDS-associated retroviruses, ARV) (Levy y cols, 1984). Posteriormente se identificó que estos tres virus (LAV, HTLV-III y ARV) pertenecían al mismo grupo de retrovirus, lentivirus, y se acordó el nombre de virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). De hecho, el virus denominado HTLV-III por el grupo de Gallo resultó ser el mismo que el virus aislado y caracterizado por el grupo de Montaigner y denominado LAI (Wain-Hobson, 1991).

El VIH infecta células T activadas fundamentalmente, macrófagos o células de mucosas anales o uterinas. Los pasos implicados en la patogénesis del VIH propuestos se detallan a continuación (Fig. 1.1).

En los primeros días después de la primoinfección tiene lugar la replicación vírica en los nódulos linfáticos, detectándose niveles elevados de antigenemia p24 y de viremia en sangre, un descenso del número de linfocitos T que expresan el receptor CD4 en su superficie (células CD4+) y un aumento del número de células linfoides que expresan el receptor CD8 en su superficie (células CD8+) (sus niveles suelen permanecer ligeramente elevados durante los meses o incluso años siguientes a la primoinfección). Generalmente la viremia decae sustancialmente al cabo de un mes, probablemente como respuesta del sistema inmune ante la infección, mientras el número de células linfoides CD4+ suele aumentar hasta niveles cercanos a los normales en los 3 o 4 meses siguientes a la primoinfección. Después comienza la

disminución progresiva a lo largo de la infección persistente. En el momento en que el individuo desarrolla síntomas, el número de células CD4⁺ suele estar por debajo de 300 por μl y los niveles de VIH en la sangre suelen ser elevados en comparación con los detectados en la fase asintomática. También se aprecia un descenso en el número de células CD8⁺. Estas observaciones presagian el desarrollo de la enfermedad (revisión en Levy JA, 1993).

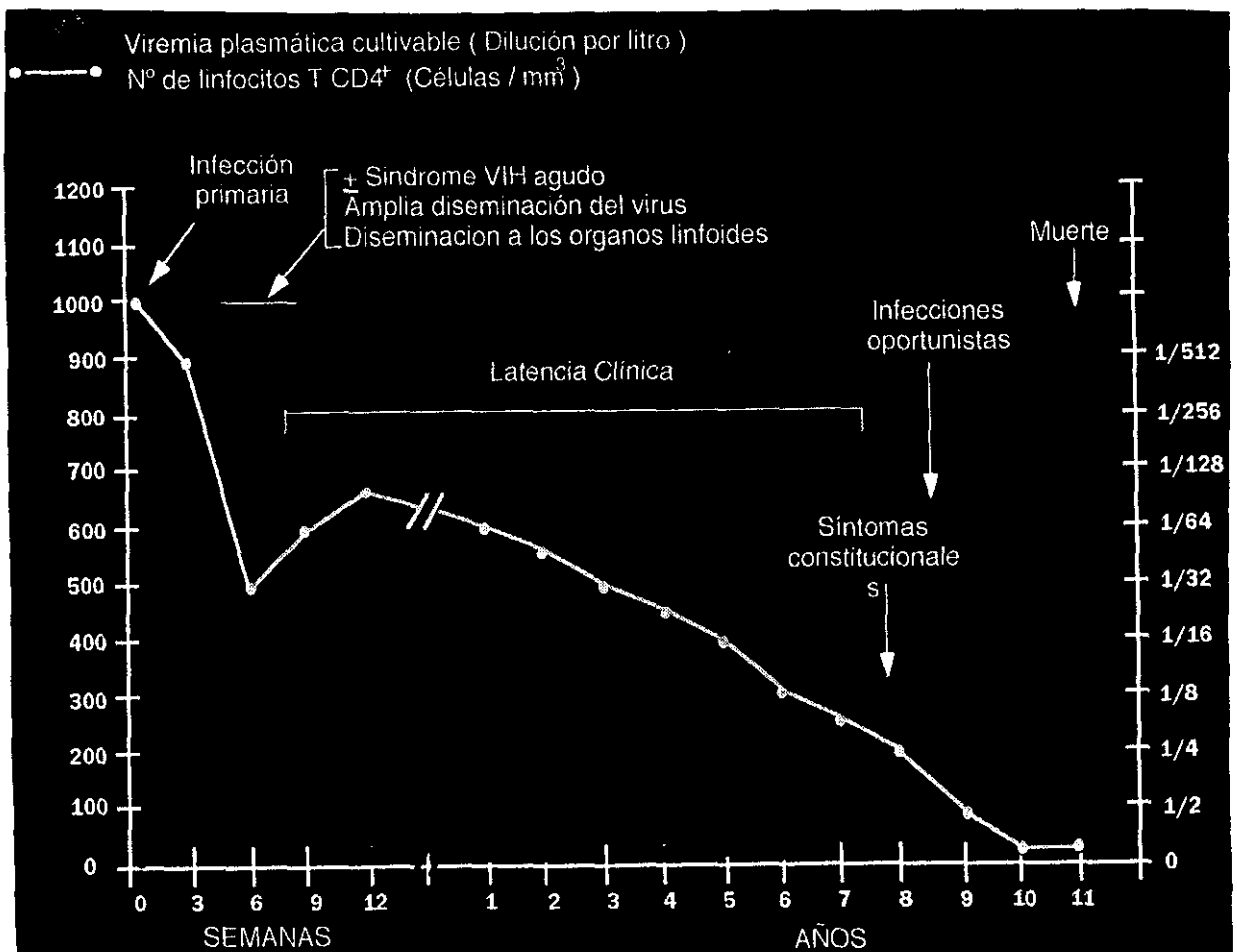


Figura 1.1 Pasos implicados en la patogénesis del VIH. La línea representa la viremia, determinada por los niveles de antígeno p24 libre en la sangre. Se indican los síntomas clínicos en relación con el nivel de la viremia plasmática a lo largo de la infección. El eje de ordenadas en el margen izquierdo indica los valores de viremia plasmática (dilución por litro). En el margen derecho se indican las células T CD4⁺ por mm³. (Adaptado de Fauci, 1993)

1.1.2.2 Estructura genómica del VIH-1

El virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) presenta una nucleocápsida compuesta por la proteína vírica p24, codificada por el gen *gag*. Dentro de la nucleocápsida se encuentran dos moléculas idénticas de RNA, asociadas a la proteína retrotranscriptasa (RT) y a las proteínas de la nucleocápsida p9 y p7. La cara interna de la membrana vírica está rodeada por la matriz, formada por la proteína p17 codificada por el gen *gag*. Esta matriz resulta necesaria para la incorporación de las proteínas de la envoltura a viriones maduros (Yu y cols, 1992). La superficie del virus está formada por espículas, trímeros o tetrámeros de las proteínas de la envoltura gp41 y gp120 (Weiss y cols, 1990) (Levy JA, 1993) (Fig 1.2.A).

Además de los genes estructurales *gag*, *pol* y *env*, comunes a todos los retrovirus, se han identificado genes reguladores, *tat*, *rev* y posiblemente *nef* y genes accesorios *vif*, *vpr*, *vpu*, *vpt*, y *tev* (Vaishnav y Wong-Staal, 1991) (Fig. 1.2.B).

1.1.2.2.1. Genes estructurales

El genoma de los retrovirus presenta tres genes estructurales: *gag*, *pol* y *env*.

El gen *gag* codifica las proteínas que integran la nucleocápsida: p7, p9, p17 (también denominada p18) y p24 (también denominada p25). Estas proteínas dirigen los procesos de ensamblaje de los componentes del virión así como su salida de la célula. Recientemente se ha descrito su implicación en el proceso de localización nuclear del complejo de preintegración en el DNA genómico de la célula hospedadora (von Schwedler y cols, 1994; Heinzinger y cols, 1994).

El gen *pol* codifica las enzimas víricas: la proteasa, la retrotranscriptasa y la integrasa. La proteasa provoca las rupturas proteolíticas que dan lugar a las proteínas maduras *gag* y *pol* durante la maduración. La retrotranscriptasa presenta dos dominios, uno con actividad polimerasa tanto RNA como DNA dependiente, y otro con actividad RNasa H. Esta enzima cataliza la reacción de transcripción inversa o retrotranscripción por la que el RNA vírico de polaridad positiva se copia a DNA de polaridad negativa, que se copia a su vez, para dar el DNA de doble banda. La integrasa presenta las actividades enzimáticas requeridas para catalizar la reacción de integración del DNA vírico en el cromosómico.

El producto del gen *env* tras su glicosilación (glicoproteína gp160) sufre una ruptura proteolítica dando lugar a dos proteínas (gp120 y gp41) que permanecen

unidas por interacciones no covalentes. Estas proteínas son procesadas por proteasas celulares, no víricas como ocurre con las proteínas anteriormente descritas. Su papel es unirse al receptor celular y permitir la entrada del virus en el citoplasma de la célula hospedadora. La gp41 es la proteína transmembrana y une la glicoproteína gp120 a la membrana vírica, aunque podría también estar implicada en la capacidad de formación de sincitios del virus (Cao y cols, 1994). La gp120 es la proteína más externa y en ella se encuentra el dominio que se une al principal receptor celular (CD4) (Freed y cols, 1989; Kozarsky y cols, 1989; Coffin, 1990^a; Willey y cols, 1994).

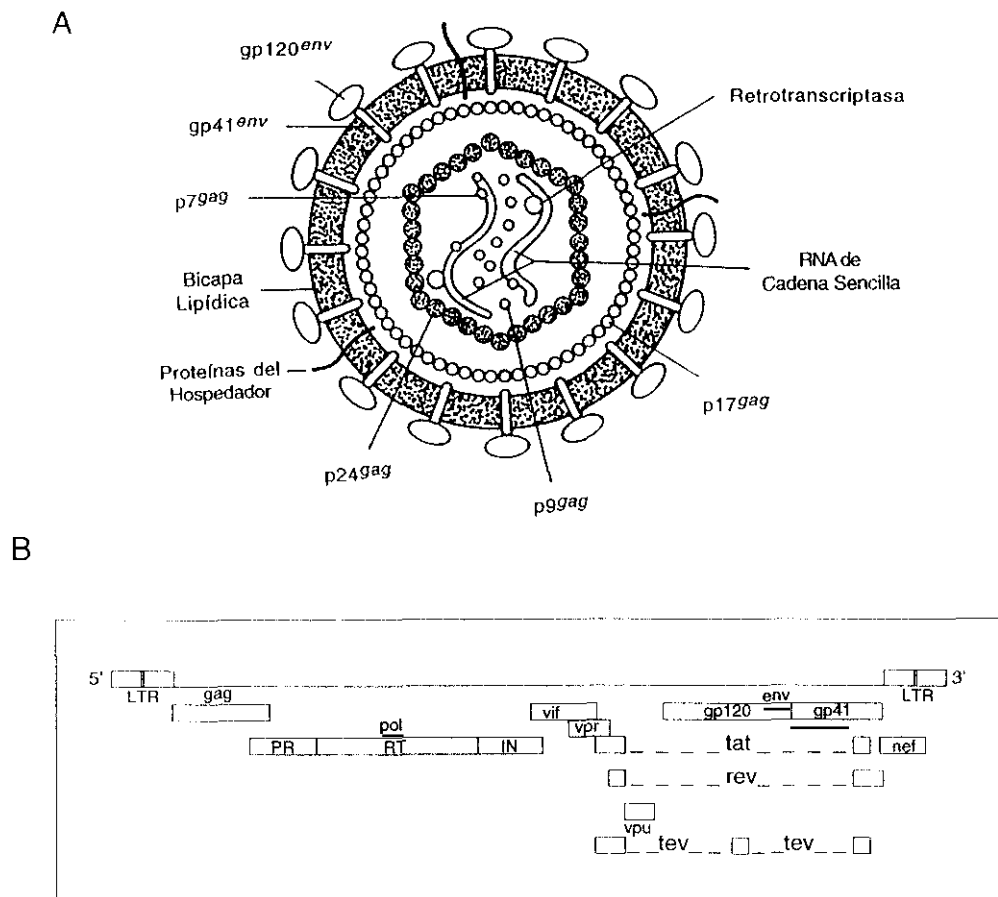


Figura 1.2. (A) Esquema del virión del VIH-1. Se identifican las proteínas de la envoltura (gp141 y gp120), las proteínas que integran la nucleocápsida (p7, p9, p17 y p24), así como el RNA diploide unido a la retrotranscriptasa (RT). (B) Esquema del genoma del VIH-1. El gen *gag* codifica las proteínas de la nucleocápsida, el gen *env* que codifica las proteínas de la envoltura y el gen *pol* codifica las proteínas víricas (proteasa, retrotranscriptasa e integrasa). Se señalan los genes reguladores (*tat*, *rev* y *nef*), los genes accesorios (*vif*, *vpu*, *vpr* y *tev*), así como las LTR.

1.1.2.2.2 Genes reguladores

El VIH-1 presenta tres genes reguladores: *tat*, *rev* y *nef*.

El gen *tat* codifica una proteína de 16 KDa que actúa como un potente transactivador (en más de 100 veces) de la expresión génica dirigida por las LTR y resulta esencial para la replicación vírica (Arya y cols, 1985; Sodroski y cols, 1985). En esta proteína se han identificado 3 dominios: *i*) la región amino terminal, de carácter ácido, *ii*) una región en la que hay presentes 7 residuos de cisteína y *iii*) una región compuesta por aminoácidos de carácter básico. En células infectadas esta proteína se ha localizado en el nucleolo. Es importante resaltar que actúa uniéndose al RNA vírico (al elemento TAR, "Transactivation responsive region" localizado en la región R de la LTR del RNA) y activa, junto con otros activadores de la transcripción de origen celular (como SP1 y NFκβ) la elongación de los transcritos formados durante la transcripción temprana (Arya y cols, 1985; Rosen y cols, 1985; Sodroski y cols, 1985; Feng y Holland, 1988; Berkhout y cols, 1989; Roy y cols, 1990). Esta proteína parece estar implicada en la estimulación de interleuquina 2 (IL-2), citoquina implicada en el crecimiento y diferenciación de los linfocitos T y B, células "natural Killer", monocitos y macrófagos (Westendorp y cols, 1994).

El gen *rev* codifica una proteína de 19 KDa que resulta esencial para la replicación vírica (Feinberg y cols; 1986, Sodroski y cols, 1986). Presenta un dominio compuesto por aminoácidos de carácter básico (Malim y cols, 1989^a) que permite la localización de la proteína en el nucleolo. Este dominio resulta esencial para la interacción de la proteína con su secuencia diana en el RNA (región RRE "rev-response element") localizada en el gen *env* y para su actividad (Malim y cols, 1989^b; Cochrane y cols, 1990). Otro dominio, rico en residuos de leucina, podría actuar como dominio activador y ser el responsable de la exportación de transcritos con la secuencia RRE fuera del núcleo. Esta proteína controla el transporte al citoplasma (Emerman y cols, 1989; Malim y cols, 1990), así como la estabilidad de los transcritos de VIH que codifican las proteínas estructurales que no han sufrido o que han sufrido un único proceso de procesamiento. Es decir, la proteína *rev* es la responsable del paso de la transcripción temprana a la transcripción tardía en que se dan RNAm largos (Felber y cols, 1989; Arrigo y Chen, 1991; Felber y Pavlakis, 1993).

El gen *nef* codifica una proteína citoplasmática de 25-27 KDa (Allen y cols, 1985; Guy y cols, 1990; Laurent y cols, 1990; Kaminchik y cols, 1991). Se encuentra unida a la cara interna de la membrana plasmática, probablemente por la molécula de

ácido mirístico que contiene. Esta proteína es necesaria para que la infección que da paso a la enfermedad sea persistente y regula de manera negativa los factores de transcripción NF- κ B y AP-1 (Bandrés y Ratner, 1994). Por otro lado, aunque la función exacta de esta proteína no ha sido establecida, su expresión parece alterar la expresión de la molécula CD4 (para una revisión ver Hovanessian, 1992).

1.1.2.2.3 Genes accesorios

Se han descrito 5 genes accesorios en el VIH-1: *vif*, *vpr*, *vpu*, *vpt* y *Tev/Tnv*.

El gen *vif* codifica una proteína de 23 KDa, localizada en el citoplasma de la célula infectada, llamada factor de infectividad del virión (*virion infectivity factor*, *vif*). Esta proteína está implicada fundamentalmente en la transmisión extracelular del virus; no así en la transmisión directa de célula a célula (Strebel y cols, 1987; Kan y cols, 1986; von Schwedler y cols, 1993) e incrementa la infectividad vírica durante la producción de las partículas víricas (Gabuza y cols, 1992).

El gen *vpr* codifica una proteína de 15 KDa en la que se distinguen zonas hidrofóbicas y zonas cargadas positivamente y está asociada al virión. Su papel es acelerar la replicación y el efecto citopático (ECP) del VIH-1 en células T CD4⁺, fundamentalmente en la etapa temprana de la infección (Ogawa y cols, 1989). Además, estimula en tres veces la expresión de genes marcadores unidos a LTR (Cohen y cols, 1990). Las proteínas *vpr* y *tat* tienen un efecto sinérgico en la expresión génica dirigida por LTR. A diferencia de *tat*, *vpr* estimula la expresión génica a través de promotores tanto celulares como víricos (Vaishnav y Wong-Staal, 1991) y está implicada en la localización nuclear del complejo de preintegración, necesaria para la integración del genoma vírico en el de la célula hospedadora (Heinzinger y cols, 1994).

El gen *vpu* codifica una proteína citoplasmática de 15-20 KDa que podría estar implicada en el ensamblaje del virión y en su posterior exportación al exterior de la célula (Strebel y cols, 1988; Terwilliger y cols, 1989; Klimkait y cols, 1990).

Se ha descrito un marco de lectura denominado *vpt* en todos los aislados de VIH-1 pero no en los de VIH-2 o VIS (Sonigo y cols, 1985). Su función no ha sido determinada.

La proteína *Tev/Tnv* de 28 KDa se ha descrito en células infectadas por el VIH-1 (Benko y cols, 1990; Salfeld y cols, 1990). Parece que podría tener actividades similares a las de *tat* y *rev*.

1.2 TRANSCRIPCIÓN INVERSA Y RETROTRANSCRIPTASA DEL VIH

1.2.1 Proceso de transcripción inversa

La transcripción inversa es el mecanismo biológico por el cual la información genética almacenada y transmitida como RNA se copia a DNA y puede introducirse en el DNA celular, persistiendo en el mismo (revisión en Skalka y Goff, 1993).

El proceso de transcripción inversa tiene lugar en el citoplasma (Ji y Loeb, 1992) y se lleva a cabo en varias etapas que se pueden esquematizar como sigue:

1. Síntesis de un DNA (-) corto llamado DNA (-) de parada brusca. Se sintetiza empleando el extremo 5' del RNA (+) como molde y un RNAt que actúa de iniciador uniéndose al extremo 3' de este fragmento.

2. El DNA (-) de parada brusca es translocado desde el extremo 5' del RNA genómico a una zona en el extremo 3' del RNA genómico que es complementaria al extremo 3' del DNA (-) de parada brusca.

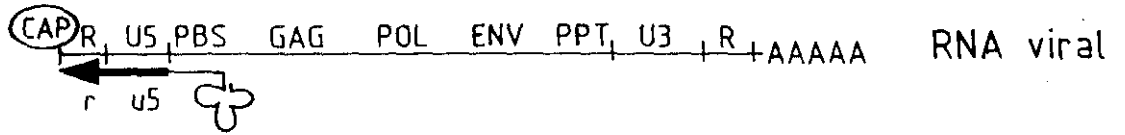
3. Continuación de la síntesis del DNA (-). Una vez que la síntesis de la cadena (-) ha pasado la posición del iniciador de la cadena (+), comienza la síntesis del DNA (+) con la formación de un DNA (+) de parada brusca.

4. En una segunda reacción de transferencia de la hebra de DNA, el extremo 3' del DNA (+) de parada brusca hibrida con secuencias complementarias en el extremo 3' del DNA (-). La síntesis de las dos hebras de DNA comienza de nuevo desde el extremo 3' de la hebra (-) del DNA a través de una región de doble cadena.

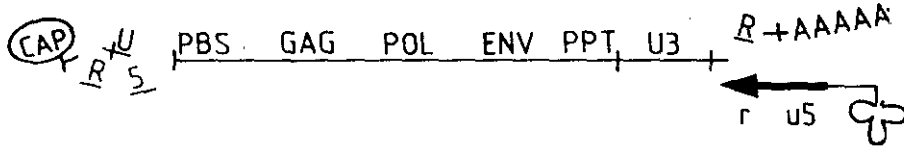
5. Después de la segunda reacción de transferencia, se completa la síntesis de las dos hebras de DNA.

(Revisión en Coffin, 1990^a; Telenitsky y Goff, 1993).

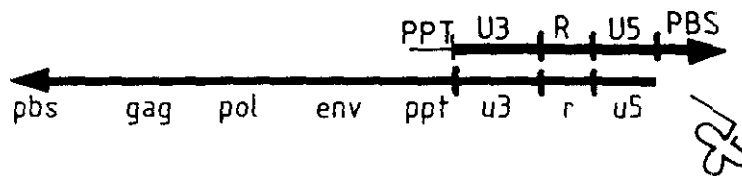
Paso 1



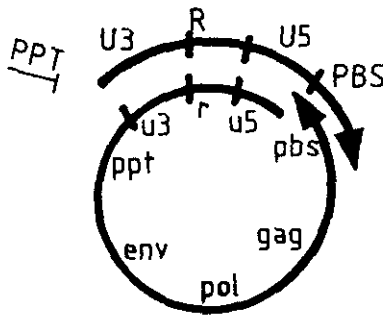
Paso 2



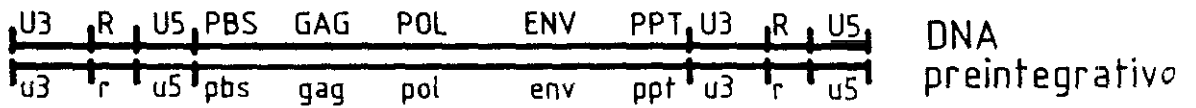
Paso 3



Paso 4



Paso 5



Escala

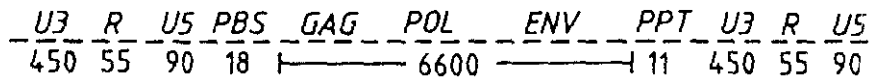


Fig.1.3 Proceso de síntesis de DNA preintegrativo a partir de RNA vírico mediado por la retrotranscriptasa. Las líneas y letras en negrita representan hebras de DNA; las líneas y letras en trazado más fino representan RNA. CAP representa 7-me-G cap, AAAAA representa poli(rA) y las cabezas de flecha representan los extremos 3' de hebras de DNA que van a ser elongadas. Las letras en mayúscula indican regiones de polaridad positiva; las letras minúsculas indican regiones de polaridad negativa.

Paso 1: Síntesis del DNA de polaridad negativa de parada brusca. La síntesis de DNA vírico catalizada por la RT del VIH se inicia *in vivo* por la acción del RNAT^{lys} que actúa como iniciador de la reacción (Araya y cols, 1980) cuyo extremo 3' se desdobra parcialmente y forma un dúplex de 18 pares de bases con el sitio de unión del iniciador ("primer binding site", PBS) del RNA vírico. Los 9 primeros nucleótidos de dicha secuencia son esenciales para que se dé el proceso (Rhim y cols, 1991). Esta reacción está catalizada por el dominio pol del heterodímero p66, al que se une el RNAT^{lys} con gran afinidad *in vitro*. Una vez unido el iniciador a la enzima, ésta sintetiza la hebra de DNA (-) en sentido 3'→5' respecto al genoma vírico hasta que alcanza la 7-me-G cap. Al cDNA así obtenido se le llama hebra (-) de parada brusca. Paso 2: Primera reacción de transferencia de hebra. El extremo 5' del RNA genómico se degrada por acción de la actividad RNasa H que presenta la enzima RT y el DNA (-) de parada brusca es translocado al extremo 3' del RNA genómico. La r del extremo 3' del DNA (-) de parada brusca es complementaria a la región 3'R del RNA genómico, lo que permite que continúe el proceso de la síntesis del DNA(-). La hebra de RNA del híbrido formado por el DNA (-) de parada brusca y el RNA genómico también es susceptible a la acción de la RNasa H, que puede degradar la hebra de RNA del híbrido R-r (excepto 7-17 residuos) por lo que también libera cualquier secuencia de RNA localizada hacia el extremo 3' de la región 3'R, como la región poli(A). Paso 3: Formación de la hebra de polaridad positiva de parada brusca. Aunque la síntesis de la hebra (-) hacia el sitio de unión del iniciador ("primer binding site", PBS), la síntesis de la hebra de DNA (+) de parada brusca comienza en el fragmento de polipurinas ("poly purine track", PPT) del RNA genómico, cerca del extremo 5' de la cadena de DNA (-). Esta región se crea por la degradación del RNA genómico catalizada por la RNasa H. Una vez que la síntesis de DNA (+) ha copiado una zona del iniciador RNAT, creando por tanto una copia del pbs en el extremo del DNA (+) de parada brusca, el iniciador es eliminado por acción de la RNasa H. Paso 4: La segunda reacción de transferencia de hebra. Se unen las copias complementarias de las secuencias del PBS del extremo 3' del DNA (+) de parada brusca con la hebra (-) que se está polimerizando. Paso 5: Síntesis completa del DNA preintegrativo. Tras la segunda reacción de transferencia de hebras, se completa la síntesis tanto de la hebra de DNA (+) como de la (-), utilizando cada una de ellas a la otra como molde.

1.2.2 La retrotranscriptasa del VIH

Las retrotranscriptasas son DNA polimerasas que puede emplear tanto RNA como DNA como molde para sintetizar DNA de doble cadena. En el virus de la inmunodeficiencia humana esta enzima está codificada por el gen *pol* en forma de polipéptido de 66 KDa que presenta actividad polimerasa (*pol*) y actividad ribonucleasa H (RNasa H). Tras la ruptura proteolítica del polipéptido, en la que se pierde el dominio RNasa H de una de las subunidades, la enzima se presenta en forma de heterodímero con una subunidad de 66 (p66) y otra de 51 KDa (p51) (Di Marzo Veronese y cols, 1986; Lightfoote y cols, 1986; Wondrak y cols, 1986). Este heterodímero parece que sólo presenta un sitio catalítico de polimerización (LeGrice y cols, 1991; Hostomsky y cols, 1992), un sitio catalítico ribonucleasa H (Johnson y cols, 1986) y un sitio de unión para el iniciador de la reacción (Barat y cols, 1989; Jacobo-Molina y Arnold, 1991). En la subunidad p66 se pueden distinguir dos dominios: el dominio RNasa H y el dominio de polimerización (Fig. 1.4). La disposición espacial de este último se asemeja a una mano derecha y se ha dividido en 4 subdominios denominados dedos, palma y pulgar. El cuarto une el dominio de polimerización y el RNasa H y se conoce con el nombre de subdominio de conexión. Los subdominios de la palma y de conexión consisten en una lámina β de 5 hebras y dos hélices α en un extremo. El pulgar consiste en 4 hélices α y el subdominio de los dedos está formado por una lámina β y 3 hélices α . Las 5 hebras de la lámina β del dominio de la palma están unidas a las de la lámina β localizadas en la base del dominio del pulgar que a su vez están unidas a la lámina β del subdominio de conexión (Fig. 1.3) (Kohlstaedt y cols, 1992; 1993; Jacobo-Molina y cols, 1993; Boyer y cols, 1994). La conformación del dominio de polimerización de la p66 es bastante diferente al de la p51 a pesar de tener la misma secuencia de aminoácidos. La p51 no presenta la cavidad que tiene la p66 y los aminoácidos implicados en la catálisis, D¹⁸⁵, D¹⁸⁶ y D¹¹⁰ (Larder y cols, 1987; Delarue y cols, 1990) están ocultos en la p51 por el plegamiento de la molécula (Koehstaedt y cols, 1993). La estructura terciaria es, sin embargo, muy parecida en ambas subunidades. El subdominio de los dedos está implicado en la unión del molde al final del iniciador. En el subdominio de la palma está localizado el centro catalítico y el subdominio del pulgar parece ser la zona de la enzima que está unida al híbrido DNA-RNA que se va formando en el primer paso de la síntesis del cDNA (Fig. 1.5). El subdominio de conexión une los dos dominios presentes en la p66 y el molde y el iniciador.

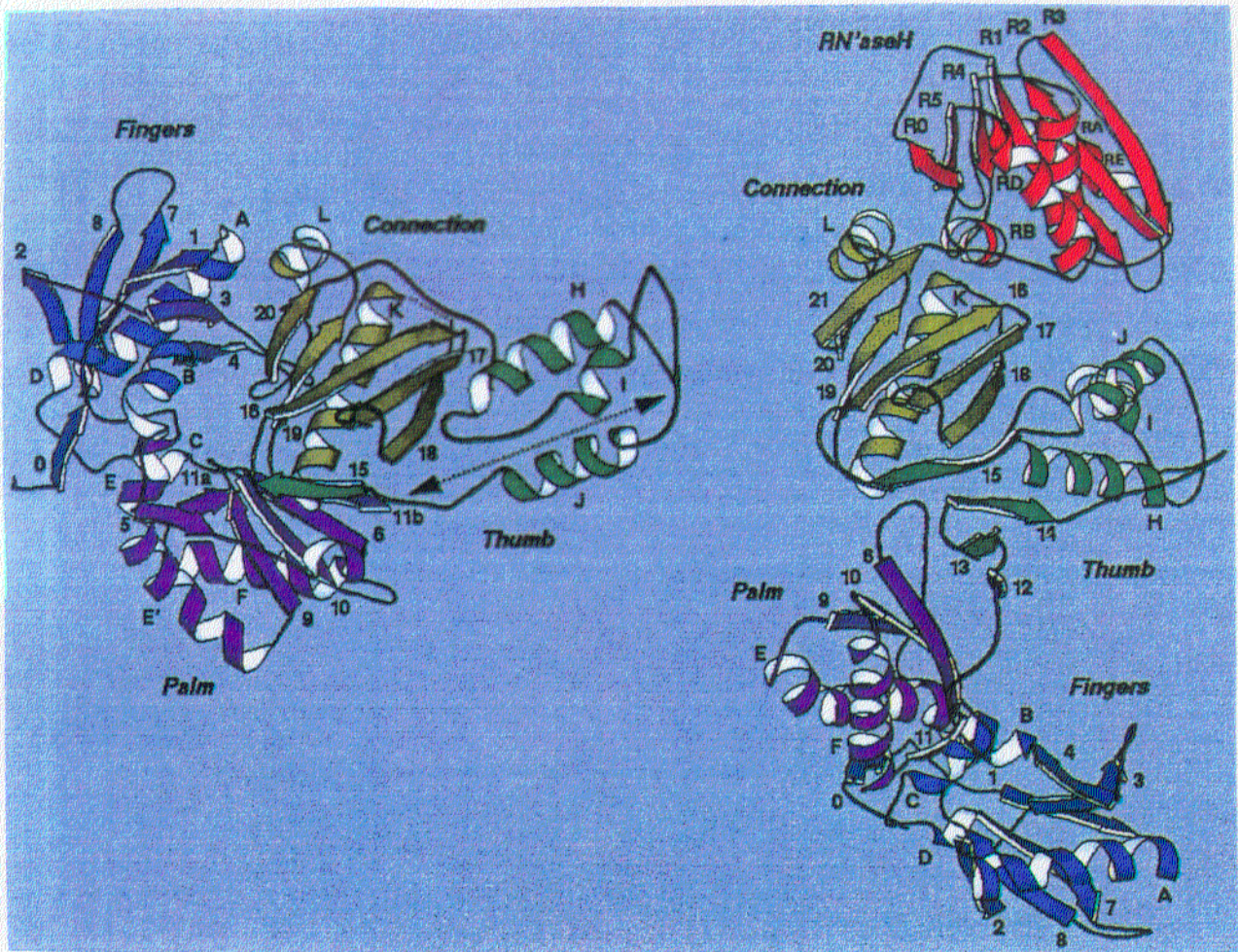


Fig. 1.4 Esquema de la retrotranscriptasa del VIH-1. Las regiones helicoidales están representadas como tubos denominados con letras y las láminas β están representadas como flechas numeradas desde el extremo aminoterminal. A la izquierda se muestra la subunidad p51 y a la derecha la p66. Se indican los dominios y subdominios en que se ha dividido la RT.

El dominio RNasa H consiste en una lámina β de 5 hebras flanqueadas a ambos lados por hélices α : tres en un lado y una en el otro. En el centro activo se localizan dos iones metálicos unidos por los grupos carboxilo de 4 residuos ácidos D-443, E-478, D-498 y D-549.

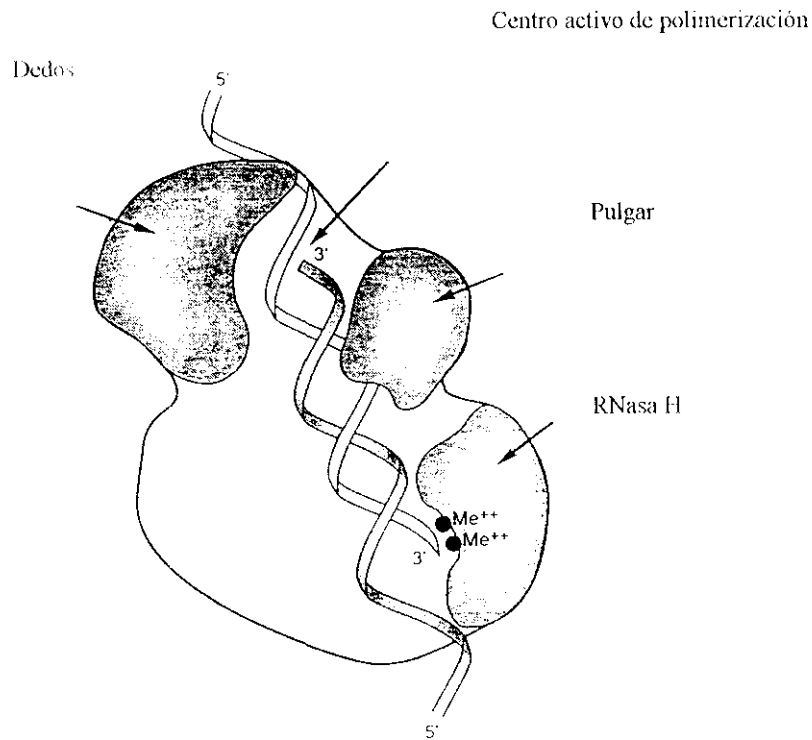


Fig. 1.5 Modelo de la RT con el híbrido DNA-RNA. Se esquematiza la posibilidad de que el dominio RNasa H degrade la hebra de RNA molde progresivamente y a medida que va teniendo lugar la síntesis de DNA en la hebra del iniciador. En el sitio catalítico del dominio de polimerización se localizan los aminoácidos Asp¹⁸⁵ y Asp¹⁸⁶. Esta cavidad podría constituir el lugar donde se une el producto de la síntesis de la primera hebra de DNA al desprenderse del molde RNA, mediante la ruptura catalizada por la RNasa H. Parece que esta ruptura se lleva a cabo a unos 18 nucleótidos del extremo 5' terminal del RNA, es decir, por detrás, en la cadena de DNA, del punto en que se termina la síntesis (Fu y Taylor, 1992). El híbrido RNA-DNA, que parece ser de tipo A, debe estar localizado entre los centros activos RNasa H y polimerasa con el extremo 3' terminal de la hebra del molde en contacto con los metales divalentes de la RNasa H y el extremo 3' del iniciador cerca de la secuencia DD

1.3 LA RETROTRANSCRIPTASA COMO DIANA DE TRATAMIENTOS FRENTE A LA INFECCION POR EL VIH

El control de la infección por el VIH se ha enfocado hacia el empleo de drogas que interfieren con una o varias etapas del ciclo vírico:

- 1) La adsorción del virus a la membrana celular, proceso mediado por la interacción entre la glicoproteína de membrana gp120 y el receptor celular (molécula CD4).
- 2) La fusión de la envuelta vírica con la celular, mediado por la glicoproteína transmembrana gp41.
- 3) La pérdida de la envuelta vírica para liberar la nucleocápside.
- 4) La etapa de transcripción inversa del RNA vírico para sintetizar el cDNA, reacción catalizada por la RT.
- 5) La integración del DNA provírico en el DNA celular.
- 6) La etapa de transcripción del cDNA a RNA.
- 7) La conversión del RNAm vírico precursor a RNA maduro, proceso regulado por factores post-transcripcionales como rev.
- 8) Procesamiento post-transcripcional de precursores de las proteínas por proteólisis, glicosilación y miristilación.
- 9) Ensamblaje del virión y su salida de la célula.

(Revisiones en Mitsuya y Broder, 1987; Mitsuya y cols, 1991; Connolly y Hammer, 1992; Johnston y Hoth, 1993; Volberding PA, 1994).

Uno de los pasos fundamentales del ciclo de replicación del VIH y que además es distinto de los procesos de replicación del DNA celular, es el que cataliza la RT (sección 1.2) por lo que la mayoría de los inhibidores del VIH-1 disponibles actualmente actúan sobre esta enzima. Se distinguen dos tipos de inhibidores, análogos y no análogos de nucleósido. Los análogos de nucleósido inhiben las RT del VIH-1, VIH-2, la del virus de la inmunodeficiencia felina (VIF) y la del virus de la inmunodeficiencia del simio (VIS). Los no análogos de nucleósido (NAN) son específicos del VIH-1.

1. 3.1 Inhibidores de la RT análogos de nucleósido

Compuestos análogos de los 2',3' didesoxinucleósidos pueden actuar como inhibidores de la replicación del VIH *in vivo* (Mitsuya y cols, 1985; Mitsuya y Broder, 1986). Estos compuestos presentan el grupo hidroxilo en la posición 3' del azúcar cíclico sustituido por un átomo de hidrógeno u otro grupo que impide la formación de enlaces fosfodiéster (Yarchoan y cols, 1989). La forma activa de estas drogas es la forma trifosfato. Actúan de dos maneras: *i*) como trifosfatos compiten con los desoxinucleósidos 5'-trifosfatos celulares, esenciales para la formación del cDNA provírico y *ii*) cuando la enzima incorpora alguno de estos compuestos a la cadena en elongación, y debido a la modificación que presentan en el grupo 3' del anillo, se forma un producto que no puede proseguir su elongación, actuando por consiguiente como terminadores de cadena.

El primer compuesto que se aprobó para el tratamiento de la infección por el VIH fue la **3'-azido,3'-desoxitimidina (AZT, zidovudina o ZDV, Retrovir)** (Fig.1.6.A), que se estudió originalmente en 1960 como agente anticancerígeno. Esta droga penetra en la célula por transporte pasivo y una vez dentro se fosforila hasta la forma trifosfato, que es la forma activa. Presenta unas concentraciones terapéuticas medidas en valores de CI_{50} (definición en sección 1.4) que varían entre 1 y 5 μ M. Además de las actividades anteriormente mencionadas generales de los inhibidores análogos de nucleósido, esta molécula en su forma monofosfato también actúa inhibiendo la actividad RNasa H que presenta la enzima RT (Connolly y Hammer, 1992).

El primer estudio clínico para determinar la eficacia del AZT en el control de la infección por VIH se llevó a cabo en pacientes con SIDA. Tras el tratamiento se observó una clara mejoría clínica con disminución de los niveles de la proteína de la nucleocápside p24 (marcador serológico) y una estabilización de los niveles de linfocitos T CD4+ (Mitsuya y cols, 1985; Fischl y cols, 1987). Sin embargo, estudios realizados para determinar la eficacia del AZT en pacientes en estadio asintomático de la infección han demostrado que esta droga no ralentiza la progresión de la enfermedad (Concorde coordinating committee, 1994).

El AZT presenta efectos secundarios cuya severidad varía de unos pacientes a otros y suelen ser más pronunciados a medida que la enfermedad está más avanzada y cuanto mayor es la dosis. El efecto más frecuente es la anemia, que suele aparecer en los primeros 6 meses de tratamiento. Se detectó anemia severa en el 24% de los

pacientes con SIDA o CRS avanzado y sólo en el 1% de los pacientes asintomáticos bajo una dosis de 500 mg de AZT/día y tras 55 días de tratamiento (Volberding y cols, 1990). Además puede coadyuvar a la neutropenia severa, una de las características de la enfermedad, o producir náuseas, nerviosismo, confusión, letargia y cefalalgia.

La **2',3'-dideoxicitidina (ddC, zalcitabina)** (Figura 1.6.B) es un análogo de citosina cuya forma activa es la forma trifosfato. Es unas diez veces más potente *in vitro* que el AZT, con valores de CI_{50} que varían de 0.001 a 0.5 μ M (Mitsuya y cols, 1986; Mitsuya y Broder, 1987). El tratamiento con esta droga conllevó una disminución de antígeno p24 en suero y pequeños incrementos del número de linfocitos CD4⁺. Además en algunos casos se observó un aumento en la proliferación *in vitro* de células T inducida por el antígeno (Merigan y cols, 1989). Presenta una menor toxicidad que el AZT que se refleja fundamentalmente en el desarrollo de neuropatía periférica, con aparición de úlceras en la boca y sarpullido.

La **2',3'-didesoxinosina (didanosina, ddi)** (Figura 1.6.C) es un análogo de purina con actividad anti-VIH *in vitro* y baja toxicidad tanto en células T como en monocitos (Mitsuya y cols, 1986; Mitsuya y Broder, 1987; Du y cols, 1989; Molina y Groopman, 1989; Lambert y cols, 1990) de la que no se conoce exactamente la ruta de fosforilación anabólica. La forma ddA también es efectiva contra el VIH *in vitro*, aunque en humanos es más efectiva la utilización de ddi como precursor del ddA-trifosfato (forma activa) para evitar la formación de adenina en el estómago, que resulta tóxica. Este inhibidor penetra en las células por transporte pasivo y presenta unos valores de CI_{50} que varían entre 1-10 μ M. El ddi también presenta actividad anti-VIH *in vivo*, observándose una mejoría inmunológica, un incremento de células T CD4⁺ y una disminución de alrededor del 80% de antígeno p24 (Yarchoan y cols, 1989). En 1991 se aprobó la administración de didanosina para el tratamiento de pacientes previamente tratados con AZT que fueran intolerantes a dicho inhibidor o en los que no se hubiera observado beneficio alguno tras el tratamiento. La administración de ddi a pacientes con SIDA, CRS o asintomáticos a los que previamente se les había suministrado AZT, conllevó cierto incremento en el número de células T CD4⁺ (Yarchoan y cols, 1990; Kahn y cols, 1992). Sin embargo, los efectos secundarios detectados, fundamentalmente pancreatitis, neuropatía periférica (asociada a la dosis de droga administrada) y diarrea limitan la aplicabilidad de este

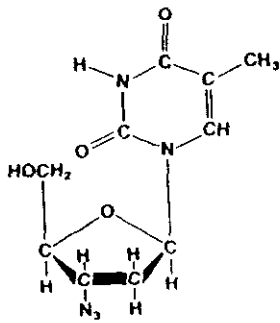
inhibidor (Yarchoan y cols, 1990).

La **2',3'-didesoxitimidina (D4T, stavudina)** (Figura 1.6.D) presenta una potente actividad anti-VIH tanto *in vitro* como *in vivo* con valores de CI_{50} que varían entre 1 y 3 μM (Balzarini y cols, 1989; Ho y Hitchcock, 1989). Los estudios están en fase III en pacientes con SIDA o CRS.

El tratamiento con este inhibidor produce efectos secundarios, aunque menores que los producidos por el AZT (Browne y cols, 1993).

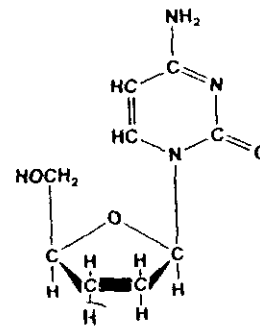
El enantiómero (-) de la **2'-desoxi-3'-tiacitidina (3TC, BCH189, lamividina)** (Figura 1.6.E) presenta una potente actividad inhibitoria de la replicación tanto del VIH-1 como del VIH-2 *in vitro*, con unas CI_{50} de 4nM a 0.67 μM (Coates y cols, 1992^a). Este enantiómero presenta menor toxicidad que el (+) (que también es capaz de inhibir la replicación del VIH) (Coates y cols, 1992^b) y que la zidovudina (Lisignoli y cols, 1992).

A.



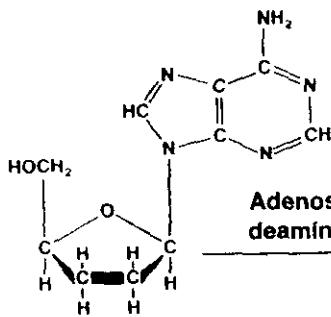
3'-azido-2',3'-dideoximidina
(AZT, zidovudina, retrovir)

B.



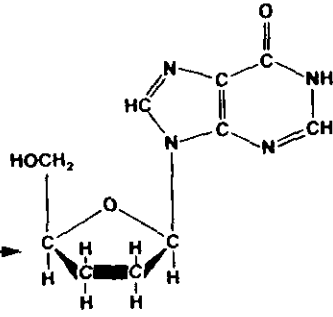
2',3'-dideoxycitidina
(ddC, zalcitabina)

C.



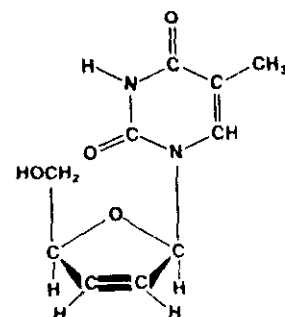
2',3'-dideoxyadenosina
(ddA)

Adenosine
deaminase



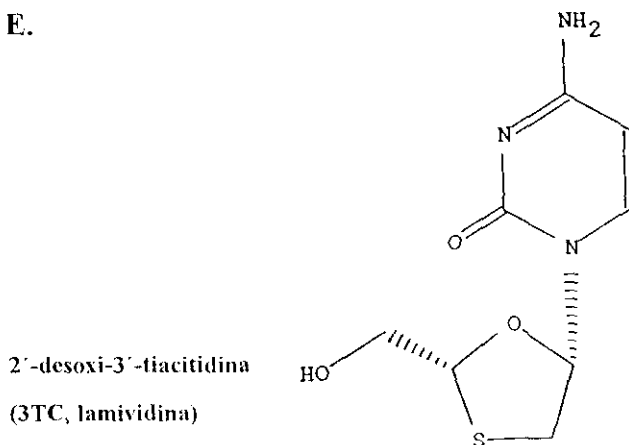
2',3'-dideoxyinosina
(ddI)

D.



2',3'-didehydro-2',3'-dideoximidina
(D4T)

E.



2'-desoxi-3'-tiactidina
(3TC, lamividina)

Figura 1.6. Estructura química de inhibidores de la retrotranscriptasa del VIH-1 análogos de nucleósido.

1.3.2. Inhibidores de la RT no análogos de nucleósido.

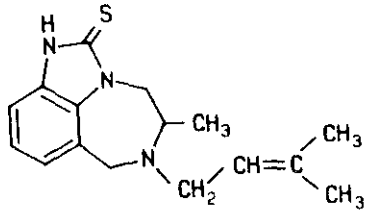
Los inhibidores de la RT no análogos de nucleósidos (NAN) son moléculas estructuralmente distintas pero con una serie de características comunes como son: *i)* ser inhibidores potentes de la replicación del VIH-1 (actúan a concentraciones nanomolares), *ii)* ser selectivos del VIH-1, *iii)* presentar baja toxicidad y *iv)* no mostrar resistencia cruzada con los inhibidores de la RT análogos de nucleósido por tener un mecanismo de acción distinto. Parece que los NAN inhiben preferentemente la reacción de polimerización del DNA dependiente de RNA más que los pasos subsiguientes de la reacción de retrotranscripción (Debyser y cols, 1991). Entre ellos destacan:

Los **compuestos TIBO**, derivados de la tetrahydro-imidazo(4,5,1-jk)(1,4)-benzodiazepin-2(1H)-ona y-tiona (Fig. 1.7.A) (Pauwels y cols, 1990), la dipiridodiazepinona 6,11-dihidro-11-ciclopropil-4-metildipirido[2,3-b:2',3'-e]-[1,4] diazepin-6-ona (**nevirapina, BI-RG-587**) (Fig. 1.7.B) actúa uniéndose de manera no competitiva a un sitio de la enzima distinto del sitio de unión del molde y de los nucleótidos (Wu y cols, 1991). Es efectivo contra cepas de VIH-1 salvajes (Cheeseman y cols, 1993), cepas resistentes a AZT y es capaz de inhibir parcialmente la actividad RNasa H.

Los compuestos **L-697,639, L-697,661, L-696,229 (drogas L)** (Fig. 1.7.C) son derivados de piridonas. Se unen a la enzima por el mismo sitio que la nevirapina. Estos inhibidores también presentan cierta actividad anti-RNasa H (Goldman y cols, 1992).

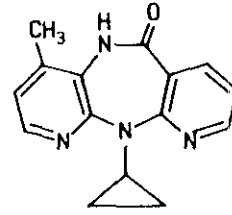
También destacan los derivados la hidroxietoximetilfeniltiotimina (**derivados HEPT**) (Fig. 1.7.D) (Miyakasa y cols, 1989; Baba y cols, 1989), las bis(heteroarilpiperazinas) (**BHAPs**) (Fig. 1.7.E) (Romero y cols, 1991) y los **derivados α -APA** (derivados de la α -anilinoacetamida) (Fig. 1.7.F) (Pauwels y cols, 1992).

A.



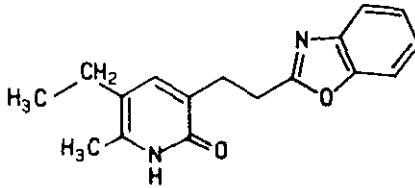
TIBO R82150

B.



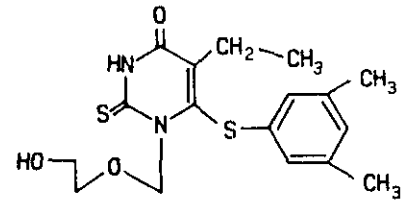
Nevirapina (BI-RG-587)

C.



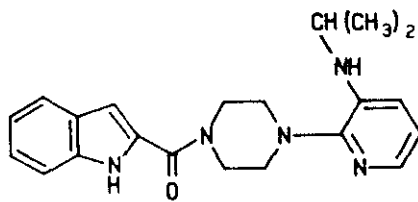
Piridinona L-696,229

D.



HEPT: E-HEPU-SdM

E.



BHAP U-88204

F.

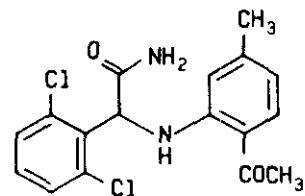
 α -APA R89439

Figura 1.7. Estructura química de inhibidores de la retrotranscriptasa del VIH-1 no análogos de nucleósido.

1.4 DISMINUCION DE SUSCEPTIBILIDAD A INHIBIDORES DE LA RT

El término *resistencia a drogas* en relación a inhibidores de la replicación vírica se refiere a una disminución de susceptibilidad a la droga medida en cultivo (Darby y Larder, 1992). Los resultados de estos ensayos indican la concentración de inhibidor requerida para inhibir en un 50% la infectividad del virus (concentración inhibitoria 50, CI_{50}) en líneas celulares, generalmente en células HeLa CD4+.

1. 4.1 Inhibidores análogos de nucleósido

1.4.1.1 Resistencia a AZT

El fenómeno de resistencia del VIH-1 a AZT se describió por primera vez en 1989 (Larder y cols, 1989^a) en muestras de pacientes con SIDA o complejo relacionado con SIDA (CRS). Se estudió la susceptibilidad a AZT infectando monocapas de células HeLa HT4-6C con preparaciones de VIH libre de células en presencia de distintas concentraciones de droga y midiendo la reducción de formación de focos de sincitios (Chesebro y Wehrly, 1988). Se obtuvieron valores de CI_{50} que variaron entre 0.01 y 0.05 μM para las muestras procedentes de pacientes sin tratar o tratados con AZT durante menos de 6 meses mientras que en las muestras procedentes de pacientes tratados, se observaron aumentos de CI_{50} de hasta 100 veces (Larder y cols, 1990).

La aparición de aislados del VIH-1 resistentes a AZT se ha relacionado con múltiples factores: *i)* el estadio clínico del paciente, *ii)* los niveles de linfocitos T CD4+, *iii)* la dosis de droga administrada y *iv)* con el fenotipo del virus. La resistencia a AZT aparece más rápidamente en pacientes sintomáticos con niveles de células T CD4+ por debajo de 200/mm³ y a los que se había administrado dosis más elevadas de AZT (1200-1500 mg/día) (Richman 1990^a; 1993). Se ha estimado que después de 1 año en tratamiento con AZT la probabilidad de detección de variantes del VIH-1 resistentes a AZT es del 89, 41 y 27% en pacientes con niveles de linfocitos CD4+ < 100, de 100 a 400 y >400 respectivamente (Richman, 1993).

La detección en cultivo del fenotipo sincitial está unido al carácter altamente resistente a AZT del virus *in vitro* y a una rápida progresión de la enfermedad (Boucher y cols, 1992^a; Tudor-Williams, 1992; St.Clair y cols, 1993).

La probabilidad de detección de VIH-1 resistente a AZT después de 1 año en tratamiento en relación con el estadio de la enfermedad es del 89% en pacientes en estadio avanzado y del 31% en el caso de pacientes en estadio temprano de la enfermedad (Richman, 1990^b). El 33% de los pacientes en estadio tardío de la enfermedad desarrollan alta resistencia en el primer año de tratamiento mientras que en los pacientes asintomáticos se detecta este fenotipo tras tres años de tratamiento (Richman y cols, 1991^a).

La resistencia a AZT se relacionó, inicialmente, con el cambio de cuatro aminoácidos de la RT, 67 (D→N), 70 (K→R), 215 (T→Y o F) y 219 (K→Q) (Larder y cols, 1989^b), mutaciones que, sin embargo, no parecen alterar la actividad de la enzima en ensayos *in vitro* (Larder y cols, 1989^c). Recientemente, se ha descrito la importancia del cambio M→L del aminoácido 41 para la adquisición de fenotipo altamente resistente a AZT (Kellam y cols, 1992). Esta mutación se había descrito anteriormente como posible co-responsable de este fenómeno (St Clair y cols, 1991). La selección de variantes de VIH-1 resistentes a AZT tras pases en cultivo en presencia de droga reveló la aparición de las mismas mutaciones en el gen que codifica la RT que las detectadas previamente en aislados de pacientes en tratamiento (Larder y cols, 1991^a; Gao y cols, 1992).

Cada una de estas mutaciones y combinaciones de ellas tienen un determinado efecto sobre el fenotipo de resistencia a AZT. Para estudiarlo se incluyeron por mutagénesis dirigida en un clon infeccioso de genotipo salvaje los cambios de aminoácido a estudiar y se analizó su efecto sobre el valor de CI_{50} en ensayos de susceptibilidad a AZT. La sustitución del aminoácido 70 únicamente provocó un incremento en el valor de CI_{50} de 8 veces (Larder y cols, 1991^b), la del aminoácido 41 M→L, un aumento de 4 veces (Kellam y cols, 1992) y la sustitución T→Y en posición 215 provocó un aumento de 16 veces de la resistencia a AZT (Larder y cols, 1991^b). El cambio de este aminoácido a S o del 67 (D→N) o 219 (K→Q) por separado, no se relacionaron con resistencia a AZT (Larder y cols, 1991^b). La combinación de los cambios de los aminoácidos 41, 67, 70, 215 y/o 219 da lugar a distintos grados de resistencia a AZT (Tabla 1.2).

Se han detectado otros cambios de aminoácidos en muestras de pacientes en tratamiento con AZT que podrían estar relacionadas con la resistencia a dicha droga: 125 (L→W), 142 (I→V), 294 (P→T) (Japour y cols, 1991), 60 (V→I) (Rubsamen-Waigmann y cols, 1991), 138 (E→A), 210 (W→L), 248 (E→K) y 259 (K→R) (Muckenthaler y cols, 1992).

El estudio de muestras secuenciales de pacientes en tratamiento con AZT ha permitido describir un orden de aparición de las mutaciones de resistencia a AZT anteriormente mencionadas (Boucher y cols, 1992^b; Kellam y cols, 1994). En primer lugar aparece el cambio del aminoácido 70, que desaparece tras cierto tiempo y coincidiendo con la aparición de las mutaciones en los codones que codifican los aminoácidos 215 y 41. Posteriormente se detectan cambios en los aminoácidos 67, 219 y 70 de nuevo coincidiendo con la progresión de la enfermedad.

El AZT presenta resistencia cruzada con inhibidores que presentan un grupo azida en su molécula (Larder y cols, 1990). Recientemente se ha descrito la disminución de susceptibilidad a ddC y ddI en pacientes en monoterapia con AZT, como consecuencia de la resistencia cruzada existente entre estas tres drogas (Mayers y cols, 1994)

Tabla 1.2. Sustituciones de aminoácidos de la RT implicadas en la resistencia a AZT

Genotipo					Resistencia		Referencia Bibliográfica
41	67	70	215	219	AZT	a AZT	
M	D	K	T	K	CI₅₀ (µM)	(incremento)	
.	0.01	—	Larder y cols, 1990
.	N	.	.	.	0.01	—	Larder y cols, 1991
.	.	.	S	.	0.01	—	Larder y cols, 1991
.	.	.	.	Q	0.01	—	Larder y cols, 1991
L	0.04	4	Kellam y cols, 1992
.	.	R	Y	.	0.06	6	Kellam y cols., 1994
.	.	R	.	.	0.08	8	Larder y cols, 1991
L	.	R	.	.	0.09	9	Larder y cols, 1991
.	.	.	Y	.	0.16	16	Larder y cols, 1991
.	N	R	.	.	0.17	17	Larder y cols, 1991
.	.	.	F	Q	0.22	22	Larder y cols, 1991
.	N	R	.	Q	0.28	28	Larder y cols, 1991
L	.	R	Y	.	0.34	34	Kellam y cols, 1994
.	N	R	Y	.	0.35	35	Larder y cols, 1991
L	N	.	Y	.	0.43	43	Larder y cols, 1991
L	N	R	F	Q	0.51	51	Kellam y cols, 1994
L	.	.	Y	.	0.60	60	Kellam y cols, 1992
.	N	R	Y	Q	1.21	121	Kellam y cols, 1992
.	N	R	F	Q	1.47	147	Kellam y cols, 1992
L	N	R	Y	.	1.79	179	Kellam y cols, 1992
L	N	R	Y	Q	1.80	180	Kellam y cols, 1994

Se indican los cambios de aminoácido implicados en la resistencia a AZT, el valor de CI₅₀ calculado tras el cultivo de los mutantes en presencia de droga, así como el incremento de la resistencia a AZT. El orden seguido es creciente en cuanto al grado de resistencia a AZT de los virus mutantes. Las referencias bibliográficas de los trabajos se refieren en la columna de la derecha. (Revisión en Larder, 1994).

1.4.1.2 Resistencia a ddC

El estudio de un paciente antes y después de 80 semanas en tratamiento con ddC mostró la selección de la doble mutación ACT→GAT en el codón que codifica el aminoácido 69 de la RT que cambia de T →D y una disminución de la susceptibilidad a este inhibidor de 5 veces (Fitzgibbon y cols, 1992). Recientemente se han descrito cambios relacionados con un cambio de susceptibilidad a ddC en los aminoácidos 65 (K→R) (Gu y cols, 1994; Zhang y cols, 1994) y 184 (M→V) de la RT (Gu y cols, 1992; 1994). El cambio en el aminoácido 65 provoca un incremento del valor de CI_{50} de 4 veces y resistencia cruzada a ddI.

El cambio L→V del aminoácido 74 confiere resistencia cruzada con ddI (St Clair y cols, 1991) y el observado en el aminoácido 184 (M→V) confiere resistencia cruzada con 3TC (Gu y cols, 1994). Recientemente se ha descrito la posible resistencia cruzada con AZT (Mayers y cols, 1994).

1.4.1.3 Resistencia a ddI

En 1991 se describió la selección de variantes del VIH-1 con susceptibilidad reducida frente a ddI en muestras de pacientes en tratamiento con ddI durante 12 meses después de un primer período en tratamiento con AZT (St. Clair y cols, 1991). Al comienzo del tratamiento con ddI, todas las muestras estudiadas mostraron susceptibilidad reducida a AZT. El análisis de estas muestras demostró una reducción de susceptibilidad a ddI, a ddC y un aumento de susceptibilidad a AZT. Estos cambios fenotípicos se correlacionaron con el cambio L→V en el aminoácido 74 de la RT.

Después de pases *in vitro* en presencia de droga, se seleccionaron virus con susceptibilidad reducida a ddI, en los que se detectaron las mismas mutaciones que *ex vivo* además de la sustitución del aminoácido 135 a I (Gao y cols, 1992). Más recientemente se ha correlacionado la menor susceptibilidad a ddI (de 5 veces) con cambios en los aminoácidos 184 (Gu y cols, 1992; Gao y cols, 1993) y 65 de la RT. El cambio K→R del aminoácido 65 provoca una pequeña disminución de la susceptibilidad a ddI (Gu y cols, 1994; Zhang y cols, 1994).

1.4.1.4 Resistencia a D4T

Se ha descrito la detección de variantes del VIH-1 con susceptibilidad reducida a D4T tras estudios *in vitro*. Los estudios se realizaron dando pases seriados de VIH-1 en presencia de concentraciones crecientes de droga. Los virus empleados en el estudio fueron: *i*) virus con genotipo salvaje y *ii*) virus con genotipo resistente a AZT.

Después de 6 pases en cultivo del virus sensible a AZT se observó una disminución de la susceptibilidad frente a D4T de 4 veces respecto al virus en ausencia de la droga. Sin embargo en el virus resistente a AZT se observó únicamente un pequeño aumento del valor de CI_{50} mostrando distinto nivel de resistencia a D4T dependiendo del contexto genético de resistencia o sensibilidad a AZT del virus inicial.

Estudios moleculares de estos virus detectaron el cambio V→T en el primer caso y V→A en el segundo del aminoácido 75 de la RT (Lacey y Larder, 1994^a).

1.4.1.5 Resistencia a 3TC y FTC

La resistencia a 3TC y a FTC se relacionó con un cambio del aminoácido 184 de la RT (M→V o I) (Tisdale y cols, 1993; Boucher y cols, 1993^a). Recientemente se ha descrito que el genotipo de resistencia a 3TC se adquiere en dos fases, una primera en que se detecta el cambio en el aminoácido 184 M→I (ATG→ATA) y una segunda en que este cambio pasa a I→V (ATA→GTG) (Boucher y cols, 1993^b). La sustitución del aminoácido 184 M→V en virus resistentes a AZT conlleva a la sensibilización de dicho virus frente a la segunda droga.

1.4.2 Inhibidores no análogos de nucleósido

La primera descripción de virus resistentes a inhibidores no análogos de nucleósido tuvo lugar tras pases en cultivo de VIH-1 en presencia de L-693,593 (droga L). Estos mutantes presentaron las mutaciones AAA→AAC (K103N) y TAT→TGT (Y181C) en el dominio p51 de la RT, que confieren resistencia cruzada con los compuestos TIBO y nevirapina (Nunberg y cols, 1991). La sustitución Y181C muestra, sin embargo, resistencia cruzada limitada con los compuestos TIBO y varía con distintos derivados TIBO (Richman y cols, 1991^c).

Estudios *in vivo* mostraron que los cambios de aminoácido previamente descritos tras estudios *in vitro* coincidían con los detectados en el caso de pacientes tratados con dicha droga durante aproximadamente un mes (Richman y cols, 1994).

En la Tabla 1.3 se detallan las mutaciones en el gen que codifica la RT implicadas en la resistencia a cada uno de los inhibidores no análogos de nucleósido.

Tabla 1.3. Mutaciones implicadas en la resistencia a drogas NAN

Droga	Cambio de aa	Cambio de codón	In Vitro	In Vivo	Referencia Bibliográfica
Nevirapina	A98G	GCA→GGA	No	Si	Richman y cols, 1994
	L100I	TTA→ATA	No	Si	Richman, 1993
	K103N	AAA→AAC	No	Si	Richman, 1993
	V106A	GTA→GCA	Si	Si	Richman y cols, 1993; 1994; Larder, 1992
	V108I	GTA→ATA	No	Si	Richman, 1993
	Y181C	TAT→TGT	Si	Si	Richman y cols, 1991; 1994; Nunberg y cols, 1991; Mellors y cols, 1992
	Y188C	TAT→TGT	No	Si	Richman, 1993
	G190A	GGA→GCA	No	Si	Richman y cols, 1994
	G190S	GGT→AGT	?	Si	Shaw y cols, 1994
TIBO R82150	L100I	TTA→ATA	Si	?	Mellors y cols, 1993; Balzarini y cols, 1993
TIBO 82913	L100I	TTA→ATA	Si	?	Larder, 1992
	V106A	GTA→GCA	Si	?	Larder, 1992
	E138K	GAG→AAG	Si	?	Balzarini y cols, 1993
	Y181C	TAT→TGT	Si	?	Larder, 1992
	Y188H	TAT→CAT	Si	?	Balzarini y cols, 1993
	Y188L	TAT→TTA	No	Si	Vandamme y cols, 1993
L 697,593	K103N	AAA→AAC	Si	?	Nunberg y cols, 1991
	Y181C	TAT→TGT	Si	?	Nunberg y cols, 1991
L 697,661	A98G	GCA→GGA	No	Si	Byrnes y cols, 1993; 1994
	L100I	TTA→ATA	Si	No	Byrnes y cols, 1993; 1994
	K101E	AAAGAA	No	Si	Byrnes y cols, 1993; 1994
	K103N	AAA→AAC	Si	Si	Byrnes y cols, 1993; 1994
	K103Q	AAA→CAA	No	Si	Saag y cols, 1993
	V108I	GTA→GCA	Si	Si	Byrnes y cols, 1993; 1994
	V179D	GTT→GAT	No	Si	Byrnes y cols, 1993
	V179E	GTT→GAG	No	Si	Byrnes y cols, 1993
	Y181C	TAT→TGT	Si	Si	Byrnes y cols, 1993; 1994

Droga	Cambio de aa	Cambio de codón	In Vitro	In Vivo	Referencia Bibliográfica
BHAP U- 90151	P236L	CCT→CTT	Si	?	Dueweke y cols, 1993
BHAP U- 87201	K101E	AAA→GAA	No	Si	Demeter y cols, 1993
	K103N	AAA→AAC	No	Si	
	Y181C	TAT→TGT	No	Si	Demeter y cols, 1993
	Y188H	TAT→CAT	No	Si	Demeter y cols, 1993
	E233V	GAA→GTA	No	Si	Demeter y cols, 1993
	P236L	CCT→CTT	Si	No	Dueweke y cols, 1993
	K238T	AAA→ACA	No	Si	Demeter y cols, 1993
BHAP U88204	L100I	TTA→ATA	Si	?	Vasudevachari y cols, 1992
	V106A	GTA→GCA	Si	?	Vasudevachari y cols, 1992
	Y181C	TAT→TGT	Si	?	Vasudevachari y cols, 1992
α-APA R18893	Y181C	TAT→TGT	?	Si	de Bethune y cols, 1993

In vitro: sustitución observada en ensayos *in vitro* en presencia de droga. *In vivo*: sustitución observada en muestras de pacientes en tratamiento. ? : no determinado. (Adaptada de Schinazi y cols, 1994^a).

1.4.3. Reversión de la resistencia a AZT

Un aspecto de gran importancia por sus repercusiones clínicas es la posibilidad de reversión de la resistencia a AZT tanto tras la interrupción de tratamiento antirretrovírico como por efecto de la combinación y/o alternancia de terapias.

El estudio de muestras de pacientes a los que se suprimió el tratamiento con AZT ha permitido observar la reversión parcial del fenotipo y en menor medida del genotipo de resistencia (Boucher y cols, 1993^c). Otros estudios, sin embargo, han obtenido resultados en contradicción con los anteriores (Fitzgibbon y cols, 1991; Albert y cols, 1991). En el caso de terapia combinada con AZT y ddI, se ha descrito la reversión fenotípica aunque no genotípica de la resistencia a AZT (St. Clair y cols, 1991).

La combinación de AZT con inhibidores de la RT no análogos de nucleósido suprime la resistencia a la primera droga (Larder, 1992). Pases seriados de un virus de tipo salvaje, de uno resistente a ddI y de otro resistente a AZT en presencia de TIBO resultaron en la selección de virus resistente a TIBO, virus resistente tanto a ddI como a TIBO y de virus resistente a TIBO y sensible a AZT respectivamente. El cambio Y→C del aminoácido 181 suprime el fenotipo de resistencia a AZT.

La sustitución M→I del aminoácido 184 produce el mismo efecto de reversión del fenotipo de resistencia a AZT (Tisdale y cols, 1993; Boucher y cols, 1993^a).

1.5 VARIABILIDAD DEL VIH-1

1.5.1 Variabilidad genética

Los virus con genoma RNA replican como distribuciones complejas y dinámicas llamadas cuasiespecies y presentan, por lo tanto una elevada variabilidad genética (Domingo y cols, 1978; Eigen y Biebricher, 1988). Una consecuencia directa de la elevada tasa de mutación es la continua generación de genomas mutantes (Domingo y cols, 1978; Temin, 1989), la mayoría de los cuales se eliminarán o permanecerán de manera minoritaria en la población por selección negativa (Domingo y cols, 1978; Holland y cols, 1991; Martínez y cols, 1991; Domingo y Holland, 1994). El concepto teórico de cuasiespecie se describió por primera vez en 1971 (Eigen, 1971; Eigen y Biebricher, 1988^{a,b}) y experimentalmente con el bacteriófago Q β en 1978 (Domingo y cols). Como revisiones de las primeras evidencias de alta mutabilidad de los virus RNA ver Holland y cols, 1982 y Domingo y cols, 1985. Las moléculas que replican con una fidelidad limitada generan una diversidad genómica suficiente como para que exista cierta probabilidad de que alguna molécula en la población tenga propiedades fenotípicas beneficiosas ante un cambio del entorno (la selección natural lleva a la supervivencia de aquellos mutantes capaces de producir descendencia más eficazmente). La distribución en cuasiespecies presenta frecuentemente una secuencia dominante o maestra (aquella que tiene mayor capacidad de replicación) y un espectro de mutantes que confieren adaptabilidad al virus. Esta estructura poblacional dinámica es sensible a la selección y a muestreos al azar (Domingo y Holland, 1994).

Los retrovirus presentan también una estructura en cuasiespecies y una elevada diversidad genética y antigénica. La diversidad genética tiene su origen en la falta de actividad 3'→5' exonucleasa en las retrotranscriptasas. La diversificación se favorece por la integración de provirus en el DNA celular (único para el caso de los retrovirus) y que permite al virus asegurar una infección persistente y acumular variantes a lo largo del tiempo (Wain-Hobson, 1994). Esto ha llevado a la detección durante su replicación de frecuencias altas de mutación y de recombinación (Coffin, 1986; 1992; Temin, 1989; Hahn y cols, 1986; Wain-Hobson, 1992; 1994).

En la Tabla 1.4 se muestran los valores de tasa de mutación de diversos virus RNA y retrovirus.

Tabla 1.4. Tasa y frecuencia de mutaciones puntuales de virus RNA y retrovirus

Virus	Procedimiento	Valor ^a	Referencia Bibliográfica
Fago Q β	Reversión de mutantes extracristrónicos	10^{-4}	Baschelet y cols, 1976
Virus de la estomatitis vesicular	Determinación química de oligonucleótidos erróneos ^b	10^{-3} - 10^{-4}	Steinhauer y Holland, 1987; Steinbauer y cols, 1989
Virus de la estomatitis vesicular	Frecuencia de mutantes MAR ^c		
Virus de la gripe tipo A	Secuenciación repetitiva	10^{-5}	White y McGeoch, 1987
Virus de la estomatitis vesicular	Reversión de mutantes ámbar	10^{-3} - 10^{-4}	Holland y cols, 1989
Virus de la polio	Secuenciación repetitiva	$<2 \cdot 10^{-6}$	Parvin y cols, 1986
Virus de la polio	Reversión de mutantes ámbar	$2 \cdot 10^{-6}$	Sedivy y cols, 1987
Virus de la polio	Reversión de dependencia de guanidina	$2 \cdot 10^{-4}$	de la Torre y cols, 1990
Virus de la polio	Determinación química de oligonucleótidos erróneos	$3 \cdot 10^{-3}$ - $5 \cdot 10^{-4}$	Ward y Flanagan, 1992
Virus de la polio	Transiciones U \rightarrow C	$2 \cdot 10^{-5}$	de la Torre y cols, 1990
Virus de la polio	Frecuencia de mutantes MAR ^c	10^{-4} - 10^{-5}	Emini y cols, 1982; Minor y cols, 1983; 1986
Mengovirus	Frecuencia de mutantes MAR ^c	$3 \cdot 10^{-3}$ - $5 \cdot 10^{-5}$	Boege y cols, 1991
Virus de la fiebre aftosa	Frecuencia de mutantes MAR ^c	10^{-5}	Martínez y cols, 1991
Rinovirus	Frecuencia de mutantes MAR ^c	10^{-4} - 10^{-5}	Sherry y cols, 1986
Virus Sindbis	Reversión de mutantes ts	$<10^{-6}$	Durbin y Stollar, 1986
Virus Sindbis	Supuesta reversión de mutantes ts	10^{-2} - 10^{-5}	Hahn y cols, 1989 ^{a, b}
Virus Sindbis	Frecuencia de mutantes MAR ^c	10^{-3} - 10^{-5}	Stec y cols, 1986
Virus del sarcoma de Rous	Selección de mutantes puntuales	10^{-4}	Coffin y cols, 1980; 1990 ^b
Virus del sarcoma de Rous	Electroforesis desnaturizante	10^{-4}	Leider y cols, 1988
Virus de la necrosis del bazo	Vectores retrovíricos con marcador	$5 \cdot 10^{-3}$ - 10^{-5}	Dougherty y Temin, 1988 ^{a, b}
Virus de la leucemia murina	Fingerprinting con T1 y secuencia repetitiva de nucleótidos	$2 \cdot 10^{-5}$	Monk y cols, 1992
Virus de la leucemia murina			
Moloney	Reversión ámbar en vector retrovírico	$2 \cdot 10^{-6}$	Varela-Echavarría y cols, 1992
VIII		$2 \cdot 10^{-5}$	Pathak y Temin, 1990 ^{a, b}

a: sustituciones por nucleótido. La frecuencia de mutantes MAR es la proporción de mutantes resistentes a neutralización por anticuerpos monoclonales. b: medido en diferentes sitios de los genomas víricos. c: La frecuencia de mutantes MAR no se puede relacionar con la frecuencia de mutación por sitio. (Adaptada de Domingo y Holland, 1994).

La variabilidad de los lentivirus está condicionada por:

- i)* El número de ciclos replicativos
- ii)* La tasa de crecimiento de la población vírica
- iii)* La infidelidad de las polimerasas víricas. Se han propuesto distintos mecanismos para explicar este fenómeno: los saltos de hebra que tiene que llevar a cabo la RT en el proceso de transcripción inversa (Temin, 1993) y la facilidad que tiene dicha enzima para continuar la polimerización a partir de un desapareamiento de bases (Patel y Preston, 1994).

La frecuencia con que se fijan las mutaciones en una población vírica, es decir, la velocidad de evolución, depende de:

- i)* La tasa de mutación.
- ii)* La selección, que puede ser positiva hacia la variación acaecida en determinadas condiciones ambientales (presión inmune, drogas antivíricas, etc) o negativa contra la variación debido a *impedimentos funcionales del virus*.

En 1984 se describió por vez primera la diversidad genómica del HTLV-III (Shaw y cols 1984; 1985; Hahn y cols, 1984; 1985), actualmente denominado VIH. En la generación de diversidad genética influyen: *i)* la tasa de error, *ii)* recombinación (Temin, 1993) y la hipermutación generalmente desviada (G→A) que presenta este virus (Vartanian y cols, 1991; Meyerhans y cols, 1994; Vartanian y cols, 1994). De enorme importancia en relación con la heterogeneidad genética detectada es el tamaño poblacional. Se ha estimado que en un individuo pueden existir del orden de $>10^6$ - 10^{11} provirus (Piatak y cols, 1993^{a,b}; Wain-Hobson, 1993; Dalglish, 1993), valores mayores de lo inicialmente estimado (Simmonds y cols, 1991). Un elevadísimo porcentaje de los genomas detectados son defectivos, estimándose una frecuencia de de mutaciones inactivantes de $5 \cdot 10^{-4}$ - $5 \cdot 10^{-5}$ (Goodenow y cols, 1989; Meyerhans y cols, 1989; Kusumi y cols, 1992). A pesar de ello, los elevados tamaños poblacionales representan importantes reservorios de variantes genéticos y fenotípicos.

Esta diversidad, que es mayor en la región del genoma que codifica las proteínas de la envoltura (Shaw y cols, 1984; 1985; Hahn y cols, 1984; 1985; Alizon y cols, 1986), ha permitido describir hasta el momento 7 genotipos distintos del VIH-1 (Louwagie y cols, 1993). Basándose en la comparación de secuencias de nucleótidos del gen *env*, se definieron 5 regiones variables que presentan menos del 30% de conservación de aminoácidos (Modrow y cols, 1987; McCutchan y cols, 1991). Estas regiones se encuentran separadas por regiones altamente conservadas.

Se han observado valores de la velocidad de sustitución nucleotídica que varían entre $0.4 \cdot 10^{-3}$ y $1.9 \cdot 10^{-3}$ mutaciones/sitio/año para el gen *gag* y de $3.2 \cdot 10^{-3}$ a $15.8 \cdot 10^{-3}$ mutaciones/sitio/año el gen *env* (Hahn y cols, 1986).

La tasa de evolución calculada para el gen *env* es de $1.4 \cdot 10^{-2}$ cambios de nucleótido no sinónimos/sitio/año y de $1.7 \cdot 10^{-2}$ cambios de nucleótido sinónimos/sitio/año. El gen *pol* es más conservado, con una tasa de evolución de $1.7 \cdot 10^{-3}$ cambios de nucleótido/sitio/año (Sharp y Li, 1988).

La heterogeneidad genética es siempre menor entre virus aislados de un mismo paciente que entre aislados de distintos individuos. Los cambios detectados en el gen *env* en muestras secuenciales de tres pacientes correspondieron fundamentalmente a mutaciones puntuales y localizadas en las zonas hipervariables anteriormente descritas (Hahn y cols, 1986). Esta diversidad también es menor en virus aislados de una misma zona geográfica (Myers G, 1993) así como en aquellos virus adquiridos por una misma vía de infección (Balfé y cols, 1990; Rojas y cols, 1993) pero aumenta con el avance de la enfermedad (McNearnly y cols, 1992).

El estudio molecular del VIH llevó a determinar que éste consiste en una mezcla compleja de virus genotípicamente distinguibles (Saag y cols, 1988; Fisher y cols, 1988; Goodenow y cols, 1989, Meyerhans y cols, 1989) típica de cuasiespecies. Ello tiene como consecuencia una rápida diversificación pacientes distintos (Balfé y cols, 1990; Alizon y cols, 1986; Myers y cols, 1993), en un mismo paciente (Hahn y cols, 1986; Saag y cols, 1988; Meyerhans y cols, 1989; Wolf y cols, 1990; Delassus y cols, 1991; Kusumi y cols, 1992), en distintos órganos de un mismo individuo (Epstein y cols, 1991; Ball y cols, 1994; Wong y cols, 1994) e incluso en sitios del mismo órgano (Pang y cols, 1991; Delassus y cols, 1992; Sala y cols, 1994).

Como se ha indicado anteriormente, la cuasiespecie es susceptible de presiones selectivas, entre ellas la presión derivada de la transición al cultivo *in vitro*; estudios realizados tras el aislamiento de virus patogénicos mostraron la aparición en cultivo de virus atenuados (Díez y cols, 1988). El estudio de la evolución de secuencias de los genes *gag* y *tat* del VIH-1 en un paciente a lo largo de dos años y comparando la secuencia nucleotídica de las muestras secuenciales sin adaptar a cultivo con las de los virus aislados en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) permitió observar que el cultivo puede alterar la cuasiespecie presente *in vivo* respecto a la detectada *ex vivo* (en la que el grado de variabilidad genética detectado fue menor) (Meyerhans y cols, 1989). Estudios posteriores en el gen *nef* y la región U3/R de la LTR 3' (Delassus y cols, 1991) y en el gen *env* (Kusumi y cols, 1992) corroboraron las

observaciones anteriores, añadiendo que el cultivo parece seleccionar poblaciones presentes de manera minoritaria en el individuo. En el gen *pol* se han observado diferencias genotípicas en los aminoácidos 67, 70 y 215 de la RT (implicados en la resistencia a AZT) entre el provirus sin adaptar a cultivo y el virus aislado en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) a partir del plasma de un paciente tratado con AZT (Smith y cols, 1993). En este caso, sin embargo, las diferencias observadas pueden deberse al cultivo o a que las poblaciones víricas que circulan en plasma pueden ser distintas de las integradas en las células mononucleares de sangre periférica (Simmonds y cols, 1991).

1.5.2 Variabilidad fenotípica

Los variantes del VIH-1 pueden mostrar diferencias en muchas propiedades fenotípicas entre las que destacan:

- i)* La velocidad de replicación,
- ii)* El tropismo por distintas líneas celulares y
- iii)* La capacidad de inducir sincitios. Esta propiedad biológica está unida a la capacidad de infectar células T de manera continua y productiva (Meltzer y cols, 1990; Schuitemaker y cols, 1991).

Los tres parámetros anteriormente citados se han correlacionado con el avance de la enfermedad: en pacientes con SIDA o CRS se observó una mayor tasa de replicación y el tropismo del virus por líneas celulares de linfocitos T (Asjö y cols, 1986) (Fig 1.8). El estadio avanzado de la enfermedad está frecuentemente relacionado con el aislamiento de virus capaces de inducir sincitios en cultivos primarios de células mononucleadas de sangre periférica (CMSP) (Tersmette y cols, 1988; Fenyö y cols, 1988). El cambio de fenotipo no inductor de sincitios (NIS) a inductor de sincitios (IS) se ha relacionado con la progresión de la enfermedad (Cheng-Mayer y cols, 1988; Tersmette y cols, 1989; Connor y Ho, 1994). El estudio de clones de aislados con fenotipo NIS mostró la presencia únicamente de subpoblaciones que mostraban carácter NIS. Sin embargo, en el caso de aislados con fenotipo IS, el estudio reveló la presencia de subpoblaciones con carácter IS y de subpoblaciones con carácter NIS (Tersmette y cols, 1990; Groenink y cols, 1991).

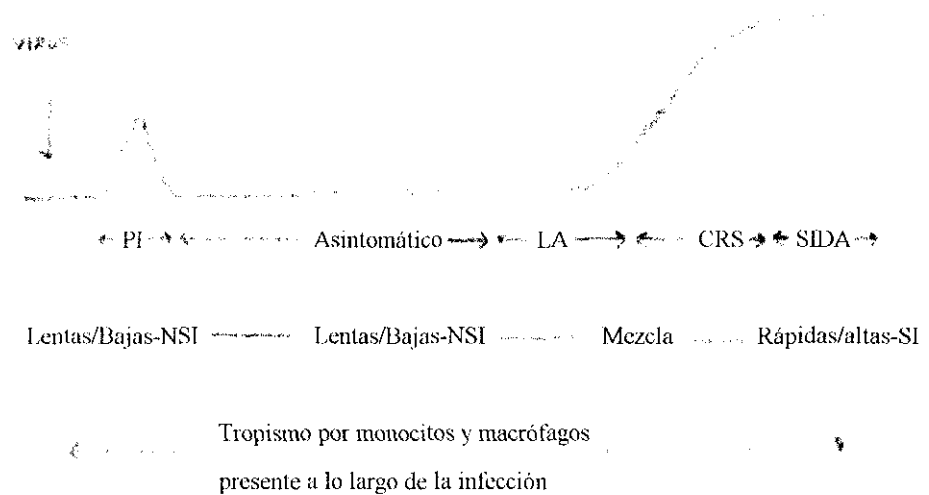


Figura 1.8. Esquema de la patogénesis de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana en relación con la variabilidad fenotípica observada al avanzar la enfermedad. La línea representa la viremia, determinada por los niveles de antígeno p24 libre en la sangre. PI, primoinfección. LA, linfadenopatía. CRS, complejo relacionado con el SIDA. SIDA, síndrome de la inmunodeficiencia adquirida. Se indica la variación del fenotipo en cuanto a la cinética de replicación vírica a lo largo de la evolución de la enfermedad así como en cuanto a la capacidad de formación de sincitios. IS: fenotipo inductor de sincitios. NIS: fenotipo no inductor de sincitios.

1.5.3 Variación antigénica

La variación antigénica se ha estudiado por ensayos de neutralización llevados a cabo con sueros autólogos (Albert y cols, 1990; von Gegerfelt y cols, 1991; Wahlberg y cols, 1991). Se han aislado anticuerpos neutralizantes específicos contra el VIH-1 durante la primoinfección sintomática al cabo de 2 a 4 semanas de la detección de los primeros síntomas; estos anticuerpos se mantienen durante un largo período de tiempo. Sin embargo al avanzar la infección la diversidad antigénica incrementa detectándose variantes con distinta susceptibilidad a la neutralización (Cheng-Mayer y cols, 1988; Albert y cols, 1990; Arendrup y cols, 1992). Los virus resistentes a sueros autólogos detectados pueden ser neutralizados por sueros de otros individuos infectados por el VIH-1. Esta resistencia a sueros autólogos podría estar determinada por cambios en la región V3 de la glicoproteína de la envuelta gp120 (Wahlberg y cols, 1991).

1.5.4 La importancia de la variabilidad genética en el ciclo infectivo del VIH-1

Los ejemplos descritos en las secciones anteriores destacan la importancia que tiene la continua variación genética y fenotípica del VIH-1 tanto para su supervivencia durante la pandemia como en sus propiedades patogénicas en cada individuo infectado. Actualmente se reconoce que será muy difícil desarrollar una vacuna capaz de proteger de modo efectivo contra una población natural de virus circulantes, incluso frente a aquellos de un área geográfica definida. Otro punto cada vez más de manifiesto es que el tratamiento prolongado con agentes antirretrovíricos ocasiona en la mayoría de los pacientes la aparición de variantes del virus con menor susceptibilidad a dichas drogas. Incluso la terapia combinada ha seleccionado virus con mutaciones múltiples que confieren al virus susceptibilidad reducida a dicho tratamiento (Larder y cols, 1993; Emini y cols, 1993). Esto plantea la urgencia de hallar nuevos tratamientos para el control del SIDA que continúe su expansión pandémica.

Esta Tesis Doctoral es una contribución al estudio de algunos aspectos de la variabilidad del VIH-1, fundamentalmente el análisis de la aparición de variantes con susceptibilidad reducida a inhibidores de la retrotranscriptasa.

1.6 OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es el estudio del fenómeno de la aparición de variantes del VIH-1 con susceptibilidad reducida frente a inhibidores de la retrotranscriptasa.

1. Estudio de la aparición de variantes del VIH-1 resistentes a AZT, ddi y ddC *in vivo* en presencia de la presión selectiva de la droga.

1.1 Estudio de muestras de pacientes en tratamiento con AZT

1.2 Estudio de muestras de pacientes en tratamiento con ddi

1.3 Estudio de muestras de pacientes en tratamiento con ddC

2. Estabilidad del genotipo de resistencia a AZT tras pases seriados en ausencia de la presión selectiva de la droga.

3. Identificación de variantes del VIH-1 resistentes a inhibidores de la RT *ex vivo* en ausencia de la presión selectiva de dichas drogas.

3.1 Estudio de muestras de pacientes no sujetos a tratamiento antirretroviral

3.2 Estudio de muestras de pacientes en tratamiento con AZT

3.3 Estudio de muestras de pacientes en tratamiento con ddi

3.4 Estudio de muestras de pacientes en tratamiento con ddC

4. Estudio de las cuasiespecies naturales del VIH-1 en la región del gen *pol* que codifica la RT.

4.1 Estudio de muestras de pacientes sujetos a tratamiento antirretroviral

4.2 Estudio de muestras de pacientes no sujetos a tratamiento antirretroviral

5. Variabilidad genética del VIH-1 en la región del gen *pol* que codifica la RT

5.1 Frecuencia de mutantes detectada en la secuencia consenso de muestras aisladas y replicadas en cultivos celulares

5.2 Frecuencia de mutantes detectada en la secuencia consenso de muestras no adaptadas a cultivos celulares

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 MUESTRAS

Las muestras proceden de pacientes infectados por VIH-1 con una de las siguientes características respecto al tratamiento antirretrovírico recibido:

- i)* no tratados con inhibidores de la transcriptasa inversa,
- ii)* tratados con AZT únicamente,
- iii)* tratados con AZT en combinación con factor humoral del timo ("Thymic humoral factor", THF) (Trainin, 1990),
- iv)* tratados con ddi,
- v)* tratados con ddC y
- vi)* tratados con ddi tras al menos 8 semanas de tratamiento con AZT.

En las Tablas 2.1, 2.2 y 2.3 se detallan *i)* las vías de infección, *ii)* la fecha de la toma de la muestra estudiada, *iii)* el sexo, *iv)* la edad, *v)* el tipo de tratamiento recibido y *vi)* el estadio clínico siguiendo la clasificación del CDC

i) para adultos (CDC, 1986)

- Grupo I- Infección aguda
- Grupo II- Infección asintomática
- Grupo III- *Linfadenopatía generalizada persistente*
- Grupo IV- Otras enfermedades
 - Subgrupo A: Enfermedad constitucional
 - Subgrupo B: Enfermedades neurológicas
 - Subgrupo C: Infecciones oportunistas
 - Categoría C1: diagnósticas de SIDA
 - Categoría C2: otras infecciones
 - Subgrupo D: Neoplasias asociadas
 - Subgrupo E: Otros procesos

ii) para menores de 13 años (CDC, 1987).

- P0 Infección indeterminada en niños menores de 18 meses expuestos durante el período neonatal y con anticuerpos anti-VIH.
- P1 Infección asintomática
 - P1A Función inmune normal
 - P1B Función inmune anormal
 - P1C Función inmune no estudiada
- P2 *Infección sintomática*
 - P2A Hallazgos inespecíficos
 - P2B Enfermedad neurológica progresiva
 - P2C Neumonía intersticial linfocítica
 - P2D Enfermedades infecciosas secundarias
 - D1 Las enumeradas en la definición de SIDA del CDC
 - D2 Infecciones bacterianas graves y recurrentes
 - D3 Otras (candidiasis oral persistente, estomatitis herpética recidivante, herpes zoster diseminado)
- E Cánceres secundarios
 - E1 Los enumerados en la definición de SIDA
 - E2 Otros
- F Otras enfermedades posiblemente debidas a la infección por VIH.

La Tabla 2.1 muestra los datos de los virus aislados en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) y posteriormente replicados en células

MT-2 (secciones 2.2 y 2.3). Las Tablas 2.2 y 2.3 recogen los datos referentes a virus que no sufrieron ninguna adaptación a cultivo.

Tabla 2.1. Virus aislados y replicados en células MT-2

Muestra	V. Infección ^a	Fecha ^b	E. Clínico ^c	Sexo	Edad	Tratamiento ^d
88 ^{#, @}	ADVP	26.06.89	IV C1	M	37	0
2038P ^{#, @}	ADVP	8.05.90	III	M	23	AZT-44
2038 ^{#, @}	ADVP	8.05.90	III	M	23	AZT-44
3018P ^{#, @}	ADVP	21.02.91	III	F	27	AZT-96
D5/-2 ^{#, @}	ADVP/Hom	18.04.91	IV C1	M	38	AZT>8
D9/+4 ^{#, @}	ADVP	1.08.91	IV C1	M	32	AZT>8+ddl-4
D12/-2 ^{#, @}	ADVP	11.06.91	IV C1	F	28	AZT-26
41 [#]	ADVP	17.03.89	IV C1	M	20	nd
306 ^{#, @}	Vertical	17.01.91	P2D1	F	3	AZT-106
307P ^{#, @}	Vertical	17.01.91	P2D1	M	7	AZT-12
307 ^{#, @}	Vertical	17.01.91	P2D1	M	7	AZT-12
165 ^{#, @}	Vertical	28.11.89	P1B	M	3	0
61 [#]	Vertical	28.04.89	P2	M	4	0
259 [#]	Vertical	16.11.90	P2	M	5	0
310P ^{#, @}	Vertical	25.01.91	P2D1	M	2	AZT-92
310 ^{#, @}	Vertical	25.01.91	P2D1	M	2	AZT-92
334P ^{#, @}	Vertical	15.10.91	P2	M	2	AZT-116
108M ^{#, @}	Vertical	21.09.89	P2D2	F	4	AZT-40
341 ^{#, @}	Vertical	24.10.91	P2	M	8	AZT-48
167 [#]	Transf./1979	28.11.89	IV C1	F	15	AZT-28
302 ^{#, @}	Transf./1982	15.01.91	P2 D1	F	11	AZT-24
303 ^{#, @}	Transf/nd	15.01.91	P2	F	17	AZT-84
304P ^{#, @}	Transf./1984	15.01.91	P2 D1	M	6	AZT-88
304 ^{#, @}	Transf./1984	15.01.91	P2 D1	M	6	AZT-88
2051 ^{#, @}	Hom.	31.05.90	II	M	28	AZT-48
2076 [#]	Hom.	23.08.90	II	M	29	AZT-56
2104 [#]	Hom.	15.11.90	II	M	29	AZT-68
3015 [#]	Hom.	7.02.91	II	M	29	AZT-78
2080 ^{#, @}	Hom.	4.09.90	III	M	36	AZT-41
3005 ^{#, @}	Hom.	10.01.91	III	M	44	AZT-88
D17/-2 ^{#, @}	Hom.	23.07.91	IV C1	M	39	AZT-94
095-2 ^{#, @}	Hom.	nd	nd	M	nd	AZT-14
191-1 [#]	Hom.	nd	nd	M	nd	AZT-120
035-5 [#]	Hom.	nd	nd	M	nd	AZT-20
022 [#]	Hom.	nd	nd	M	nd	AZT-120
117 [#]	Hom.	nd	nd	M	nd	AZT-48
120 [#]	Hom.	nd	nd	M	nd	AZT-120
P022-A ^{#, @}	Hom.	nd	nd	M	nd	0
P022-D ^{#, @}	Hom.	nd	nd	M	nd	AZT-64

^aVía de infección (adicción a droga por vía parenteral (ADVP), transmisión homosexual (Hom), heterosexual (Het), vertical o transfusión sanguínea (Transf) (en estos casos, se indica la fecha de la transfusión sanguínea). ^bToma de la muestra. ^cEstadio clínico según la clasificación del CDC. ^dTratamiento y duración en semanas. Las muestras en cuadrado son secuenciales del mismo paciente. [#] muestras analizadas por el método de muestreo. [@] muestras analizadas por secuenciación. nd: no determinado.

Tabla 2.2. Virus estudiados directamente de CMSP procedentes de pacientes en tratamiento

Muestra	V. Infección ^a	Fecha ^b	E. Clínico ^c	Sexo	Edad	Tratamiento ^d
304/P0	Transf/1984	15.01.91	P2D1	M	6	AZT-88
P2	Vertical	15.11.93	P2D2	M	11	AZT-16
P3	Transf/	15.11.93	P2ACD3	F	12	AZT-48
P4	Vertical	22.11.93	P2ABD2	M	7	AZT-60
P8	Vertical	13.12.93	P2AD2	M	1	AZT-20
P13	Vertical	17.01.94	P2D2	F	6	AZT-32
P14	Transf/	24.01.94	P2AD1D3	F	13	AZT-96
P15	Vertical	24.01.94	P2DAD1D3	F	1	AZT-60
P16	Vertical	24.01.94	P2ADCD1D3	F	9	AZT-96
P20	Het	7.02.94	P2AD3	F	14	AZT-28
P21	Vertical	14.02.94	P2ABCD3D2	M	3	AZT-40
P23	Vertical	14.02.94	P2E	F	4	AZT-40
D12/+20	ADVP	12.12.91	IV C1	F	28	AZT-48
D12/+58	ADVP	11.11.93	IV C1	F	30	AZT-86
D17/+20	THS	7.01.92	IV C1	M	39	AZT-116
D25/+24	ADVP	6.05.92	IV C1	M	29	AZT-84
D29/-2	ADVP	5.12.91	IV C1	F	33	AZT-24
D31/-2	ADVP	9.01.92	IV C1	F	24	AZT-32
D31/+8	ADVP	26.03.92	IV C1	F	24	AZT-42
D31/+24	ADVP	14.12.93	IV C1	F	25	AZT-124
D35/-2	Hom	30.01.92	IV C1	M	46	AZT-24
V75-2	Homo	05.88	III	M	27	AZT-20
V75-9	Homo	05.90	III	M	nd	AZT-12
V75-4	Homo	06.91	II	M	42	ddl-44
V75-6	Homo	06.90	III	M	43	ddC-24
D8/+44	ADVP	21.04.92	IV C1	M	27	AZT-8 + ddl-44
D16/+52	ADVP	12.08.92	IV C1	M	33	AZT-40+ddl-52
D22/+28	Hom	17.05.92	IV C1	M	35	AZT-64 + ddl-28
D22/+36	Hom	20.07.92	IV C1	M	35	AZT-64 + ddl-36
D22/+48	Hom	17.09.92	IV C1	M	36	AZT-64 + ddl-44*
D28/+28	Hom	27.07.92	IV C1	F	32	AZT-116 + ddl-28
D29/+28	ADVP	22.07.92	IV C1	F	33	AZT-24 + ddl-28
D35/+4	Hom	12.03.92	IV C1	M	46	AZT-24 + ddl-4
THF13/+24	Het	7.07.92	II	F	30	(AZT + THF)-24
THF17/+4	ADVP	10.03.92	II	F	24	(AZT + THF)-4

^a Vía de infección (adicción a droga por vía parenteral (ADVP), transmisión homosexual (Hom), heterosexual (Het), vertical o transfusión sanguínea (Transf) (en estos casos, se indica la fecha de la transfusión sanguínea). ^b Toma de la muestra. ^c Estadío clínico. ^d Tratamiento y duración en semanas. * En el momento de la toma de la muestra al paciente se le había suprimido el tratamiento antirretroviral. Las muestras que comienzan con D van seguidas del número de paciente y del número de semanas en el tratamiento correspondiente. n.d: no determinado.

Tabla 2.3. Virus estudiados directamente de CMSP procedentes de pacientes españoles no tratados con inhibidores de la RT.

Virus	V. Infección ^a	Fecha ^b	E. Clínico ^c	Sexo	Edad
137	ADVP/Hom	11.92	IVC1	F	27 años
276	Hom/Het	11.92	IVC1	F	28 años
26	Vertical	27.04.93	P2ABCD2D3D1	F	3 meses
17	Vertical	19.04.93	P2A	F	9 meses
34	ADVP	5.05.93	nd	F	30 años
35	Vertical	5.05.93	P2AC	F	8 meses
49	Vertical	17.05.93	P2AD3	M	1 año
106	ADVP	9.06.93	II	F	33 años
108	Vertical	23.09.93	P2A	F	8 meses
GR-34	ADVP	12.93	II	F	29 años
THF13/2	Het	26.12.91	II	F	30 años
SAF15	Het	12.93	II	F	37 años
V75-1	Homo	04.86	II	M	27 años
V75-3	Homo	08.90	III	M	42 años
V75-5	Homo	12.89	III	M	43 años
V75-7	Homo	11.86	IV C1	M	35 años
P5	Vertical	29.11.93	P2AD3	F	8 años
P6	Vertical	29.11.93	P2AD3	F	3 años
P9	Vertical	20.12.93	P2AD23B	F	3 años
P11	Vertical	4.01.94	P2D2	M	3 años
P12	Vertical	17.01.94	P2D2	F	3 años
P17	Vertical	31.01.94	P2AD3	F	5 años
P18	Vertical	31.01.94	P2D2AD3	F	6 años
P19	Vertical	31.01.94	P2A	F	6 años
58	Vertical	9.06.93	P2D2D1	F	5 meses

^a Vía de infección (adicción a droga por vía parenteral (ADVP), transmisión homosexual (Hom), heterosexual (Het), vertical o transfusión sanguínea (Transf) (en estos casos, se indica la fecha de la transfusión sanguínea). ^b Toma de la muestra. ^c Estado clínico. ^d Tratamiento y duración en semanas. nd: no determinado

2.2 AISLAMIENTO DE VIH-1

El aislamiento del VIH-1 se llevó a cabo a partir de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) y de plasma de pacientes infectados, por cocultivo con células mononucleares de sangre periférica de donantes sanos, previamente estimuladas con 2.5 $\mu\text{g/ml}$ de fitohemaglutinina (DIFCO) durante 72 horas. Los cocultivos incluyeron $5 \cdot 10^6$ CMSP de paciente en 5 ml de medio RPMI 1640 (Flow) con suero bovino fetal inactivado al 10% (SBF, de Gibco), L-Glutamina 2mM (Flow), 100 $\mu\text{g/ml}$ de penicilina (Antibióticos S.A), 100 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomycin (Antibióticos S.A), Tilosina al 5% (Flow) y con 5u/ml de interleuquina 2 (IL-2) (Genzyme). Se añadieron CMSP de donante sano una vez por semana, recogiendo sobrenadante del cultivo para la detección de antígeno p24 mediante un ELISA de captura (Abbott). El cocultivo se mantuvo un total de cuatro semanas a 37 °C en atmósfera 5% de CO₂. Este mismo protocolo se aplicó para el aislamiento de VIH-1 a partir de plasma.

2.3 REPLICACION DE AISLADOS DE VIH-1 EN CELULAS MT-2

Los sobrenadantes de cocultivo de CMSP o cultivo de plasma con CMSP positivos para VIH-1 en ELISA de antígeno p24, se emplearon para la infección de la línea celular establecida MT-2 (cedida por el Dr. DD Richman, UCSD). Esta línea linfocítica CD4+ se obtuvo, originalmente, por co-cultivo de linfocitos de sangre periférica de un individuo infectado con el virus de la leucemia humana de células T tipo I (HTLV-I) con linfocitos de cordón umbilical de un donante sano (Harada y cols, 1985).

2.4 PRODUCCION DE INOCULOS VIRICOS

Se infectaron $1 \cdot 5 \cdot 10^6$ células MT-2 en un volumen de 5 ml de medio de cultivo completo. Se incubaron a 37 °C en atmósfera 5% de CO₂ hasta observar un efecto citopático que afectaba aproximadamente a un 75% de las células (ECP +3). En ese momento se añadieron $30 \cdot 10^6$ células MT-2 y se mantuvo el cultivo (30 ml), en las condiciones previamente descritas hasta obtener ECP +3 (Richman, 1990^c). El medio de cultivo se clarificó por centrifugación a 1200 rpm durante 10 minutos. Este sobrenadante infectado con VIH-1 se almacenó a -70 °C hasta su utilización.

2.5 TITULACION DE LOS INOCULOS VIRICOS

Los inóculos viricos obtenidos se titularon en células MT-2 por detección de ECP en diluciones seriadas del sobrenadante (dilución límite) tras una semana de cultivo. Se infectaron $2 \cdot 10^6$ células MT-2 por pocillo, en placas de 96 pocillos (Nunc), con 20 μ l de cada dilución vírica a ensayar hasta la dilución 10^{-6} . Las placas se incubaron a 37°C en atmósfera 5% CO₂ durante 7 días. Las dosis infectivas 50 (DI₅₀) se calcularon según el método de Spearman-Kärber (1931).

2.6 ENSAYOS DE SUSCEPTIBILIDAD A DROGAS

Se infectaron células HeLa que expresan el receptor CD4 (Chesebro y Wehrly, 1988) con VIH-1 en presencia de diluciones seriadas de droga. La sensibilidad al inhibidor se determinó por la reducción de formación de focos de sincitios (placas) en las infecciones y se expresó en la concentración a la que la replicación vírica se inhibe un 50% (concentración inhibitoria 50, CI₅₀) (Richman, 1993).

2.7 PASES SERIADOS DE AISLADOS RESISTENTES A AZT

Los pases en cultivo se llevaron a cabo infectando $5 \cdot 10^6$ células MT-2, bien a multiplicidad de infección (m.d.i) 0.1 DI₅₀/célula, bien a 0.001 DI₅₀/célula (Fig. 2.1) (Sánchez-Palomino y cols; 1993). Los cultivos se mantuvieron a 37°C en atmósfera 5% CO₂ hasta la observación de ECP +3. Tras esto, se separó el sobrenadante de las células según lo descrito en 2.4 y se infectaron $5 \cdot 10^6$ células MT-2 con la misma cantidad de sobrenadante utilizada para la infección inicial.

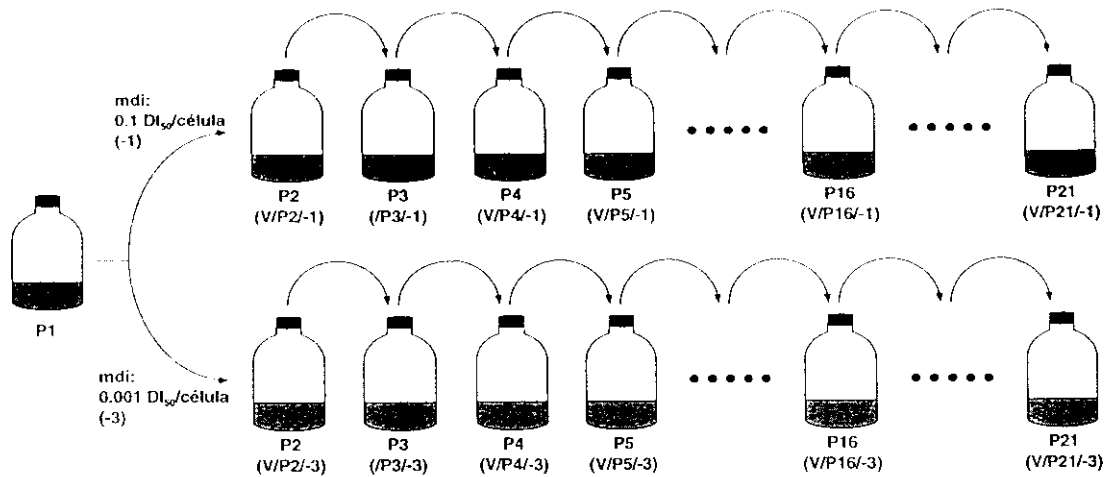


Figura 2.1. Esquema de los pases seriados en cultivo. Entre paréntesis se indica la nomenclatura seguida para denominar los virus estudiados. V representa el nombre de la muestra (las muestras estudiadas son 302, 304, 306 y 108M, indicadas en la Tabla 2.1). P indica el número de pase y -1 o -3 indican la multiplicidad de infección (0.1 o 0.001 DI_{50} /célula).

2.8 METODO DE DETECCION DE DESAPAREAMIENTOS POR DIGESTION CON RIBONUCLEASA A

Este método, inicialmente descrito por Winter y cols (1985) y por Myers y cols (1985), para la detección de mutaciones en el DNA genómico, se basa en la capacidad de la ribonucleasa A (RNasa A) de hidrolizar en sitios de híbridos o heterohíbridos en los que se localizan una o más bases desapareadas. Se aplica tanto para heterohíbridos RNA:DNA (Myers y cols, 1985) como para homodímeros RNA:RNA (Winter y cols, 1985). El ensayo consiste en hibridar una ribosonda marcada con ^{32}P con la muestra a estudiar, DNA o RNA, no marcada. El híbrido se digiere con RNasa A en condiciones parciales y los fragmentos obtenidos se analizan en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (Fig. 2.2).

Este método se ha empleado para el estudio de variabilidad genética de varios virus RNA como el virus de la gripe (López-Galindez y cols, 1988), cucumovirus (Owen y Palukaitis, 1988), virus respiratorio sincicial humano (Cristina y cols, 1990, 1991) o el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

(López-Galíndez y cols; 1991). El método de detección de desapareamientos por digestión con RNasa A también se ha aplicado al estudio de mutaciones en DNA (Myers y cols; 1985, Almoguera y cols; 1988, López-Galíndez y cols; 1991 y Rojas y cols; 1993).

2.8.1 Obtención de RNA

El sedimento de $25 \cdot 10^6$ células MT-2 se lavó con PBS y se resuspendió en cloruro de guanidina 7M a 4°C siguiendo el método de Winter y cols (1985). Tras intensa agitación, para fragmentar el DNA por fuerzas de cizalla, el RNA se precipitó con 2.5 volúmenes de etanol a -20°C durante la noche. El precipitado se centrifugó a 14000 rpm durante 30 minutos y se resuspendió en 400 μ l de tampón de extracción. La disolución se extrajo dos veces con fenol. La fase acuosa se precipitó de nuevo con NaCl 0.3M y etanol. El RNA precipitado se secó en vacío y se resuspendió en 30 μ l de agua destilada estéril y libre de RNasas.

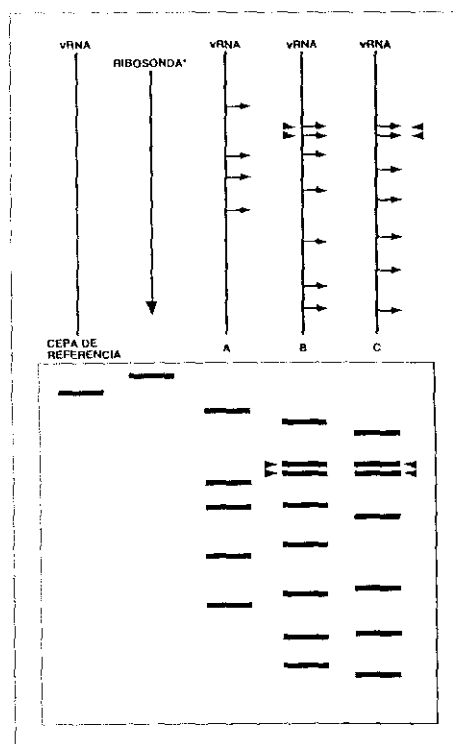


Figura 2.2. Esquema del método de detección de desapareamientos por digestión con RNasa A. La hibridación de la ribosonda con distintos RNA o DNA da lugar a distintos patrones de banda tras su digestión con RNasa A dependiendo del número de desapareamientos presentes. En la figura se observa que la hibridación con muestras que presentan distintas mutaciones puntuales (muestras A, B y C) produce fragmentos de distinto peso molecular. La presencia de bandas comunes en el patrón es indicativa de la existencia de una relación filogenética entre las muestras.

2.8.2 Síntesis de ribosondas radiactivas

2.8.2.1 Preparación del plásmido para la síntesis de la ribosonda RT 5'

El plásmido pP1-delección Eco RV (procedente de subclonajes en BlueScript del clon BH10 de LAI) incluye la región genómica de la transcriptasa inversa del VIH-1 que cubre los aminoácidos 25 al 144 (López-Galíndez y cols, 1991) (Fig. 2.3). Se linearizó con la endonucleasa de restricción MscI y se obtuvo una ribosonda de 360 nucleótidos (posiciones 2202 al 2562 del genoma del VIH-1 según Ratner y cols, 1985). Tras la digestión, se cuantificó el material en un gel de 1% de agarosa en TAE, por tinción con bromuro de etidio (10 µg/ml) y visualización por luz UV.

2.8.2.2 Preparación del plásmido para la síntesis de la ribosonda RT 3'

La sonda que cubre la región 3' del gen que codifica por la RT, tiene 325 nucleótidos de longitud (posiciones 2559-2884 del genoma del VIH-1, aminoácidos 144 al 252) (Fig. 2.3). Se preparó linearizando el plásmido pPSP con la endonucleasa de restricción Eco RV (López-Galíndez y cols, 1991). El producto de la digestión se cuantificó como se ha descrito en 2.8.2.1.

2.8.2.3 Transcripción *in vitro*

Para la síntesis de la ribosonda, el plásmido se transcribió *in vitro* mediante la RNA polimerasa del fago T7 (10 unidades) y 2.5 mM de rATP, rUTP y rGTP, 50 µCi de $\alpha^{32}\text{P}$ -CTP (400 Ci/mmol). El volumen de reacción fue de 20 µl, en Tris-HCl 40 mM pH 7.9, NaCl 10 mM, MgCl₂ 6 mM, DTT 10 mM, espermidina 2 mM y 2.5 unidades de inhibidor de ribonucleasas (RNasina; Promega). Tras 45 min a 37°C, se añadieron 10 unidades de enzima y se dejó otro periodo de transcripción de 45 min. Este proceso se terminó tras la adición de 1 unidad de DNasa I e incubación a la misma temperatura durante 15 min. La ribosonda se purificó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 5%-7M urea. La ribosonda se eluyó del gel por tratamiento de éste con acetato amónico 2M y SDS al 0.1% en un volumen de 375 µl a 37°C durante la noche. Tras su elución, la sonda se precipitó en etanol absoluto en presencia de 30µg de RNAt de levadura. Finalmente, se resuspendió en 100 µl de solución de hibridación (formamida 85%, NaCl 0.4M, EDTA 1 mM, Pipes 40 mM pH 6.7).

2.8.3 HIBRIDACION DE LA RIBOSONDA CON EL RNA MUESTRA Y DIGESTION CON RNasa A

El RNA total de células MT-2 infectadas (aproximadamente 1µg), preparado según lo descrito en el apartado 2.7.1, se desnaturalizó a 95°C durante 3 min. El RNA desnaturalizado se hibridó con $3 \cdot 10^5$ cpm de ribosonda. La reacción tuvo lugar a 55°C durante 3.5 horas en presencia de 30 µg de RNAt de levadura y en un volumen final de 30 µl.

La digestión parcial con RNasa A, a una concentración de 40 µg/ml, se realizó a 30°C durante 30 min. La reacción finalizó por tratamiento con 100 µg de proteinasa K, 10 µg de RNAt y 20 µl de SDS al 10% a 37°C durante 15 min. Tras tres extracciones con fenol-cloroformo-álcool isoamílico (25:24:1), el producto se precipitó con 2.5 volúmenes de etanol y se resuspendió en 15 µl de tampón de electroforesis (97% formamida, SDS 0.1%, Tris-HCl 10 mM pH 7.0, azul de bromofenol y xilencianol 0.01%).

Los fragmentos obtenidos se analizaron en un gel de acrilamida al 6% -urea 8M en TBE, en primer lugar en geles de 20 cm de largo y 1.5 mm de espesor, a 300 V durante 2 horas. Tras este primer análisis, se llevó a cabo un segundo gel de 50 cm de largo y 0.4 mm de espesor de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. Estos geles se corrieron a 1300 V durante 3 horas, tras lo cual se expusieron a -70°C utilizando pantallas amplificadoras de la señal radiactiva.

2.8.4 INCORPORACION DE RADIATIVIDAD AL MARCADOR DE PESO MOLECULAR ØX174-Hae III

Se empleó DNA de la forma replicativa del fago ØX174, digerido con la endonucleasa de restricción Hae III como marcador de peso molecular. El DNA digerido se marcó en su extremo 3' con $\alpha^{32}\text{P}$ -dGTP. Para ello, se utilizó 1 unidad del fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli*, una mezcla de desoxinucleótidos dATP, dCTP y dTTP en una concentración 100 µM, 10 µCi de $\alpha^{32}\text{P}$ -GTP en tampón Tris-HCl 0.5M pH 7.5, MgCl_2 0.1M, DTT 10 mM y BSA 0.5 mg/ml, en un volumen final de 100 µl. La mezcla se incubó durante 30 min. a temperatura ambiente. El DNA se precipitó en presencia de 10 mg/ml de RNAt y se resuspendió en 50 µl de agua.

2.9 REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA Y SECUENCIACION CICLICA.

2.9.1 Obtención de ácido desoxirribonucleico.

La obtención de DNA de células MT-2 se llevó a cabo a partir de un sedimento de células lavado con PBS. Este se resuspendió en 1 volumen de solución Tris-HCl 10 mM pH 7.5, EDTA 10 mM, NaCl 0.15 M, con proteinasa K (200 µg/ml) y SDS 0.5%. Tras una incubación de 1 hora a 65°C y toda la noche a 37°C, se añadió 1 volumen de Tris-HCl 10 mM pH 8.5, EDTA 10 mM, NaCl 0.65 M. La mezcla se extrajo con 1 volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y a continuación con 1 volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). El DNA se precipitó con etanol y se resuspendió en TE o agua. La concentración se determinó por lectura de la densidad óptica a 260 nm.

La extracción de DNA de linfocitos de sangre periférica no cultivados congelados se llevó a cabo siguiendo el mismo protocolo, previa eliminación del medio de congelación por centrifugación a 1200 rpm durante 10 min. En cambio, la extracción de DNA a partir de linfocitos de sangre periférica frescos, se llevó a cabo utilizando un equipo comercial de extracción de ácidos nucleicos (Linus) basado en este mismo procedimiento.

2.9.2 Reacción en cadena de la polimerasa.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se llevó a cabo en tampón Tris-HCl 10 mM pH 8.3, KCl 50 mM, gelatina 0.01% y MgCl₂ 1.5 mM. La concentración de desoxinucleótidos fue de 0.125 mM. Se emplearon 100-200 ng de cada iniciador por ensayo y 1 unidad de enzima Ampli Taq polimerasa (Perkin-Elmer). El volumen de reacción fue de 25 a 100 µl. Se llevaron a cabo 30-35 ciclos con los siguientes perfiles, desnaturalización a 94°C durante 20 seg., hibridación de los iniciadores al DNA molde durante 1 min. a 55°C-60°C (dependiendo de la temperatura de hibridación de los iniciadores empleados) (Tabla 2.4) y una elongación de las cadenas a 72°C de 1 min. para aquellas amplificaciones de hasta 2.3 Kb. En ambos casos, las amplificaciones se comenzaron con una desnaturalización a 94°C de 5 min. y se finalizaron con una extensión de la elongación a 72°C durante 10 min. En el caso de amplificar DNA obtenido de PBMCs no sujetos a cultivo, se llevaron a cabo dos amplificaciones, una externa y una interna en la que se emplearon iniciadores internos del fragmento mayor (Fig. 2.3). Las amplificaciones se llevaron a cabo en termociclador Perkin-Elmer. Los

productos obtenidos se analizaron en geles de acrilamida al 8% en TBE en condiciones no desnaturalizantes o en geles de agarosa 1% en tampón TAE. Los iniciadores empleados, tanto para la PCR como para la secuenciación cíclica (sección 2.9.3), fueron sintetizados por Genetic Design (Texas), Biosynthesis, Pharmacia, CNMVIS (Instituto de Salud Carlos III) o Genosys (Tabla 2.4).

Tabla 2.4. Secuencia nucleotídica y localización en el genoma viral de los iniciadores empleados.

Nombre	Secuencia 5'→3' y localización genómica	Td	Th
3'RT	CTTATCTATTCCATCTAAAAATAGT (3830-3805) ^a (RT)	62°C	57°C
9GU	TAGGAACCAAAGAAAGATGGTTAAG (1482-1506) (GAG)	68°C	63°C
3RU	CGCGAAGCTTGGGCCTGAGAATCCATAC (2278-2297) (RT)	88°C	83°C
5GU	CAACATCTGTTGAGGTGGGGAATTCCCGC (1464-1486) (GAG)	66°C	61°C
47RU	GTATTAGTAGGACCTACACCT (2055-2075) (RT)	60°C	55°C
INU-NcoI	AAGCCAGCCATGGATGGCCAA (2166-2187) (RT)	66°C	61°C
INU	GCCAGGAATGGATGGCCAA (2168-2187) (RT)	64°C	59°C
4IRD	GCGGAATTCTGTATGTCATTGACAGTCCAGCT (2905-2880) (RT)	74°C	69°C
20RD	TCAGTCCAGCTGTCTTTTTCTGGC (2890-2867) (RT)	72°C	67°C
20RD-Pst I	ACAGTCCTGCAGTCTTTTTCTGGC (2890-2867) (RT)	72°C	67°C
20RD-BamHI	ATGGGATCCACAGTCCAGCTGTCTTTTTCTGGC (2890-2863) (RT)	100°C	95°C
14RD	TGAGACACCAGGGATTAGATATC (2561-2540) (RT)	68°C	63°C
17RU	GGATTAGATATCAGTACAATGTGCTT (2551-2576) (RT)	70°C	65°C

^a Los números corresponden a la posición en el genoma del VIH-1 según Ratner y cols (1985); RT= transcriptasa inversa. GAG= gen gag. Td es la temperatura de desnaturalización y Th la temperatura de hibridación.

2.9.3 Secuenciación cíclica de productos de PCR.

La secuenciación cíclica directa de productos de PCR, es una adaptación del método de secuenciación de terminadores de cadena de Sanger. Consiste en una amplificación por PCR asimétrica en presencia de didesoxinucleótidos y de un desoxinucleótido marcado radiactivamente (Peinado y cols, 1993). Aproximadamente 60 ng de DNA molde amplificado, se emplearon para cada secuenciación. Para cada DNA a secuenciar, se llevaron a cabo cuatro reacciones paralelas en cada una de las cuales estaba presente sólo uno de los didesoxinucleótidos trifosfato a la siguiente concentración: ddGTP (160 µM), ddATP y ddTTP (250 µM) o ddCTP (400 µM). Las reacciones se llevaron a cabo en tampón Tris-HCl 10 mM pH 8.3, KCl 50 mM, gelatina 0.01% y MgCl₂ 2.5

mM y los cuatro desoxinucleótido trifosfatos en concentración 12.5 μ M cada uno, 0.5 μ g de un iniciador, 10 μ Ci de α - 32 P-dCTP y dos unidades de enzima AmpliTaq polimerasa (Perkin-Elmer). Los productos se analizaron en geles de secuenciación, de acrilamida al 6%-urea 8M a 65-70 W.

En una modificación del método anterior, el DNA amplificado se purificó para la eliminación de dNTPs e iniciadores (Centricón 100; Amicón o Wizard PCRPreps, Promega). Se utilizaron alrededor de 30 ng de DNA molde, 30 ng de iniciador y 35 S-dATP (>600 Ci/mmol) (Amersham). Se empleó el equipo comercial de secuenciación de productos de PCR (fmol™ DNA Sequencing System, Promega), basado en el método previamente descrito. El producto se trató posteriormente con 1.25 unidades de desoxinucleotidiltransferasa terminal (TdT) (Boehringer Mannheim) y dNTPs durante 30 min. a 37°C. Esta enzima es capaz de incorporar dNTPs sin requerir molde, lo que permite elongar cadenas terminadas inespecíficamente por la Taq polimerasa (De Borde y cols, 1986). Los productos se analizaron en geles de acrilamida al 6%-urea 8M a 65-70 W, tras lo cual fueron fijados en acético-metanol al 10% y expuestos con una película para autorradiografía (X-Omat, Kodak o Curix, Agfa) a temperatura ambiente.

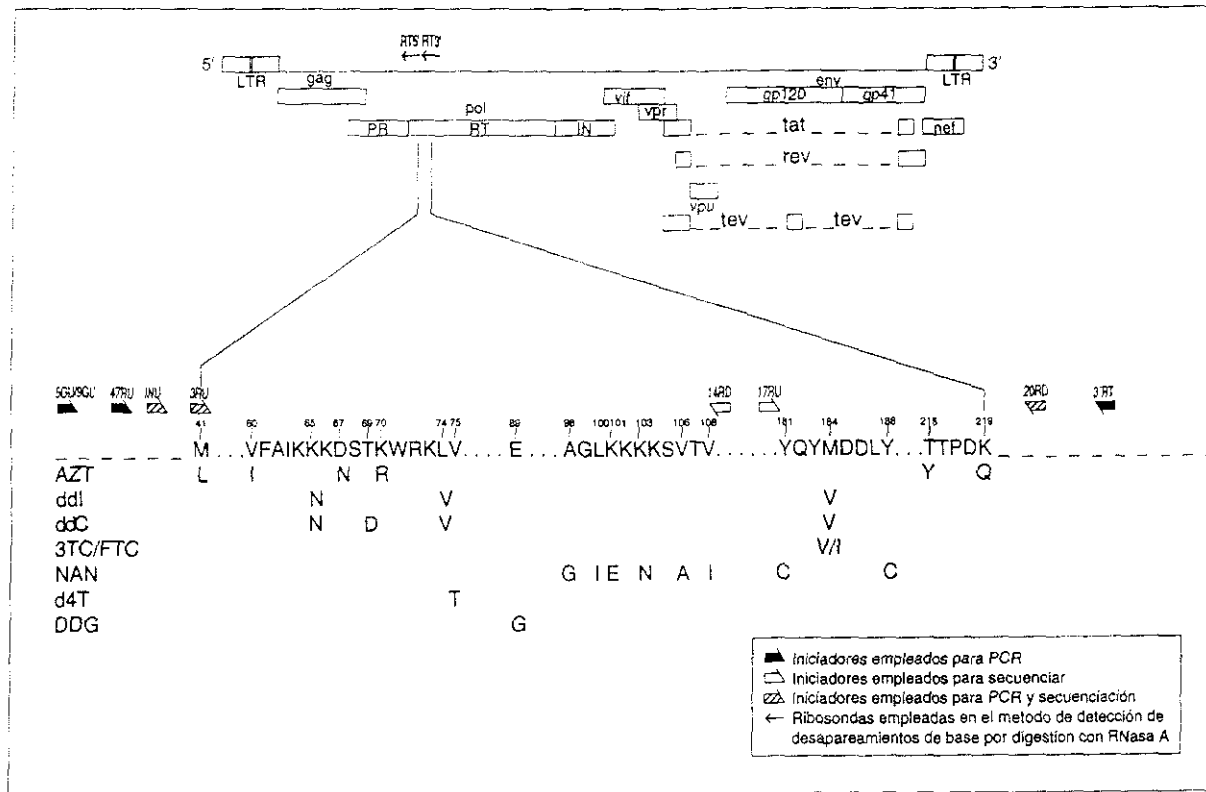


Figura 2.3. Esquema de las ribosondas empleadas para la DDRA, de los iniciadores empleados para la PCR y secuenciación y de los aminoácidos implicados en la resistencia a inhibidores de la RT. Se muestra el genoma del VIH-1, así como fragmentos de la secuencia de la RT implicados en resistencia a drogas. Los iniciadores empleados tanto para la PCR como para la secuenciación cíclica se indican con semiflechas, en negro los empleados para PCR, en blanco las empleadas para secuenciación y rayadas las empleadas para PCR y secuenciación). Se indican las sustituciones de aminoácidos en la RT implicadas en resistencia a inhibidores de la RT (indicados a la izquierda de la figura).

2.10 CLONADO MOLECULAR

2.10.1 Clonado molecular de muestras de VIH-1 amplificadas en células MT-2

Se llevó a cabo el clonado molecular de una región de 620 pb del dominio de polimerización de la RT. La aproximación empleada se basa en que las moléculas amplificadas por PCR incorporan desoxiadenosinas adicionales en el extremo 3'. Estos residuos protuberantes, se emplean para insertar el producto de PCR en un vector que contiene residuos desoxitimidina en el extremo 3' del sitio de inserción.

2.10.1.1 Preparación del inserto y ligación

Los insertos procedieron de una amplificación por PCR con los iniciadores 3RU y 20RD (Tabla 2.4) (Fig 2.3), según lo descrito en 2.2.9.2. La ligación con el vector pCRTM, de 3.0 Kb, tuvo lugar en una proporción molar vector:inserto 1:2, para lo que se emplearon 50 ng de vector y 20 ng de inserto, en un volumen final de 11 µl. La reacción de ligación se llevó a cabo con 4 unidades de enzima ligasa de T4 (Invitrogen) a 12°C durante 5 horas.

2.10.1.2 Transformación de bacterias competentes

Se añadieron 2 µl de β-mercaptoetanol 0.5 M a cada vial de 50 µl de células competentes *E. coli* INαF' (TA Cloning, Invitrogen). Tras una ligera agitación, se añadió 1 µl de mezcla de ligación (sección 2.10.1.1) y se incubó en hielo durante 30 min. Se dió un choque térmico a las bacterias de 45 segundos a 42°C y 2 min. en hielo. Se añadieron 450 µl de medio SOC (sección 2.12) a las células y se incubaron a 37°C durante 1 hora con agitación de 225 rpm. El producto de la transformación se extendió en placas de medio LB con kanamicina a una concentración de 50 µg/ml (Sambrook y cols, 1989) para la selección de recombinantes resistentes a dicho antibiótico. Para la selección de recombinantes por color se añadió 1 mg de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido (X-Gal) (Boehringer Mannheim) (20 mg/ml en dimetilformamida). Las placas se incubaron a 37°C durante toda la noche. Se obtuvieron colonias con DNA recombinante, seleccionadas por su color blanco, para su posterior análisis.

2.10.1.3 Obtención de DNA de plásmidos en pequeña escala

Cada colonia blanca (2.10.1.2) se transfirió a 5-10 ml de medio LB con kanamicina (50 µg/ml) (Sambrook y cols, 1989) y se incubó a 37°C durante la noche. Tras centrifugar a 2500 rpm durante 10 min., se resuspendió el sedimento de células en TE. La lisis se llevó a cabo con NaOH 0.2 M y SDS al 1% a 4°C durante 5-10 min. La solución se neutralizó con acetato sódico 3M pH 4.8 durante 5 min. y el sobrenadante se precipitó con etanol. El DNA plasmídico se resuspendió en 25-50 µl de TE. El DNA obtenido se analizó en geles de agarosa al 1% en tampón TAE.

2.10.2 Clonado de VIH-1 procedente de CMSP

Se emplearon dos aproximaciones, clonado de extremos cohesivos y clonado de extremos romos.

2.10.2.1. Obtención de DNA plasmídico en gran escala

Para la obtención de DNA plasmídico en gran escala, se inocularon 250 ml de medio LB con el plásmido y se incubaron a 37°C durante toda la noche. El cultivo se sedimentó por centrifugación y se resuspendió en 6 ml. de una solución Tris-HCl 25 mM pH 8.0, EDTA 10 mM, sacarosa al 15% y lizozima a una concentración de 2 mg/ml. Esta solución se mantuvo a 4°C durante 20 min. La lisis se llevó a cabo con NaOH 0.2M y SDS 1%. La solución se neutralizó con acetato potásico 3M pH 4.6 durante 15 min. a 4°C. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación y el sobrenadante se trató con RNasa A (1 mg/ml) durante 20 min. a 37°C. El material se extrajo dos veces con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico. El DNA se precipitó y se resuspendió en TE, NaCl 1.6 M y PEG 8000 al 13%. El plásmido se obtuvo por centrifugación a 4000 rpm a 4°C durante 15 min, y se resuspendió en TE (Sambrook y cols, 1989).

Para la obtención de DNA del plásmido pGEM5Zf(+) en gran escala se siguió el mismo protocolo con ligeras modificaciones según las indicaciones del equipo comercial de extracción de DNA plasmídico en gran escala (Maxipreps, Promega).

2.10.2.2 Preparación de bacterias competentes

Se inocularon 90 ml. de medio líquido LB con bacterias *E.coli* DH5 α y se incubaron a 37°C durante toda la noche y con agitación. 100 μ l del preinóculo se crecieron en 5 ml. de LB a 37°C y con agitación hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5 a 550 nm. Tras una incubación a 4°C de 10 min., se centrifugó el cultivo a 3000 rpm durante 15 min. a 4°C. El sedimento se resuspendió en 30 ml de tampón TFB1. Tras centrifugar a 5000 rpm, el sedimento se resuspendió en 4 ml de tampón TFBII y se repartió en alícuotas de 200 μ l, que se conservaron a -70°C.

2.10.2.3. Preparación de inserto y vector y ligación de extremos cohesivos

Se amplificó un fragmento de 722 pb con los iniciadores INU-Nco I y 20RD-PstI (Tabla 2.4) a partir de una amplificación externa, descrito en 2.9.2. El fragmento amplificado se sometió a digestión con las endonucleasas de restricción Nco I (1 unidad, Boehringer Mannheim) y Pst I (1 unidad, Boehringer Mannheim) y se purificó la banda deseada (716 pb) por separación en un gel de agarosa 1% en tampón TAE, empleando Gene Clean (BIO 101). Brevemente, se trató la agarosa con NaI a 55°C durante 3 min. y se añadieron 5 μ l de solución de polvo de vidrio. El NaI se eliminó por centrifugación. Tras tres lavados del sedimento con líquido de lavado, el DNA se eluyó con agua, tras una incubación de 3 min. a 50°C. El producto obtenido se cuantificó mediante electroforesis en un gel de agarosa 1% en TAE. Aproximadamente 1 μ g de pGEM5Zf(+) se digirió con 10 unidades de cada una de las enzimas a 37°C durante 3-5 horas. El vector linerizado se purificó por gel de agarosa como se ha descrito previamente. La ligación con el vector pGEM5Zf(+) se llevó a cabo en una proporción molar vector:inserto 1:2 a 1:6, incubando los productos de reacción durante toda la noche a 16°C.

2.10.2.4 Preparación de inserto con extremos romos por quinasación de iniciadores y posterior reparación de los extremos

Se amplificó un fragmento de 1725 pb con los iniciadores 47RU y 3'RT (Tabla 2.4). Se quinasaron 5 μ g de cada uno de los iniciadores INU y 20RD-BamHI (Tabla 2.4) con 9 unidades de T4 polinucleótido quinasasa (Promega) y 50 pmoles de ATP. La mezcla de reacción se incubó a 37°C durante 30 min. A continuación, se llevó a cabo la amplificación de los ácidos desoxirribonucleicos a clonar como se ha descrito en la sección 2.9.2.

Aproximadamente 1 μg de cada uno de los DNAs amplificados con los iniciadores quinasados se sometió a la reacción de reparación de extremos en presencia de desoxinucleótidos (0.05 mM) y 1 unidad de T4 DNA polimerasa, incubando la solución a 37°C durante 15 min. El producto se sometió a dos extracciones con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y a una extracción con éter y se precipitó en presencia de 1 μg de RNA de levadura a -20°C durante la noche. Finalmente, el DNA se resuspendió en TE y se cuantificó en un gel de agarosa 1% en TAE o TBE.

2.10.2.5 Ligación de extremos romos y transformación de bacterias competentes

La ligación se realizó a 23°C durante 8 horas en proporción molar vector:inserto 1:3 y 1:6 empleando 100 ng de vector. El volumen final de la reacción fue de 10 μl en presencia de Tris-HCl 20 mM, MgCl_2 10 mM, ditiotreititol 10 mM, ATP 0.6 mM pH:7.6, PEG 6000 al 5% y glicerol al 22% y 1 unidad (Boehringer Mannheim) o 200 unidades (New England Biolabs) de T4 DNA ligasa.

La transformación de las bacterias con las mezclas de ligación se llevó a cabo como se ha descrito en 2.10.1.2.

2.10.2.6 Muestreo de colonias recombinantes por hibridación con un oligonucleótido específico del inserto

La selección de colonias con inserto de DNA de VIH-1 se llevó a cabo, en algunos casos, por hibridación de las colonias a un oligonucleótido específico de VIH-1 marcado con $\gamma^{32}\text{PdATP}$ (~3000 Ci/mmol, 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$, Amersham). Para ello, el oligonucleótido 17 RU (Tabla 2.4) se marcó con 20 μCi de $\gamma^{32}\text{PdATP}$ como se ha descrito en 2.10.2.3. Las células se lisaron sobre un filtro de nitocelulosa (Micron Separations Inc.) por tratamientos sucesivos con SDS 10% durante 3 min, NaOH 0.5 M-NaCl 1.5 M durante 5 min. y neutralización en Tris-HCl 0.5 M pH:8.0-NaCl 1.5 M durante 5 min. El filtro se secó durante 1 hora a temperatura ambiente y 2 horas a 80°C al vacío. Tras esto, se sometió a dos pre-lavados de 1 hora a la temperatura de hibridación del oligonucleótido (55°C) en presencia de SSC 3x y SDS 0.1%. La pre-hibridación se realizó durante 2 horas a 55°C con SSC 6x, Denhardt's 1x, SDS 0.5%, 0.1 μg de esperma de salmón sonicado y previamente desnaturalizado (90°C durante 2 min.) y pirofosfato sódico 0.05%. Tras eliminar parte de la solución de pre-hibridación, se llevó a cabo la hibridación

de 40 μ l de oligonucleótido, marcado radiactivamente, a las colonias recombinantes. La reacción tuvo lugar en presencia de 0.5 mg de RNA de levadura a 55°C durante toda la noche. Por último, se llevaron a cabo tres lavados de 30 min. con SSC 6x y pirofosfato sódico 0.05%. El primero a temperatura ambiente y los dos siguientes a la temperatura de hibridación del oligonucleótido. Tras secar el filtro a 37°C, se expuso a -70°C durante 4 horas con una película de autorradiografía.

El DNA de las colonias recombinantes se extrajo según lo descrito en 2.10.1.3.

2.10.2.7 Secuenciación de plásmidos

El DNA plasmídico se desnaturalizó con NaOH 0.2N y EDTA 2 mM durante 30 min. a 37°C. El DNA se recuperó por precipitación con etanol y se resuspendió en TE o agua.

La secuenciación se llevó a cabo con el equipo comercial de secuenciación de plásmidos Sequenase Version 2.0 (USB). Se hibridaron 800 ng de DNA desnaturalizado con 4 ng de iniciador en tampón 40 mM Tris-HCl pH 7.5, 20 mM MgCl₂ y 25 mM NaCl. La reacción se realizó a 45°C durante 30 min. El marcaje se llevó a cabo con ditiotreitól 0.01M, 1.5 μ M de dGTP, dTTP y dCTP y 5 μ Ci de ³⁵SdATP. Se emplearon 1.6 unidades de DNA polimerasa del fago T7 (Sequenase, USB; Pharmacia) durante 1.5 min. a temperatura ambiente. Esta reacción finalizó por incorporación de didesoxinucleótidos (80 μ M) a la cadena de DNA en elongación, durante 6 min. a 37°C. La reacción de terminación de cadena finalizó por adición de 5 μ l de solución de parada (sección 2.11). Las muestras se analizaron en un gel de poliacrilamida 6%-8 M urea.

2.11 SOLUCIONES

1. **Solución salina tamponada con fosfatos (PBS):** NaCl 137mM, KCl 2.7mM, Na₂HPO₄ 8.1mM, KH₂PO₄ pH 7.4.
2. **Fenol equilibrado con TNE:** fenol destilado, cloroformo y alcohol isoamílico (25:24:1, v/v) con 1 mg/ml de hidroxiquinoleína (Merk).
3. **TAE:** Tris-acetato 40 mM, EDTA 10 mM.
4. **TBE:** Tris-borato 45 mM, EDTA 10 mM.
5. **TNE:** Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 100 mM, EDTA 10 mM.
6. **TE:** Tris-HCl 10 mM pH 7.5, EDTA 1 mM (10:1); Tris-HCl 1 mM pH 7.5, EDTA 1mM (1:1); Tris-HCl 10 mM pH 7.5, EDTA 0.1 mM (1:0.1)
7. **Solución de cloruro de guanidina para la extracción de RNA:** GuHCl 7.5 M pH 7.0, acetato potásico 20 mM, EDTA 4 mM y DTT 0.14 mg/ml.
8. **Tampón de extracción de RNA:** Tris-HCl 50 mM , NaCl 100 mM, EDTA 10 mM SDS 0.5% pH 9.0.
9. **SSC:** NaCl 150 mM, citrato sódico 15 mM.
10. **Solución de parada de la reacción de secuenciación:** xilencianol 0.05%, bromofenol 0.05%, EDTA 20 mM y formamida 95%.
11. **Tampón THF I:** RbCl 100 mM, MnCl₂ 50mM, KAc 30 mM, CaCl₂ 10 mM y glicerol 15%.
12. **Tampón THF II:** MOPS 10 mM pH: 7, RbCl 10 mM, CaCl₂ 7.5 mM y glicerol 15%.
13. **Reactivo de Denhardt 50x:** 5 g Ficoll (Tipo 400, Pharmacia), 5 g polivinilpirrolidona, 5 g seroalbúmina bovina.

2.12 MEDIOS DE CULTIVO DE BACTERIAS

1. **Medio LB:** Extracto de levadura 1%, Bactotripton 2% (Difco), NaCl 1%, pH 7.5.
2. **Medio LB con agar para crecimiento en medio sólido:** se añadió agar 1% (Difco) al medio LB.
3. **Medio SOC:** Bactotripton 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, Glucosa 20 mM.

2.13 OTROS PRODUCTOS Y REACTIVOS

1. Lymphoprep (Nycomed. Pharma).
2. Sales inorgánicas, ácidos, bases y disolventes orgánicos (Merk, Probus y Sigma).
3. Ditiotreitól y seroalbúmina bovina (Sigma).
4. Productos para geles de poliacrilamida: Acrilamida, N'-N'-metilén-bisacrilamida, urea y persulfato amónico (Boehringer Mannheim), TEMED (N-N-N'-N'-tetrametil-etilén-diamina) (BRL), Tris-base, EDTA y ácido bórico (Merk).
5. Productos para geles de agarosa: agarosa ultrapura y bromuro de etidio (Bio Rad).

2.14 MICROSCOPIO

Microscopio óptico invertido (Nikon).

3. RESULTADOS

3.1 ESTUDIO DE VARIANTES DEL VIH-1 RESISTENTES A INHIBIDORES DE LA RT

La aparición de variantes del VIH-1 con susceptibilidad reducida a AZT, se describió por vez primera en muestras de pacientes en tratamiento durante más de 6 meses (Larder y cols, 1989^a). Más tarde se observó el mismo fenómeno tras propagar el virus en cultivos celulares en presencia de dicha droga (Larder y cols, 1991^a; Gao y cols, 1992). Posteriormente se describió la aparición de cepas resistentes a cada uno de los inhibidores de la retrotranscriptasa (RT) que se han desarrollado para el tratamiento de la infección por el VIH-1. En todos los casos el cambio de susceptibilidad frente a dichos inhibidores se ha asociado con sustituciones de aminoácido en el dominio de polimerización de la RT (sección 1.4). La caracterización fenotípica de resistencia a agentes antivíricos requiere un título elevado de virus lo que hace necesaria la replicación de las muestras en células MT-2. Sin embargo, es ya conocida la alteración que el proceso de cultivo puede ejercer sobre la cuasiespecie vírica respecto a la cuasiespecie detectable *ex vivo* (Meyerhans y cols, 1989; Delassus y cols, 1991; Kusumi y cols, 1992) (sección 1.5.1).

En este trabajo se han analizado muestras de VIH-1 aislado y posteriormente replicado en células MT-2 así como provirus directamente obtenido de las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) sin adaptar a cultivo.

En la primera parte de este estudio se ha analizado la aparición de virus resistentes a AZT, ddI y ddC en pacientes tratados con dichas drogas. Para ello se estudiaron 56 muestras, 43 procedentes de pacientes en tratamiento con AZT, 2 en tratamiento con AZT en combinación con factor humoral del timo ("thymus humoral factor", THF) (Trainin, 1990), 1 en tratamiento con ddI, 1 en tratamiento con ddC y 9 en tratamiento con ddI tras un primer período de al menos 8 semanas durante el que se les administró AZT (Tablas 2.1 y 2.2). De estas muestras, 23 se han estudiado tras el aislamiento del virus en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) y posterior replicación en células MT-2 y las 33 restantes se estudiaron directamente de las CMSP sin adaptar a cultivo celular para determinar si el cultivo de las muestras podía estar alterando la proporción de variantes resistentes a la droga presentes en las cuasiespecies víricas.

3.1.1 Estudio de resistencia a AZT

El fenotipo resistente a AZT se ha relacionado con mutaciones en los codones que codifican los aminoácidos 41, 60, 67, 70, 215 y 219 de la retrotranscriptasa del VIH-1 (Larder y cols 1989^b; Rubsamen-Waigmann y cols, 1991; Kellam y cols, 1992; Larder, 1994) (Tabla 1.2).

La detección de mutaciones implicadas en resistencia a este inhibidor en muestras procedentes de pacientes tratados con dicha droga, se llevó a cabo por dos aproximaciones:

Una primera aproximación consistió en un muestreo en la zona del genoma de la RT que incluye los aminoácidos 215 y 219 por el método de detección de desapareamientos por digestión con RNasa A (DDRA) (como se ha descrito en la sección 2.8). Este método permitió detectar la presencia de mutaciones en los residuos 215 y/o 219 de la RT de una manera rápida y sencilla.

En una segunda aproximación se analizó la secuencia global de nucleótidos del DNA proviral presente en las células mononucleares de sangre periférica (como se ha descrito en la sección 2.9) tanto de las muestras que mostraron genotipo de resistencia por el método DDRA como de muestras procedentes de nuevos pacientes.

Por último se llevaron a cabo ensayos biológicos para analizar la contribución de cada mutación al fenotipo de resistencia a AZT

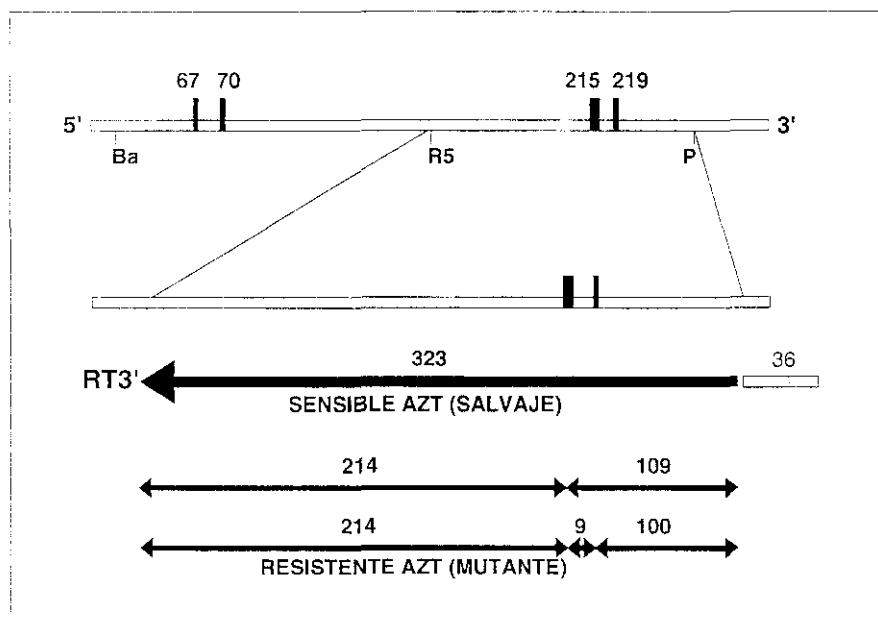
3.1.1.1 Muestreo molecular por el método de detección de desapareamientos por digestión con RNasa A.

El método de detección de desapareamientos por digestión con RNasa A (DDRA) se empleó para el muestreo de la región de la RT que codifica los aminoácidos 144 al 254 de la RT (zona RT 3'). La presencia de la mutación doble en el codón que codifica el aminoácido 215 (ACC→TAC/TTC) y/o la sencilla en el 219 (AAA→CAA) son características de genotipo AZT-resistente (Larder y cols, 1989^b). Estas dan lugar, tras la digestión con RNasa A, a un patrón de bandas característico (López-Galíndez y cols, 1991) (Fig. 3.1). La presencia de una de las tres bandas (de 100, 109 o 214 pb) fue indicativa del genotipo resistente a AZT.

Con este método se analizó el RNA total de células MT-2 infectadas con 37 virus procedentes de los pacientes indicados en la Tabla 2.1 en Materiales y Métodos; 30 de los cuales procedían de pacientes tratados con AZT. En el caso de las muestras 304, 307, 310 y 2038, además del virus procedente de células

mononucleares de sangre periférica (CMSP), se analizó el virus aislado de plasma (indicado con P detrás del número del aislado).

Tras la digestión con RNasa A se detectó el patrón de bandas característico de la doble mutación ACC→TAC en el codón que codifica el aminoácido 215 en 12 casos (aislados 191-1, 302, 306, 3005, 303, D5/-2, 304 y 304P, 117, 1607, 108, 035-5). En una muestra (aislado 022), se detectó el patrón de bandas característico de la mutación sencilla AAA→CAA en el codón que codifica el aminoácido 219. En ninguna de las muestras de pacientes no tratados se detectaron mutaciones en las posiciones mencionadas (Fig 3.1).



ϕ MT-2
 III-B
 MN
 RF
 P022A
 P022D

P ϕ

Figura 3.1. Esquema de la ribosonda RT3' empleada para la detección de desapareamientos en la región RT 3' de la RT y análisis de los aislados. En presencia de un doble desapareamiento en el codón que codifica el aminoácido 215, se producen dos fragmentos de 214 y 109 pb tras la digestión con RNasa A. En caso de detectarse también un desapareamiento en el codón que codifica el aminoácido 219, se obtienen tres bandas de 214, 9 y 100 pb respectivamente. En la parte inferior de la figura se muestra un ejemplo en el que se pueden observar distintos patrones de banda en las distintas muestras. Algunas presentan bandas diagnósticas de resistencia a AZT (indicadas con una flecha). ϕ indica el marcador de peso molecular (ϕ X174-HaeIII). MT-2 es el control negativo (células MT-2 sin infectar). III-B y RF son dos cepas de referencia. P022A es el control de virus de tipo salvaje y sensible a AZT y P022D es el control de virus de tipo mutado y resistente a AZT. P es la ribosonda.

3.1.1.2 Estudio de la población provírica global

Se secuenció el DNA provírico global de 56 muestras procedentes de pacientes tratados con AZT para determinar la presencia de mutaciones implicadas en la reducción de susceptibilidad a dicha droga (incluyendo las muestras en las que se habían detectado mutaciones en los codones que codifican los aminoácidos 215 y/o 219 por el método DDRA).

De estos, 23 se analizaron tras haber sido aislados en células mononucleares de sangre periférica y replicado, posteriormente, en células MT-2 (Tabla 2.1). De las otras 33 muestras se analizó el provirus extraído directamente de las CMSP de los pacientes (Tabla 2.2).

3.1.1.2.1 Muestras analizadas tras su replicación en células MT-2

En la Tabla 3.1 se resumen los resultados del análisis de la secuencia de nucleótidos de las 23 muestras procedentes de pacientes en tratamiento con AZT aisladas en CMSP y replicadas en células MT-2. Se indica el genotipo que presentaron las muestras en los aminoácidos de la RT implicados en resistencia a AZT: 41, 60, 67, 70, 215 y 219 (Larder y cols, 1989^b; Rubsamen y cols, 1991; Kellam y cols; 1992). Dos de las muestras estudiadas, procedentes de pacientes en tratamiento con AZT durante 44 y 56 semanas respectivamente (muestras 2038 y 095-2), no presentaron ninguna de las mutaciones relacionadas con resistencia a dicha droga. La sustitución del aminoácido 70 K→R se detectó en 5 muestras; en 2 de ellas (muestras 307 y 3018P) se detectó una mezcla de genotipo salvaje y mutado y en las otras 3 (muestras D12/-2, 310 y 334P) se detectó la únicamente genotipo mutado. En dos casos (aislados D17/-2 y 191-1) el único aminoácido sustituido (de los implicados en la disminución de susceptibilidad frente a AZT) fue el 215. La combinación de sustituciones de aminoácido asociadas a resistencia que se detectó más frecuentemente, fue la de los residuos 41 y 215, que se detectó en 6 aislados (D5/-2, D9/+4, 302, 341, 303 y 3005). El aislado 022 presentó sustituidos los aminoácidos 67, 70 y 219 y la muestra 306 los codones que codifican los aminoácidos 41, 60 y 215. La muestra 2080 presentó sustituciones de los aminoácidos 41, 70 (como mezcla de tipo salvaje y mutado) y 215. Del paciente 304 se estudió tanto el virus presente en plasma (virus 304P) como el presente en CMSP (virus 304). En ambos casos se detectaron mutaciones en los codones que codifican los aminoácidos 41, 60, 67, 70 y 215 de la RT.

El aminoácido 215 estaba sustituido T→Y (mutaciones ACC→TAC) en 14 de las muestras (61% de las muestras procedentes de pacientes en tratamiento con

AZT). Se detectó la mutación ATG→T/CTG (sustitución M→L) en el codón que codifica el aminoácido 41 en 10 de los casos estudiados, que corresponde a un 45%. El aminoácido 70 estaba sustituido K→R (mutación AAA→AGA) en 10 casos (43%), mientras que en el caso de los codones que codifican los aminoácidos 67 (mutación GAC→AAC que corresponde a la sustitución D→N), 60 (mutación GTA→ATA, sustitución V→I) y 219 (mutación AAA→CAA y sustitución K→Q) estos valores fueron del 17, 13 y del 8.6% respectivamente (Fig. 3.2).

De las muestras que presentaron mutaciones de resistencia a AZT, el 66% presentaron sustituido el aminoácido 215, el 52% mostraron sustituido el aminoácido 41, el 47% el aminoácido 70, el 19% el aminoácido 67, el 14% el 60 y el 9% el aminoácido 219.

Tabla 3.1 Análisis de 23 muestras de VIH-1 de pacientes sometidos a tratamiento con AZT

Muestra ^a	Tratamiento AZT ^b	Susceptibilidad biológica CI ₅₀ (µM) ^c	Aminoácidos implicados en resistencia a AZT ^d					
			41 M	60 V	67 D	70 K	215 T	219 K
2038	44	nd
095-2	56	nd
307	12	0.08	.	.	.	·/R	.	.
3018P	96	nd	.	.	.	·/R	.	.
D12/-2	26	nd	.	.	.	R	.	.
310	92	nd	.	.	.	R	.	.
334P	116	0.06	.	.	.	R	.	.
2051	48	nd	Y	.
D17/-2	94	nd	Y	.
191-1	24	nd	nd	.	.	.	Y	.
D5/-2	>8	nd	L	.	.	.	Y	.
D9/+4	>8	nd	L	.	.	.	Y	.
302	24	0.06	L	.	.	.	Y	.
341	48	nd	L	.	.	.	Y	.
303	84	nd	L	.	.	.	Y	.
3005	88	nd	L	.	.	.	Y	.
2080	41	0.5	L	.	.	·/R	Y	.
306	106	0.09	L	I	.	.	Y	.
022	124	nd	.	.	N	R	.	Q
304	88	0.42	L	I	N	R	Y	.
304P	88	0.32	L	I	N	R	Y	.
108M	40	nd	Y	.
P022-D	64	nd	nd	.	N	R	.	Q

^a Virus procedentes de CMSP o de plasma (indicado con P detrás del número de la muestra) aislados en CMSP de donante sano y replicados en células MT-2 (descrito en 2.2). ^b Duración, en semanas, del tratamiento con AZT. ^c Datos de ensayos de susceptibilidad biológica de las muestras. ^d Sustituciones de aminoácidos implicados en resistencia a AZT (· indica tipo salvaje, aminoácidos indicados en el encabezamiento) (se emplea el código de una letra, ver abreviaturas). nd= no determinado. Los virus 108M y P022-D se estudiaron como control de virus resistentes a AZT (López-Galíndez y cols, 1991). El estadio clínico de los pacientes correspondiente al momento de cada toma de muestra se indica en la Tabla 2.1 de Materiales y Métodos.

Figura 3.2 A. Alineamiento de secuencia de nucleótidos de muestras procedentes de pacientes en tratamiento con AZI y replicadas en células MT-2

```

        60          65      67      69 70          74 75          89          98
CONS.  GTATTTGCCATAAAGAAAAAGACAGTACTAAATGGAGAAAATTAGTAGATTCAGAGAACTTAATAAGAGAACTCAAGACTTCTGGGAAGTTCAATTAGGAATACCACATCCCGCAGGG

2038  -----G-----A-----
3018P  -----g--t-----AG-----g-----T-----
D5/-2  -----c-----
D9/+4  -----C-----
D12/-2 -----
306    A-----G-----C-----C-----
307    -----g-----C-----
310    -----G-----
108M   -----G-----
302    -----
303    -----GA-----
304    A-----GA--ga--G-----A--G-----T--G-----c-----
304P   A-----GA--GA--G-----A--G-----T--G-----
2051   -----G-----
2080   --c-----g--tg-----A-----
3005   -----G-----
D17/-2 -----G--t-----T-----T-----
095-2  -a-----a-----g-----
191-1  -----a-----
022    -----GA--a--G-----G-----T-----g-----
P022-D -----A-----G-----

```

CONS. representa la secuencia consenso de las muestras analizadas. Se incluyen los codones que codifican los aminoácidos 60 al 99 de la RT. En negrita se indican los codones implicados en resistencia a inhibidores de la retrotranscriptasa. Los guiones (-) indican la similitud de secuencia con la secuencia consenso de las muestras analizadas. Las letras en minúscula indican heterogeneidad de genomas (salvaje y mutado respecto a la secuencia consenso).

Figura 3.2.B. Alineamiento de secuencia de nucleótidos de muestras procedentes de pacientes en tratamiento con AZT y replicadas en células MT-2

	181	184	188				215	219
CONS.	TATCAATACATGGATGATTG	TATGTAGGATCIGACTTAGAAATAGGGCAGCATAGAACAAAAATAGAGGAACTGAGACAACATCTGTTGAGGTGGGGATTT	TACACACCAGACAAA					
2038	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
3018P	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
D5/-2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
D9/+4	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
D12/-2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
306	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
307	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
310	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
108M	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
302	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
303	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
304	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
304P	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
2051	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
2080	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
3005	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
D17/-2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
O95-2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
191-1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
C22	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
P022-D	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

CONS. representa la secuencia consenso de las muestras analizadas. Se incluyen los codones que codifican los aminoácidos 60 al 99 de la RT. En negrita se indican los codones implicados en resistencia a inhibidores de la retrotranscriptasa. Los guiones (-) indican la similitud de secuencia con la secuencia consenso de las muestras analizadas. Las letras en minúscula indican heterogeneidad de genomas (salvaje y mutado respecto a la secuencia consenso).

3.1.1.2.2 Muestras procedentes de CMSP sin cultivar

En la Tabla 3.2 se resumen los aminoácidos detectados en los codones de la RT implicados implicados en resistencia a AZT deducidos del análisis de la secuencia de nucleótidos de 33 muestras de VIH-1 analizadas sin sufrir adaptación a cultivo.

Se detectó genotipo salvaje en los codones relacionados con resistencia a AZT en 9 muestras procedentes de 6 pacientes sometidos a tratamiento durante periodos que oscilaron entre 20 y 124 semanas.

Se detectaron mutaciones en los codones que codifican los aminoácidos 215 (en el 63% de los casos), 41 (45%), 70 (33%), 67 (12%), 60 (3%) y/o 219 (3%).

En las muestras que presentaron mutaciones de resistencia se detectó sustituido el aminoácido 215 T→Y/F en el 75% de los casos, el aminoácido 41 M→L en el 58%, el aminoácido 70 K→R en el 41%, el aminoácido 67 D→N en el 16% y el aminoácido 60 V→I en el 4%, al igual que el aminoácido 219 K→Q.

El paciente D35 recibió tratamiento con AZT durante 24 semanas. Tras este período, comenzó a recibir ddI por ser intolerante a la primera droga. La muestra tomada en el momento previo al inicio de terapia con ddI, presentó una mezcla de genotipo salvaje y mutado en el codón que codifica el aminoácido 41 (M/L) y la sustitución T→S en posición 215. Tras 4 semanas de tratamiento únicamente con ddI, se detectó un cambio en el aminoácido 215 que presentó mezcla de S y Y; la sustitución del aminoácido 215 T→Y es característica del fenotipo de resistencia a AZT (Tabla 3.2) (Fig. 3.11.B, muestras 1 a la 23 y Fig. 3.12.B, muestras 1 a la 23).

Tabla 3.2 Análisis de 33 muestras de VIH-1 procedentes de pacientes sometidos a tratamiento con AZT únicamente y con ddI tras terapia previa con AZT

Muestra ^a	Tratamiento		Aminoácidos implicados en resistencia a AZT ^c					
	AZT	ddI ^b	41 M	60 V	67 D	70 K	215 T	219 K
P8	20	0
P13	32	0
D31/-2	32	0
D31/+8	42	0
D31/+24	124	0
V75-2	20	0
D29/+28	24	28
D22/+28	64	28	nd	nd
D22/+48	64	44 ^d
D29/-2	24	0	.	.	.	R	.	.
P2	2	0	.	.	.	R	.	.
D16/+52	40	52	.	.	.	D	.	.
D25/+24	84	0	Y	.
D22/+36	64	36	Y	.
P23	40	0	Y	.
D35/-2	24	0	./L	.	.	.	S	.
D35/+4	24	4	./L	.	.	.	S/Y	.
D28/+28	116	28	.	.	.	R	Y	.
THF13/+24	24	0	.	.	.	R	S	.
P14	72	0	L	.	.	.	Y	.
P4	60	0	L	.	.	.	Y	.
P15	44	0	L	.	.	.	Y	.
P16	40	0	L	.	.	.	Y	.
P20	28	0	L	.	.	.	Y	.
D12/+58	86	0	L	.	.	.	Y	.
D17/+20	116	0	L	.	.	.	Y	.
D8/+44	8	44	L	.	.	.	Y	.
P21	40	0	.	.	./N	R	.	Q
304/P0	88	0	./L	.	.	R	./Y	.
D12/+20	48	0	L	.	.	R	Y	.
V75-9	20	0	.	.	N	R	F	.
P3	40	0	L	.	N	R	Y	.
THF 17/+4	4	0	L	I	N	R	Y	.

^aMuestras procedentes directamente de CMSP antes de cultivar. Las muestras precedidas por P, así como la muestra 304/P0, proceden de casos pediátricos y las precedidas por D de pacientes incluidos en el protocolo ddI de comparación de ddI frente a AZT. El número que sigue a la D indica el paciente y a / indica el número de semanas que lleva incluido en el protocolo ddI (sección 3.1.2). Las muestras precedidas por THF proceden de pacientes en tratamiento con AZT en combinación con THF (sigue la misma nomenclatura de las muestras del protocolo ddI) y la muestra V75-2 procede de un paciente en tratamiento únicamente con AZT. ^bDuración, en semanas, del tratamiento con AZT y ddI en los casos que proceda. ^cSustituciones de aminoácidos implicados en resistencia a AZT (· indica tipo salvaje, aminoácidos denotados en el encabezamiento) (se emplea el código de una letra, ver abreviaturas). La barra (/) indica mezcla de tipo salvaje y mutado. ^dEn el momento de toma de esta muestra, el paciente D22 llevaba 4 semanas sin recibir tratamiento por motivos médicos. El estadio clínico de los pacientes correspondiente al momento de cada toma de muestra se indica en la Tabla 2.2 de Materiales y Métodos.

3.1.1.3 Susceptibilidad biológica a AZT

En la Tabla 3.1 se indica la susceptibilidad *in vitro* a AZT de algunos de los virus previamente analizados por secuenciación y que presentaban sustituidos distintos aminoácidos de la RT implicados en la resistencia a AZT. Las muestras 307 y 334P, que presentaron sustituido el aminoácido 70 de la RT, mostraron unos valores de CI_{50} similares (0.08 y 0.06 μ M). La muestra 302, con mutaciones en los codones que codifican los aminoácidos 41 y 215, presentó un valor de CI_{50} de 0.06 μ M. Los virus 2080 (con sustituciones de los residuos 41, 70 y 215), 304 y 304P (los últimos con 5 mutaciones de resistencia a AZT) presentaron valores similares de CI_{50} (0.5, 0.42 y 0.32 μ M respectivamente). Todos los casos mostraron fenotipo parcialmente resistente a AZT, con un incremento de los valores de CI_{50} directamente relacionado con el número de mutaciones de resistencia detectadas (Larder y cols, 1990).

3.1.2 Estudio molecular de resistencia a ddI y ddC

Se estudiaron 23 muestras procedentes de 11 pacientes previamente tratados con AZT (pacientes D5, D8, D9, D12, D16, D17, D22, D25, D28, D29, D31 y D35) incluidos en un estudio comparado de tratamiento con AZT frente a tratamiento con ddI (protocolo ddI). Cuatro de los pacientes (D12, D17, D25 y D31) siguieron su tratamiento con AZT. Los otros 12, intolerantes a AZT, iniciaron tratamiento con ddI. También se estudiaron muestras de un paciente que únicamente recibió tratamiento con ddI (muestras V75-3, antes de iniciar el tratamiento y V75-4 tras 44 semanas en tratamiento) y de un paciente que únicamente recibió tratamiento con ddC (muestras V75-5, antes de iniciar el tratamiento y V75-6 tras 20 semanas en tratamiento) (Tablas 2.1 y 2.2).

Todas las muestras, excepto las procedentes del paciente D31 (virus D31/-2, D31/+8 y D31/+24) presentaron mutaciones relacionadas con resistencia a AZT al comienzo del protocolo ddI.

La figura 3.11 B (virus 24 al 33) y 3.12.B (virus 24 al 32) muestra el alineamiento de secuencias de nucleótidos de las muestras. Las secuencias no permitieron identificar ninguna mutación que pudiera ser relacionada con resistencia a ddI, como son las sustituciones de los aminoácidos 65, 74, 135 y/184 (St Clair y cols, 1991; Gu y cols, 1992; 1994; Zhang y cols, 1994).

En la secuencia nucleotídica de la muestra V75-6 (correspondiente a un paciente tras 20 semanas en terapia con ddC) se detectó una mezcla de virus salvaje y virus con una sustitución del aminoácido 69 (T→T/Y).

3.1.3 Estudio de la alteración genética debido al cultivo celular

Se seleccionó el virus 304 para el estudio del efecto del cultivo celular sobre las cuasiespecies. Para ello se compararon las secuencias del provirus procedente de la muestra tras su cocultivo en células mononucleadas de sangre periférica (CMSP) y subsiguiente replicación en MT-2 (muestra 304, también denominada 304/P1) la del virus aislado a partir de plasma y replicado en células MT-2 (muestra 304P) y la procedente de CMSP antes del cultivo celular (muestra 304/P0) (Fig. 3.3).

El virus 304/P1 presentaba sustituidos los aminoácidos 60 (V→I), 67 (D→N), 70 (K→R) y 215 (T→Y), implicados en resistencia a AZT. El virus 304P (aislado de plasma) mostró sustituidos los mismos aminoácidos pero el cambio M→L del aminoácido 41 vino determinado por la mutación ATG→TTG y no ATG→CTG como se detectó en el provirus, lo que indica la presencia de diferencias genotípicas entre el virus circulante y el integrado en el paciente.

Sin embargo en la muestra sin cultivar se detectó genotipo salvaje en el codón que codifica el aminoácido 60. En el codón que codifica el aminoácido 67 se detectó una mezcla de tipo salvaje y mutado al igual que en los codones que codifican los aminoácidos 70 y 215.

En los aminoácidos 69 (implicado en la resistencia a ddC) (Fitzgibbon y cols, 1992) y 75 (implicado en resistencia a D4T) (Lacey y Larder, 1994^a) también se detectaron diferencias genotípicas:

El virus 304/P1 presentaba una mezcla de genotipo salvaje y mutado en el codón que codifica el aminoácido 69 (ACT→ACT/GAT) que conlleva la sustitución T→D y el aminoácido 75 sustituido V→M (mutaciones GTA→ATG). El virus aislado de plasma (304P) mostró sustituidos tanto el aminoácido 69 (T→D) como el 75 (V→M). El virus 304/P0 (no adaptado a cultivo) mostró mezcla de genotipo salvaje y mutado en el codón que codifica el aminoácido 69, como la secuencia del provirus adaptado a cultivo. Sin embargo, en el codón que codifica el aminoácido 75 se detectó la mutación GTA→GTG que no conlleva la sustitución del aminoácido.

```

      60          65      67      69 70          74 75          89          98
CONS.  GTATTGCCATAAAGAAAAAGACAGTACTAAATGAGAAAATTAGTAGATTCAGAGAACTTAATAAGAGAACTCAAGACTTCTGGGAAGTTCATTAGGAATACCACATCCCGCAGGG
304/P1  A-----GA----ga--G-----A-G-----T-----G-----C-----
304P    A-----GA----GA--G-----A-G-----T-----G-----
304/P0  -----G-----G--G-----g-----a-----T-----G-----T

```

```

      181      184      188          215      219
CONS.  TATCAATACATGGATGATTTGATGTAGGATCTGACTTAGAAATAGGGCAGCATAGAACAAAAAATAGAGGAACTGAGACAACATCTGTTGAGGTGGGGATTTTACACACCAGACAAA
304/P1  -----C-----G--A-----
304P    -----c-----A-----c-----C-----G--A-----t-----
304/P0  -----C-----A-----c-----C-----A-----

```

Figura 3.3. Alineamiento de secuencias de aminoácido de las muestras 304/P0, 304/P1 y 304P. (A) región RT 5', que incluye los aminoácidos 60 al 99 y (B) región RT 3', que incluye los aminoácidos 181 al 219.

3.2 ESTABILIDAD *in vitro* DEL GENOTIPO DE RESISTENCIA A AZT EN AUSENCIA DE DROGA.

Para analizar la estabilidad biológica de distintos VIH-1 con sustituciones de diversos aminoácidos implicados en la resistencia a AZT, se propagaron en células MT-2 cuatro aislados (302, 304, 306 y 108M) en las condiciones controladas de cultivos celulares (Fig. 2.1). El aislado 108M presentaba sustituido el aminoácido 215, el aislado 302 tenía sustituidos los aminoácidos 41 y 215; el aislado 306, los aminoácidos 41, 60 y 215. Por último, el aislado 304 presentaba cambios en los codones que codifican los aminoácidos 41, 60, 67, 70 y 215 de la RT (Tabla 3.1).

Se llevaron a cabo 20 pases en el caso de los aislados 302 y 304 y 15 en el caso del aislado 306 a dos multiplicidades de infección (m.d.i). Del aislado 108M se realizaron 14 pases a m.d.i: 0.1 DI₅₀/célula y 8 a m.d.i: 0.001 DI₅₀/célula.

3.2.1 Estudio molecular de la población global

3.2.1.1 Muestreo molecular por el método de detección de desapareamientos por digestión con RNasa A.

Se analizó el RNA total de células MT-2 infectadas con cada uno de los virus seleccionados para el estudio al inicio (P1) y tras pases tanto a m.d.i : 0.1 (-1) como a m.d.i: 0.001 (-3) DI₅₀/célula, en las zonas RT 5' (aminoácidos 25 al 144) y RT 3' (aminoácidos 144 al 252). (En la terminología empleada para designar los virus originados tras los pases seriados, se indica la multiplicidad de infección a la que se llevó a cabo cada uno de ellos: 0.1DI₅₀/célula con un -1 o 0.001DI₅₀/célula con un -3. Cada uno de los aislados al inicio de los pases seriados (virus 108/P1, 302/P1, 304/P1 y 306/P1) mostró un patrón de bandas diferente tras la digestión con RNasa A en ambas zonas de la RT. El patrón de bandas de los aislados 108M, 302 y 306 no varió a lo largo de los pases en ninguna de las regiones ni a ninguna de las multiplicidades de infección a las que se realizó el estudio. El aislado 304 tras 10 pases en cultivo a m.d.i: 0.001DI₅₀/célula (virus 304/P11/-3) presentó un patrón de bandas en la zona RT 5' diferente al que presentaba el aislado inicial (virus 304/P1) o tras 15 pases a m.d.i: 0.1DI₅₀/célula (virus 304/P16/-1) (Fig 3.4).

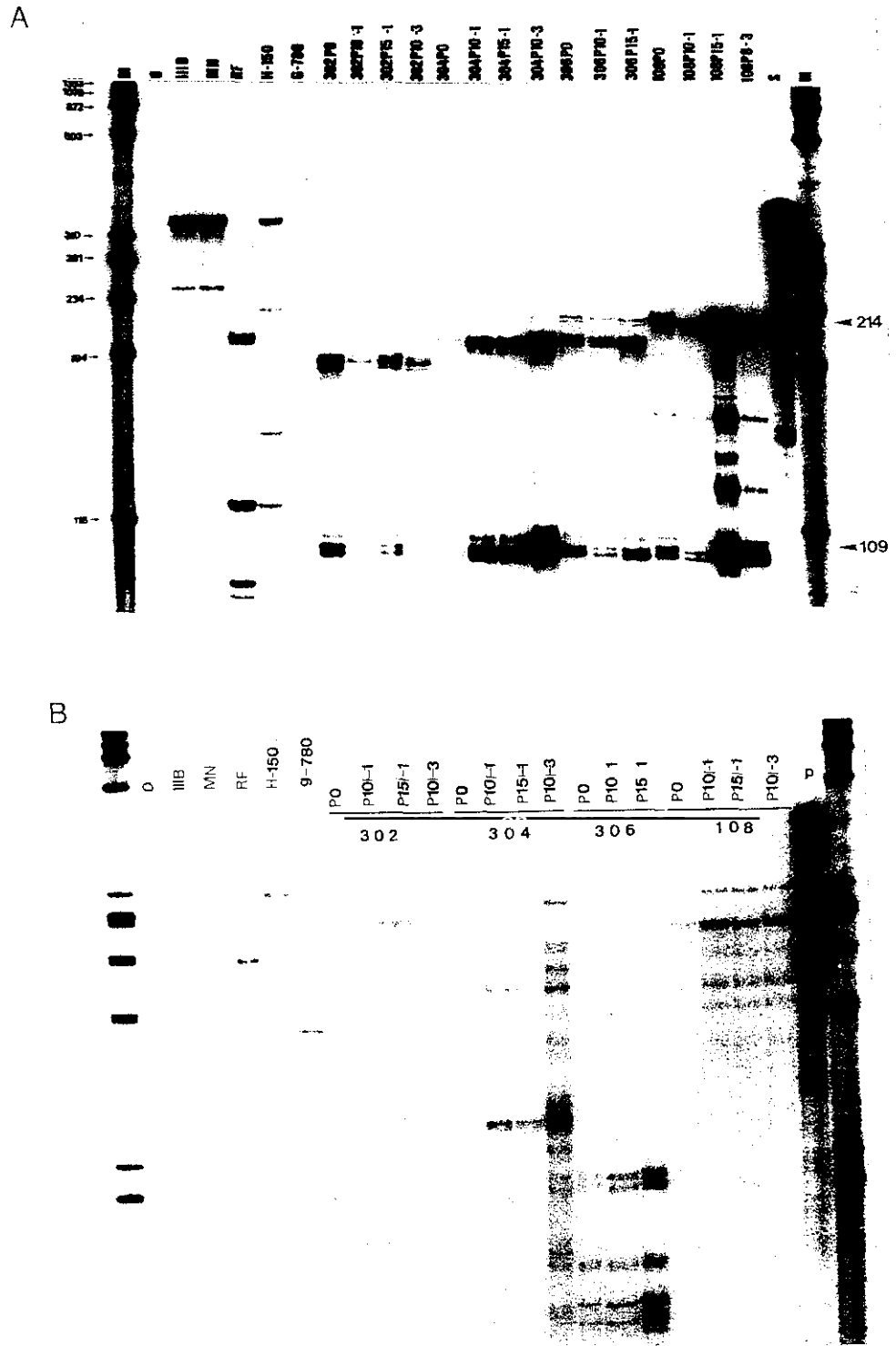


Figura 3.4. Gel de DDRA de los aislados 302, 304, 306 y 108M tras pases seriados a m.d.i. 0.1 v 0.01 DI_{50} /célula. (A) Región RT 3'. (B) Región RT 5'. Las flechas muestran diferencias en los patrones de bandas tras la digestión con RNasa A. \emptyset indica el marcador de peso molecular (\emptyset X174-HaeIII). MT-2 es el control negativo (células MT-2 sin infectar). III-B y RF son dos cepas de referencia. P022A (también denominado H-150) es el control de virus sensible a AZT y P022D (también denominado G-780) es el control de virus resistente a AZT. P y S representan la ribosonda.

3.2.1.2 Estudio de la población provírica global

La secuencia global de nucleótidos de los virus antes y después de los pases no varió en las posiciones implicadas en resistencia a AZT tras los pases seriados realizados a alta m.d.i (Fig. 3.5).

Tras los pases a baja m.d.i ($0.001DI_{50}$ /célula) los aislados 108M, 302 y 306 no mostraron ningún cambio en ninguno de los aminoácidos de resistencia a AZT (Fig. 3.5). Sin embargo, tras 10 pases seriados del aislado 304 (virus 304/P11/-3) se observaron las sustituciones de los aminoácidos 60 (I→V), 67 (N→D) y 70 (R→K) correspondientes a genotipo salvaje. Estos cambios se mantuvieron durante el resto de los 10 pases realizados (virus 304/P21/-3).

En cuanto a los aminoácidos no implicados en resistencia a AZT, se detectaron mutaciones en los codones que codifican los aminoácidos 73, 83, 99, 181, 187, 193 y 195. El cambio del aminoácido 181 está implicado en resistencia a nevirapina e inhibidores de la RT no análogos de nucleósido (Richman y cols, 1991^c) (sección 3.3).

A.

	60	65	67	69	70	74	75		89	98		
CONS.	GTATTTGCCATAAAG	AAAAAAGACAGT	ACTAAATGGAGAAAAT	TA	AGT	TAGATTTCAGAGAACT	TAATAAGAGAACTCAAGACTTCTGG	GAAGTTCAATTAGGAATACCAT	CCCCG	CAGGG		
302/P1	-----T-----											
302/P11/1	-----T-----											
302/P16/1	-----T-----											
302/P11/3	-----T-----											
304/P1	A		GA	ga	G		A-G		T	G	c	
304/P11/1A			GA	ga	G		A-G		T	G	c	
304/P16/1A			GA	ga	G		A-G		T	G	c	
304/P11/3						G	a-G		T	G	C	A
306/P1	A					G					C	
306/P11/1A						G					C	
306/P16/1A						G					C	

B.

	181	184	188		215	219
CONS.	TATCAATACATGGATGATTTGTATGTAGGATCTGACTTAGAAATAGGGCAGCATAGAACAAAAATAGAGGAACTGAGACAACATCTGTTGAGGTGGGGATTTTACACACCAGACAAA					
302/P1	-----A-----G-----G-----T-A-----A-----g-----					
302/P11/1-g	-----A-----G-----G-----T-A-----A-----G-----					
302/P16/1-G	-----a-----a-----A-----G-----G-----T-A-----A-----G-----					
302/P11/3	-----a-----A-----G-----G-----T-A-----A-----G-----					
304/P1	-----C-----G-----A-----					
304/P11/1	-----a-----C-----G-----A-----					
304/P16/1	-----a-----C-----G-----A-----					
304/P11/3	-----C-----G-----A-----					
306/P1	-----G-----G-----A-----					
306/P11/1	-----G-----G-----A-----					
306/P16/1	-----G-----G-----A-----					

Figura 3.5. Alineamiento de secuencia de nucleótidos de las muestras 302, 304 y 306 antes y después de los pases seriados.

(A) Región 5' de la RT, que incluye los aminoácidos 60 al 99. (B) Región RT 3' de la RT, que incluye los aminoácidos 181 al 219. La secuencia del aislado 108M antes y después de los pases seriados no se incluye por haberse secuenciado un fragmento menor del mostrado en la figura (en el que se incluían los aminoácidos implicados en resistencia a AZT).

3.2.2 Estudio molecular de cuasiespecies

Se investigó si los cambios genotípicos detectados en el gen de la RT del virus 304/P11/-3 respondían a un proceso de reversión genética debida a la ausencia de droga. Se analizaron por clonado molecular las cuasiespecies del aislado 304 inicial (virus 304/P1), del aislado tras 15 pases a m.d.i: 0.1 DI_{50} /célula (virus 304/P16/-1) y tras 10 pases a m.d.i: 0.001 DI_{50} /célula (virus 304/P11/-3). Se secuenciaron 14 clones del virus 304/P1, 11 del 304/P11/-3 y 5 clones del virus 304/P16/-1 en las regiones del gen pol que codifican los aminoácidos 60 al 108 y 160 al 220 de la RT (sección 2.9). En la figura 3.8 se muestra la secuencia de aminoácidos de los clones analizados que incluye los aminoácidos 60 al 108 y 181 al 215.

En los 14 clones del virus 304/P1 analizados los aminoácidos 60 (I→V) y 215 (T→Y) estaban sustituidos respecto a la secuencia salvaje (aunque en 4 de los clones el cambio a Y del aminoácido 215 respondió a una triple mutación (ACC→TAT)). Por el contrario, trece de los 14 clones analizados (93%) presentaron sustituidos los aminoácidos 67 (N) y 70 (R), mientras que el clon restante presentó D y K respectivamente en dichas posiciones, que corresponden con el tipo salvaje (Figura 3.6.A).

La secuencia de aminoácidos correspondiente a los 5 clones estudiados del virus 304/P16/-1 no presentó variación en las posiciones 67 (D→N) y 70 (K→R) respecto al virus original (304/P1). En 2 de los 5 clones analizados se detectó tipo salvaje en el aminoácido 60. El cambio T→Y en el aminoácido 215 correspondió a una triple mutación (ACC→TAT) en tres de los clones (Fig. 3.6.B).

La secuencia de nucleótidos del virus 304/P11/-3 mostró el cambio T→Y del aminoácido 215 (ACC→TAC) en todos los clones. De los 11 clones secuenciados, 10 presentaron genoma salvaje en los residuos 60I, 67D y 70K, mientras que uno de los clones analizados presentó sustituidos los aminoácidos 60 (I→V), 67 (D→N) y 70 (K→R) (Fig. 3.6.C).

	60	65	67	6970	7475	89	98	100	103	106
304/P1	ATATTTGGCCATAAAGAAAAAGAACAGTgATAGATGGAGAAAAGTTAATGATTTTCAGAGAACTTAATAAGAGAACTCAAGACTTTTGGGAGGTTTCAATTAGGAATACCCATCCCTCCAGGTTTAAAAAAGAAAAAATTCAGTAAACAGTA									
CLON 1	-----									A
CLON 2	-----	-AG-	-AC-	-A-	-G-	-G-				A
CLON 3	-----									A
CLON 4	-----	-T-	-A-	-AC-						A
CLON 5	-----	-T-	-A-	-AC-						A
CLON 6	-----								-T-	A
CLON 7	-----									A
CLON 8	-----									A
CLON 9	-----	-T-	-AG-	-AC-						A
CLON 10	-----	-T-	-A-	-AC-						A
CLON 11	-----		-A-	-AC-	-A-				A	A
CLON 12	-----		-A-	-AC-						A
CLON 13	-----	-T-	-A-	-AC-						A
CLON 14	-----	-G-	-A-	-AC-						A

	60	65	67	6970	7475	89	98	100	103	106
304/P16/-1	ATATTTGGCCATAAAGAAAAAGAACAGTgATAGATGGAGAAAAGTTAATGATTTTCAGAGAACTTAATAAGAGAACTCAAGACTTTTGGGAGGTTTCAATTAGGAATACCCATCCCTCCAGGTTTAAAAAATGAAAAAATTCAGTAAACAGTA									
CLON 1	-----									A
CLON 2	-----									A
CLON 3	-----									A
CLON 4	-----								-G-	A
CLON 5	-----									A

	60	65	67	6970	7475	89	98	100	103	106
304/P11/-3	GTATTTGGCCATAAAGAAAAAGAACAGTACTAAATGGAGAAAAGTTAGTGGATTTTCAGAGAACTTAATAAGAGAACTCAAGACTTTTGGGAGGTTTCAATTAGGAATACCCATCCCTCCAGGTTTAAAAAAGAAAAAATTCAGTAAACAGTA									
CLON 1	-----									A
CLON 2	-----									A
CLON 3	-----									A
CLON 4	A-----	-GA-	-GA-	-G-	-A-	-A-			A	-G-
CLON 5	-----									A
CLON 6	-----									A
CLON 7	-----									A
CLON 8	-----									A
CLON 9	-----									A
CLON 10	-----									A
CLON 11	-----									A

Figura 3.6.A. Alineamiento de nucleótidos de clones moleculares de los virus 304/P1, 304/P16/-1 y 304/P11/-3. Se muestra la región que incluye los aminoácidos 60 al 108 de la RT. Los codones implicados en resistencia a drogas se indican en negrita.

	181	184	188		215	219
304/P1	TATCAATACATGGATGATTGTTATGTAGGATCTGACTTAGAAAATAGGGCAGCATAGAACAATAATAGAGGAAGTGGGGATTTTACACACCAGACAAA					
CLON 1	-----T-----					
CLON 2	-----A-----					
CLON 3	-----T-----					
CLON 4	-----					
CLON 5	-----G-----					
CLON 6	-----					
CLON 7	-----A-----G-----T-----					
CLON 8	-----					
CLON 9	-----A-----					
CLON 10	-----G-----					
CLON 11	-----A-----G-----					
CLON 12	-----					
CLON 13	-----A-----					
CLON 14	-----					
	181	184	188		215	219
304/P16/-1	TATCAATACATGGATGATTGTTATGTAGGATCTGACTTAGAAAATAGGGCAGCATAGAACAATAATAGAGGAAGTGGGGATTTTACACACCAGACAAA					
CLON 1	-----A-----G-----					
CLON 2	-----T-----					
CLON 3	-----T-----					
CLON 4	-----G-----					
CLON 5	-----T-----					
	181	184	188		215	219
P11/-3	TATCAATACATGGATGATTGTTATGTAGGATCTGACTTAGAAAATAGGGCAGCATAGAACAATAATAGAGGAAGTGGGGATTTTACACACCAGACAAA					
CLON 1	-----					
CLON 2	-----					
CLON 3	-----					
CLON 4	-----A--A-----					
CLON 5	-----G-----					
CLON 6	-----					
CLON 7	-----					
CLON 8	-----					
CLON 9	-----					
CLON 10	-----					
CLON 11	-----					

Figura 3.6.B. Alineamiento de nucleótidos de clones moleculares de los virus 304/P1, 304/P16/-1 y 304/P11/-3. Se muestra la región que incluye los aminoácidos 181 al 219 de

la RT. Los codones implicados en resistencia a drogas se indican en negrita.

3.2.3 Estudio fenotípico de la población global

3.2.3.1 Efecto citopático y curso de la infección

Durante los pases en cultivo el tipo de efecto citopático no varió, observándose la formación de sincitios de gran tamaño con todos los aislados. La aparición de ECP +3 se produjo después de 4-5 días de infección a m.d.i: 0.1 DI_{50} /célula y de 10-11 días de infección a m.d.i: 0.001 DI_{50} /célula.

3.2.2.2 Susceptibilidad biológica a AZT

Para determinar si los cambios genotípicos detectados (sección 3.2.1.2) se correlacionaban con cambios fenotípicos respecto a la sensibilidad de los virus a AZT, se realizaron estudios de susceptibilidad *in vitro* a dicha droga.

Hay que resaltar que todos los virus presentaban fenotipo parcialmente resistente a AZT antes de los pases (Fig. 3.7.B).

En el aislado 302, en el que no se detectaron cambios en los aminoácidos de resistencia a AZT tras los pases seriados, el fenotipo permaneció invariable (Fig. 3.7.A).

El aislado 304 que tras pases a m.d.i: 0.001 DI_{50} /célula presentaba un cambio a tipo salvaje de los residuos 60, 67 y 70 tampoco mostró ninguna variación fenotípica. El fenotipo parcialmente resistente a AZT del aislado 306 no varió tras pases seriados a m.d.i: 0.1 DI_{50} /célula (virus 306/P11/-1 y 306/P16/-1 en la figura 3.5.C). Tras 8 pases a m.d.i: 0.001 DI_{50} /célula, se detectó un incremento de susceptibilidad del virus 306/P9/-3 a la droga con una disminución del valor de la CI_{50} de 10 veces (Fig. 3.7.C).

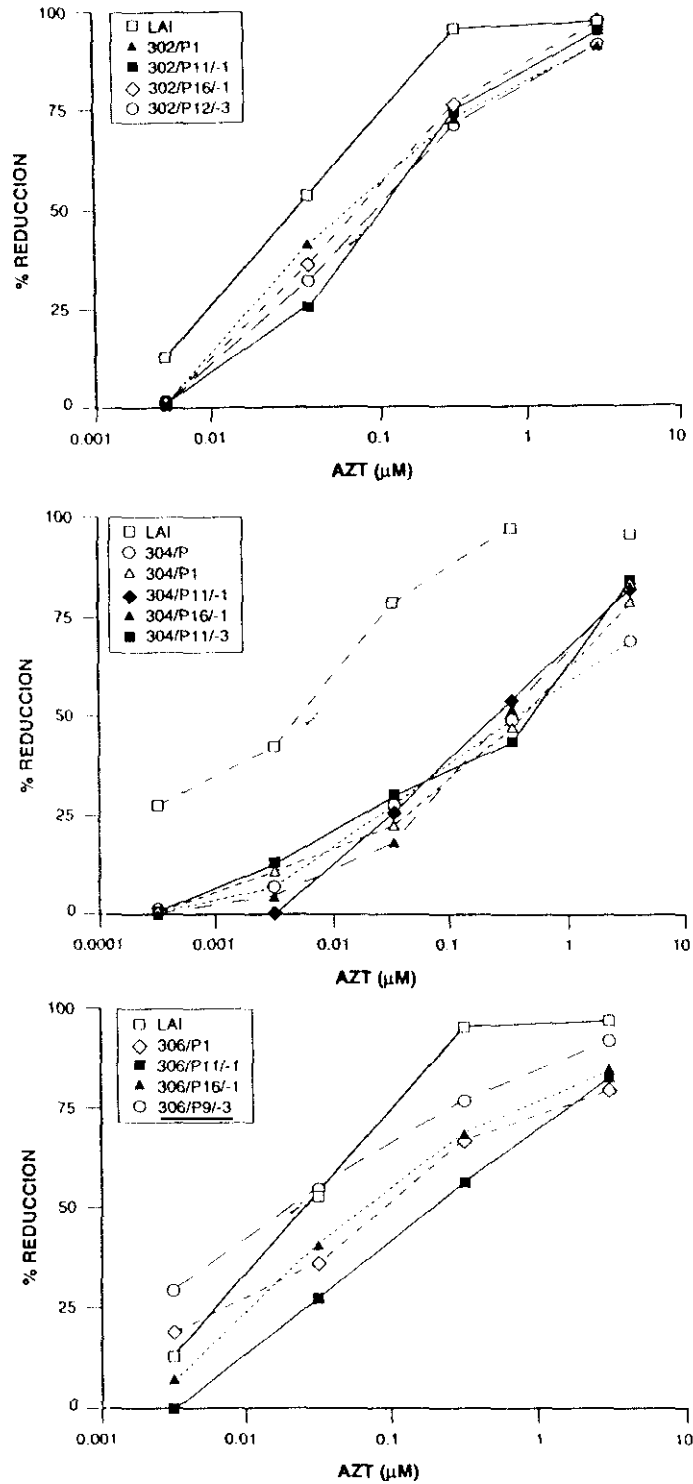


Figura 3.7. Sensibilidad a AZT de los virus 302, 304 y 306 antes y después de los pases seriados.

En el eje de ordenadas se representa el % de reducción de formación de sincitios (placas) tras la infección de células HeLa CD4 en presencia de distintas concentraciones de inhibidor. En el eje de abscisas se indican las concentraciones de AZT empleadas.

3.3 IDENTIFICACION DE AISLADOS DEL VIH-1 CON MUTACIONES DE RESISTENCIA A nevirapina, ddC y D4T EN PACIENTES SIN TRATAR O TRATADOS UNICAMENTE CON AZT

El análisis de secuencias del gen *pol* de muestras de pacientes no tratados o tratados únicamente con AZT (muestras descritas en la Tabla 3.1) nos permitió detectar que las poblaciones de algunas muestras de VIH-1 incluían sustituciones de nucleótido relacionadas con resistencia a drogas no empleadas en el tratamiento de los pacientes. En esta sección se describe la identificación de mutaciones en el gen que codifica la RT implicadas en la resistencia a nevirapina, a ddC y a D4T en muestras de pacientes tratados únicamente con AZT.

3.3.1 Estudio de la secuencia provírica global

3.3.1.1 Identificación de mutaciones de resistencia a nevirapina, ddC y a D4T en la secuencia consenso de muestras procedentes de pacientes tratados con AZT.

El aislado 302 que presentaba fenotipo parcialmente resistente a AZT (sección 3.1), adquirió progresivamente la mutación (TAT→TGT) (Y→C) en el codón que codifica el aminoácido 181 de la RT tras pases seriados en ausencia de droga a m.d.i: 0.1 DI₅₀/célula. Tras 10 pases en cultivo (virus 302/P11/-1) se detectó una mezcla de tipo salvaje (TAT) y mutado (TGT) en el codón que codifica dicho aminoácido. El genotipo mutado (TGT) se impuso completamente en los 5 pases siguientes (virus 302/P16/-1) y se mantuvo durante los pases subsiguientes (virus 302/P21/-1) (Fig. 3.8.A, D).

En el provirus de la muestra 304 se detectó una mezcla en el codón que codifica el aminoácido 69 de tipo salvaje y mutado (ACT→ACT/GAT correspondiente a la sustitución T→T/D del aminoácido 69) (Fig. 3.8.A, C). Esta sustitución está implicada en una reducción de susceptibilidad frente a ddC de 5 veces (Fitzgibbon y cols, 1992). En la población 304P el aminoácido 69 estaba sustituido a D (descrito en la sección 3.1.3). En la muestra del paciente 022 se observó la mutación simple ACT→AAT en el codón 69 en mayor proporción que la doble ACT→GAT (Fig. 3.8.B).

En los virus aislados de la muestra 304 procedentes de CMSP y de plasma tras su replicación en células MT-2 (virus 304 y 304P), el aminoácido 75 (implicado en la resistencia a D4T (Lacey y Larder, 1994^a)) estaba sustituido V→M (GTA→ATG) (Fig.3.8.A).

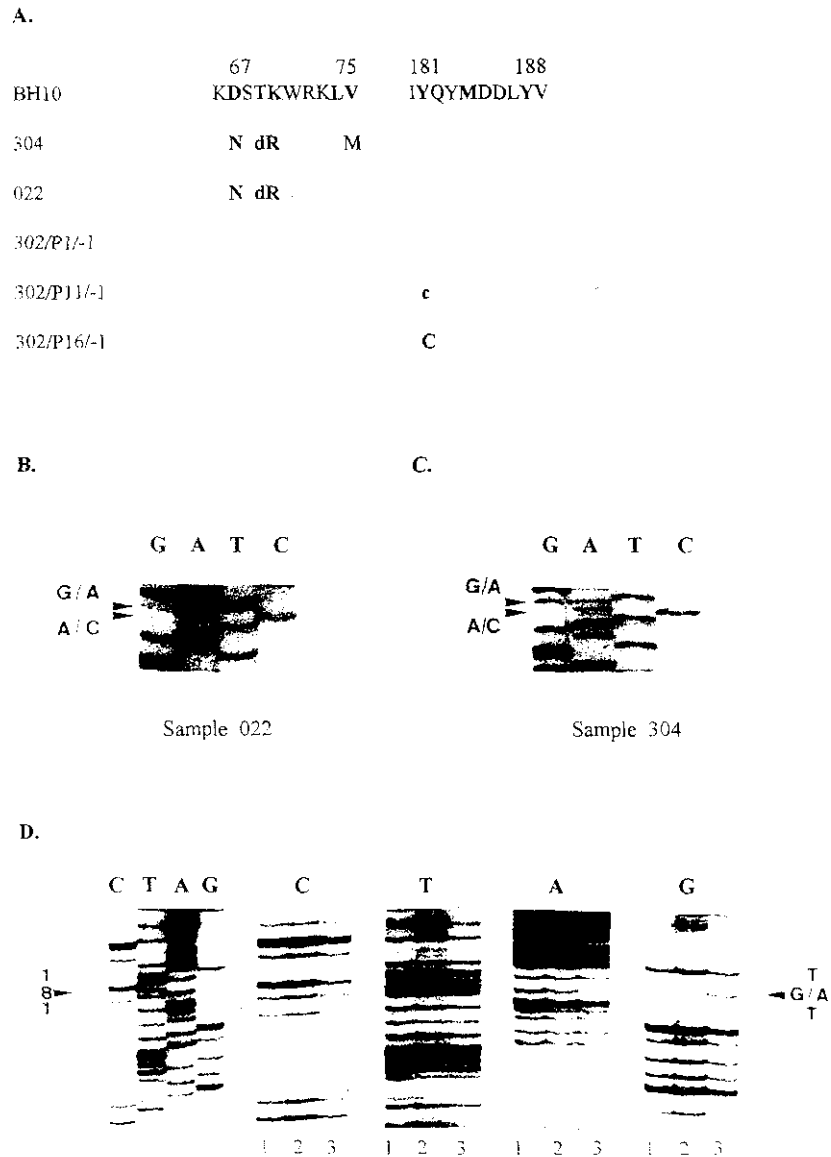


Figura 3.8. Identificación de mutaciones en los codones que codifican los aminoácidos 181, 69 y 75. (A) Alineamiento de secuencias de aminoácido 67 al 75 y 181 al 188. (B) y (C) Muestra de la mezcla observada en el codón que codifica el aminoácido 69 de las muestras 304 y 022 respectivamente. (D) Gel de secuencia del virus 302 antes y después de 10 y 15 pases a m.d.i. 0.1 DI_{50} /célula que incluye el codón que codifica el aminoácido 181.

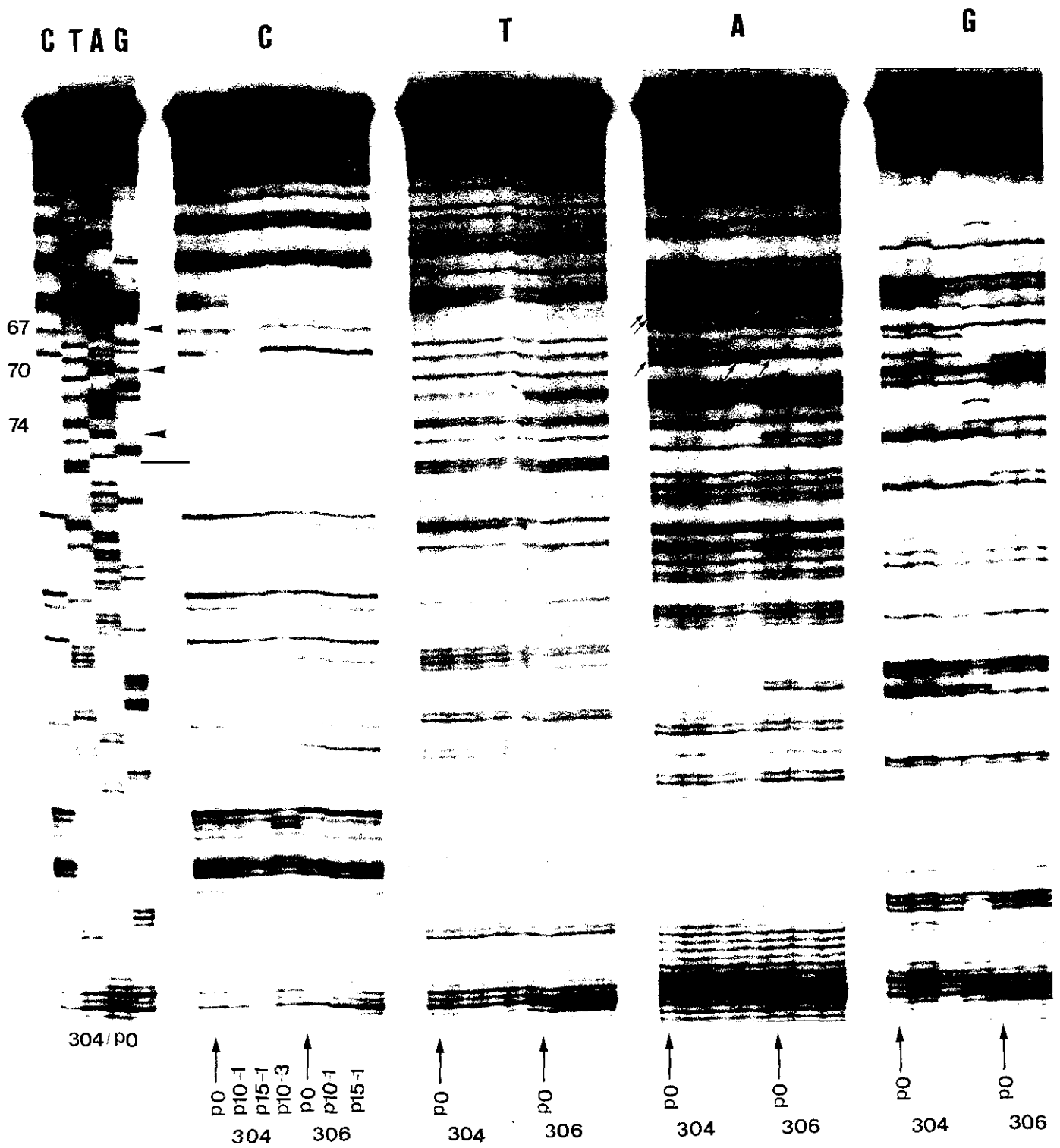


Figura 3.9. Gel de secuencia de las muestras 304 y 306 antes y después de los pases seriados en la región RT 5'. Las flechas indican las diferencias genotípicas. Los virus del paciente 304 muestran sustituidos los aminoácidos 67, 70 y 75 tras 10 pases seriados a m.d.i: 0.001 DI_{50} /célula.

3.3.2 Susceptibilidad biológica a drogas

Se realizaron ensayos biológicos para determinar la implicación de las mutaciones detectadas en el gen *pol* de los aislados 302, 304 y 022 en la susceptibilidad de los virus a ddC, D4T y a nevirapina.

3.3.2.1 Susceptibilidad biológica a nevirapina

La presencia de la mezcla de Y y C en el aminoácido 181 (virus 302/P11/-3) confirió resistencia parcial a nevirapina, con un valor de CI_{50} de 2.7 μ M. La sustitución de dicho residuo después de 5 pases consecutivos (virus 302/P16/-1) confirió un fenotipo resistente a nevirapina con un valor de $CI_{50} > 10 \mu$ M, lo que supuso un incremento de más de 100 veces respecto al virus tipo salvaje (LAI) (Fig. 3.10.D).

3.3.2.2 Susceptibilidad biológica a ddC

En ninguno de los virus procedentes de los pacientes 304 y 022 se detectó una disminución de susceptibilidad *in vitro* a ddC, a pesar de las mutaciones observadas en el codón 69 (Fig. 3.10.A, B).

3.3.2.3 Susceptibilidad biológica a D4T

Se analizaron los virus 304/P11/-3, 304/P21/-3 y 304/P16/-1 que mostraban heterogeneidad genotípica en el codón 75 (Fig 3.6.A, B, C). Los virus 304/P11/-3 y 304/P21/-3, en los que se detectó una mezcla de tipo salvaje y mutado en el codón que codifica el aminoácido 75 (V y M), presentaron valores de CI_{50} de 0.8 y 0.9 μ M, que supuso una reducción de susceptibilidad de aproximadamente 10 veces respecto al virus salvaje (LAI). La selección de la sustitución V→M en el aminoácido 75 redujo la susceptibilidad a D4T hasta en 30 veces (virus 304/P16/-1) respecto al virus tipo salvaje (Fig. 3.10.C).

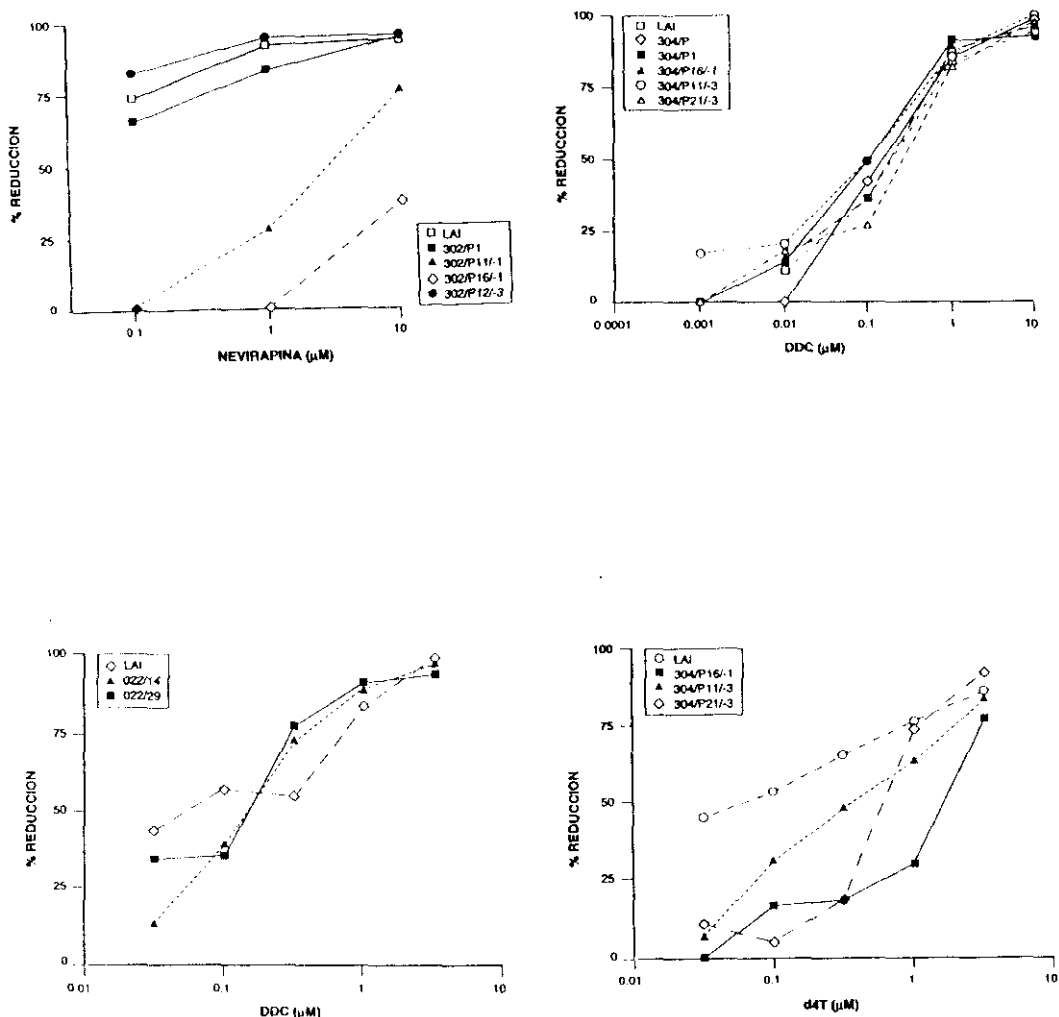


Figura 3.10. Sensibilidad a nevirapina, ddC o D4T de los casos 302, 304 y virus 022. En el eje de ordenadas se representa el % de reducción de formación de sincitios (placas) tras la infección de células HeLa CD4 en presencia de distintas concentraciones de inhibidor. En el eje de abscisas se indican las concentraciones de inhibidor empleadas. (A) Sensibilidad a nevirapina de los virus 302 antes y después de los pases seriados. (B) Sensibilidad a ddC de los virus 304 antes y después de los pases seriados. (C) Sensibilidad a ddC del virus 022. (D) Sensibilidad a D4T de los virus 304 antes y después de los pases seriados.

3.4 ESTUDIO DE LAS CUASIESPECIES NATURALES DEL VIH-1

La composición de una población del VIH-1 puede variar al adaptar el virus a cultivo (Meyerhans y cols, 1989; Delassus y cols, 1991; Kusumi y cols, 1992). Por esta razón se estudió la cuasiespecie original presente en células de sangre periférica de pacientes no tratados o tratados con AZT y/o ddI o con ddC para determinar si incluían mutaciones en sus genomas implicadas en resistencia a drogas no empleadas en el tratamiento de los pacientes. Para abordar esta cuestión se llevaron a cabo dos tipos de estudio:

- i)* estudio de la secuencia consenso de 60 muestras, 25 procedentes de pacientes no sujetos a terapia antirretroviral y 35 procedentes de pacientes en tratamiento con distintos inhibidores de la RT (Tablas 2.2 y 2.3) y
- ii)* estudio de secuencias individuales del espectro de mutantes de la cuasiespecie de 4 de las muestras de las que previamente se había analizado la secuencia consenso. En ambos estudios se analizaron las regiones del gen *pol* que codifican los aminoácidos 41 al 108 y 181 al 219 de la RT.

En esta sección se detallan las conclusiones de la secuenciación de un total de 45.348 nucleótidos.

3.4.1 Identificación de mutantes relacionados con resistencia a AZT, ddC, 3TC/FTC, ddI y a inhibidores no análogos de nucleósido en muestras de pacientes no tratados con inhibidores de la RT

Se estudiaron 25 muestras de pacientes no sujetos a terapia antivírica. En 9 de las muestras analizadas se identificaron cambios de aminoácido en posiciones relacionadas con resistencia a AZT, ddC, 3TC/FTC, ddI y a inhibidores de la RT no análogos de nucleósido (Figs. 3.11.A y 3.12.A).

El aminoácido 69, relacionado con un cambio en la susceptibilidad a ddC (Fitzgibbon y cols, 1992), estaba sustituido en las muestras 35 (T→S), GR34 (T→R) y THF13/-2 (T→A).

La sustitución más frecuente fue la del aminoácido 70 (K→R), que se detectó en las muestras 34, 35, GR34, THF13/-2, V75-5, 106, P9 y 58. Este cambio de aminoácido es uno de los implicados en la resistencia a AZT (Larder y cols, 1989^b).

La muestra 49 presentó una mezcla de tipo salvaje y mutante en el codón que codifica el aminoácido 184 (M/I). La sustitución M→I se ha relacionado con la adquisición de fenotipo altamente resistente a 3TC/FTC (Tisdale y cols, 1993; Boucher y cols, 1993^a).

La muestra P9 mostró una mezcla en el codón que codifica el aminoácido 100 (L→L/F). El cambio L→I en esta posición se ha relacionado con un cambio en la susceptibilidad de la RT frente a inhibidores no análogos de nucleósido (Richman, 1993).

3.4.2 Identificación de mutantes relacionados con resistencia a AZT, ddC, 3TC, ddi, D4T, ddG y a inhibidores no análogos de nucleósido en muestras de pacientes tratados con AZT, ddC o con ddi

Se estudiaron 35 muestras de pacientes tratados con distintos inhibidores de la RT (Tabla 2.2). Los pacientes de este estudio fueron tratados con AZT (20 primeras muestras de las figuras 3.11B y 3.12.B), tratados con ddi (muestra 21), con ddC (muestra 22), con ddi tras haber estado en tratamiento con AZT durante un mínimo de 8 semanas (muestras 23 a 27) y con AZT en combinación con factor humoral del timo ("thymic humoral factor", THF) (dos últimas muestras).

En 10 muestras se identificaron mutaciones que dieron lugar a cambios de aminoácidos relacionados con resistencia a AZT, ddC, 3TC/FTC, ddG y a inhibidores de la RT no análogos de nucleósido.

Se detectaron mutaciones en el codón que codifica el aminoácido 69 (implicado en resistencia a ddC) en 6 muestras que dieron lugar a distintos cambios del aminoácido: muestras 304/P0, D12/+58 y D29/-2 (mutación ACT→GCT y cambio del aminoácido T→A), muestra THF17/+4 (mutación ACT→GAT y cambio del aminoácido T→D), muestra V75-9 (mutación ACT→AAT y cambio del aminoácido T→N) y muestra V75-6 (mutación ACT→TAT y cambio del aminoácido T→Y).

La muestra D25/+24 presentó una mezcla en el codón que codifica el aminoácido 184 (ATG→ATG/ATA, que conlleva el cambio M →I) y la mutación GAA→AAA en el aminoácido 89 que cambió de E→K. El cambio de este aminoácido a G se ha relacionado con resistencia a ddG (Prasad y cols, 1991).

La muestra THF17/+4 presentó sustituido el aminoácido 75 (V→M), relacionado con resistencia a D4T (Lacey y Larder, 1994^a; Nájera y cols, 1994^a).

Las muestras P20 y THF13/+24 presentaron el cambio A→S en el aminoácido 98. Este aminoácido está relacionado con resistencia a inhibidores de la RT no análogos de nucleósido (Richman, 1993; Nunberg y cols, 1991; Byrnes y cols, 1993).

La muestra V75-6, procedente de un paciente en tratamiento con ddC, presentó una mezcla en el codón que codifica el aminoácido 215 y que dió lugar a los cambios T→S/F.

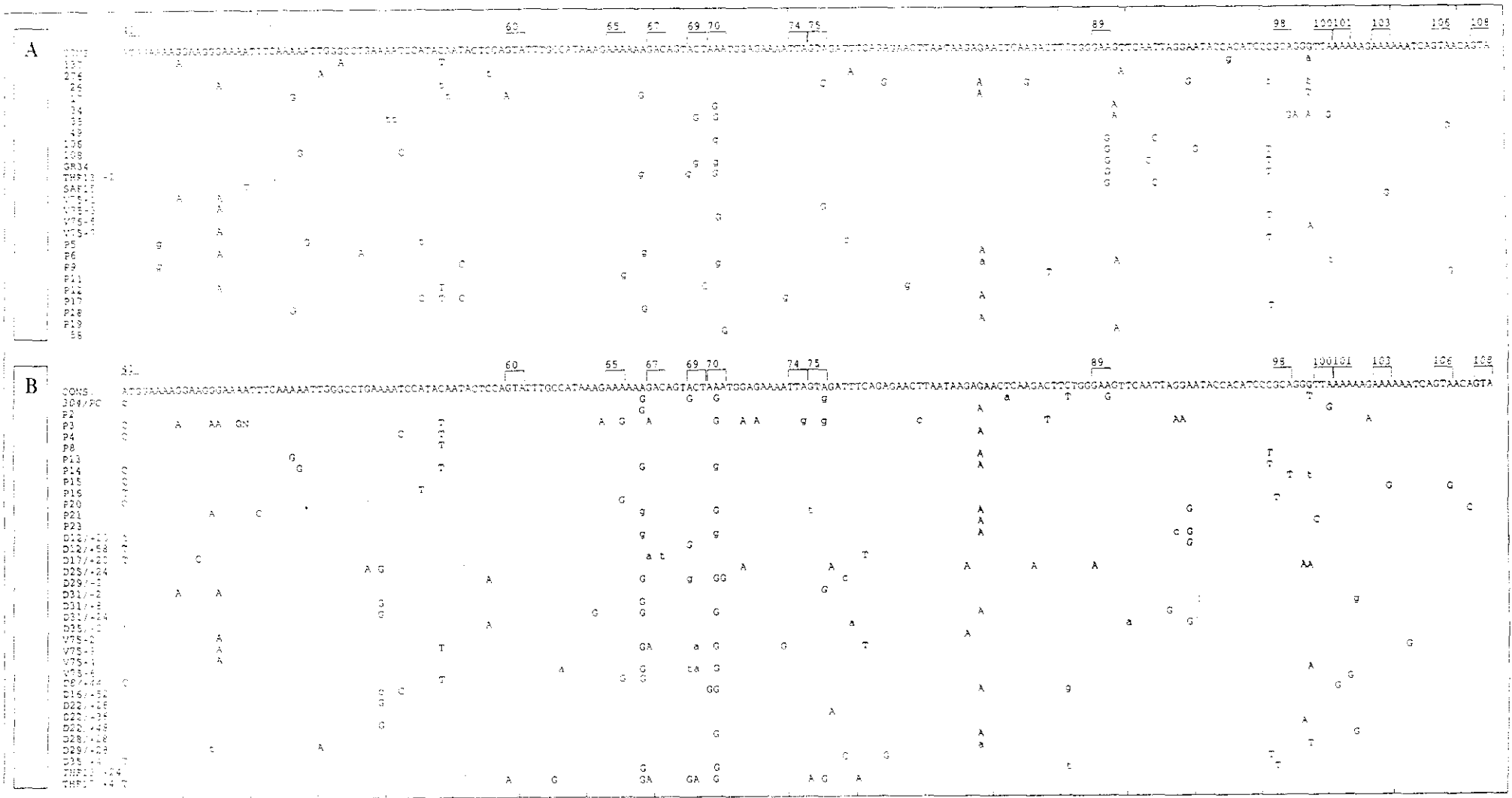


Figura 3.11. Alineamiento de secuencias de nucleótido de muestras analizadas directamente de CMSP sin adaptar a cultivo y procedentes de (A) pacientes no sujetos a terapia antirretrovírica. (B) pacientes sujetos a terapia antirretrovírica. Se incluyen los aminoácidos de la RT 41 al 108.

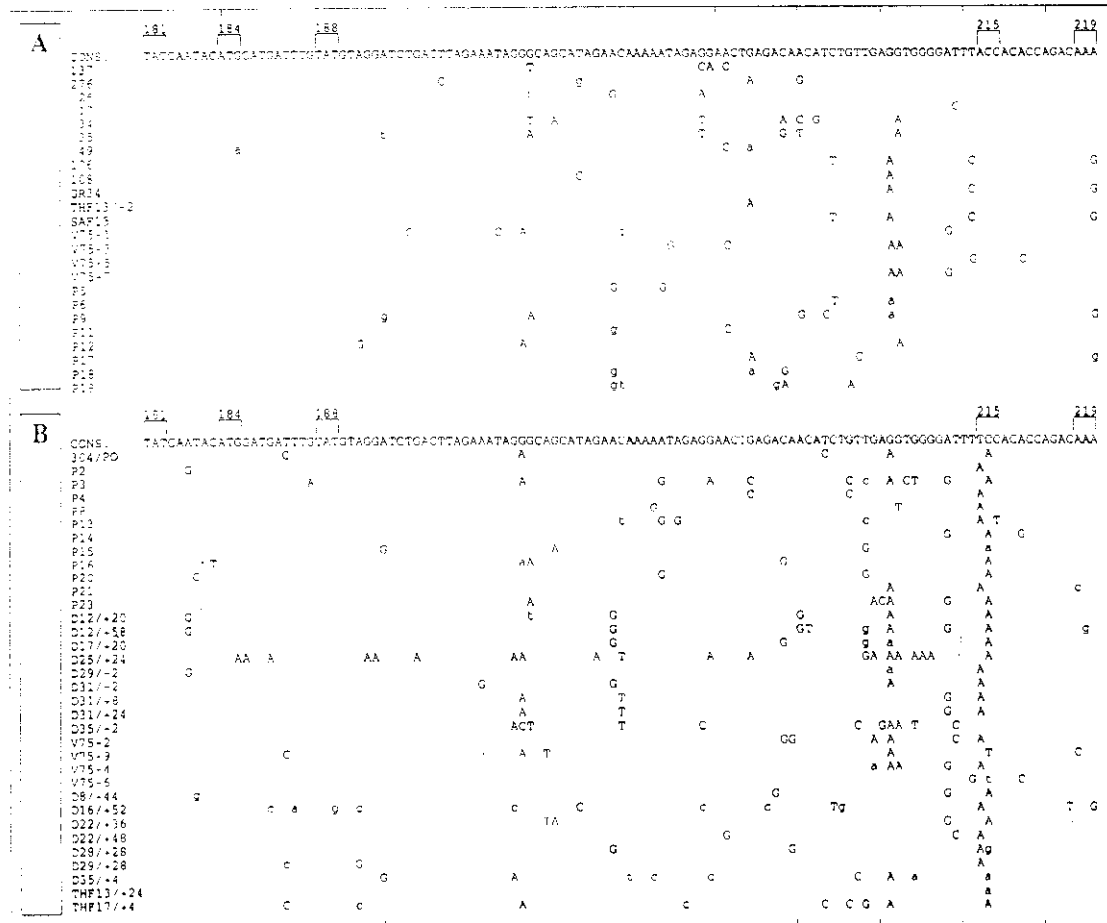


Figura 3.12. Alineamiento de secuencias de nucleótido de muestras analizadas directamente de CMSP sin adaptar a cultivo y procedentes de (A) pacientes no sujetos a terapia antirretrovírica y (B) pacientes sujetos a terapia antirretrovírica. Se incluyen los aminoácidos de la RT 181 al 219.

3.4.3 Análisis del espectro de mutantes en cuasiespecies originales en muestras de pacientes no tratados con inhibidores de la RT

Para cuantificar las frecuencias de mutante dentro de una cuasiespecie, se estudió la secuencia de nucleótidos del espectro de mutantes en cuasiespecies originales de 3 muestras de pacientes no tratados con inhibidores de la RT (muestras V75-5, 137 y 49). Se secuenciaron 20-21 clones de cada una de ellas en las regiones del gen *pol* que codifican los aminoácidos 41 al 108 y 181 al 219 de la RT.

En cada muestra se detectaron mutaciones en la secuencia consenso características de cada paciente.

3.4.3.1 Muestra V75-5

El estudio de la secuencia de 20 clones mostró la presencia de tres tipos de mutantes respecto a la secuencia consenso (Fig. 3.14):

- i)* dos subpoblaciones presentaron una delección de 5 aminoácidos en la región RT 3' (aminoácidos 189, 190, 191, 192 y 193).
- ii)* uno de los clones presentó sustituido el aminoácido 184 (M→T) implicado en la resistencia a 3TC y FTC (Tisdale y cols, 1993; Boucher y cols, 1993^a) y en una ligera disminución de la susceptibilidad frente a ddI y ddC (Gao y cols, 1994).
- iii)* en uno de los clones el aminoácido 185, uno de los tres D que integran el sitio catalítico de la RT, estaba sustituido a G.

Cada una de las subpoblaciones presentó mutaciones que permitió diferenciarlas entre sí.

3.4.3.2 Muestra 137

El estudio de la secuencia de 21 clones mostró una cuasiespecie más estrecha. Se detectó un clon que presentaba el cambio K→R del aminoácido 70 (Fig. 3.14). Este cambio está implicado en el desarrollo de resistencia a AZT.

3.4.3.3 Muestra 49

La secuencia consenso de este virus presentó una mezcla de M e I en el aminoácido 184 de la RT. Este cambio está implicado en la resistencia a 3TC (Boucher y cols, 1993^a). El estudio de 20 clones mostró la presencia de M en el aminoácido 184 en 11 clones y de I en 9 de ellos, confirmando la mezcla detectada en la secuencia consenso. Se detectó la mutación silenciosa GTG→GTA en el codón que codifica el aminoácido 106 en 1 de los clones analizados (Fig. 3.14).

3.4.4 Análisis del espectro de mutantes en la cuasiespecie original de la muestra de un paciente tratado con AZT

3.4.4.1 Muestra D17/+20

Se analizaron 21 clones cada uno de los cuales presentó mutaciones que permitió diferenciarlos entre sí y respecto a la secuencia consenso. Se detectaron mutaciones en los siguientes codones relacionados con resistencia a drogas: 67 (coincidiendo con la mezcla de tipo salvaje y mutado observado en la secuencia consenso del virus), 74 y 103. En los dos últimos casos los cambios detectados no conllevaron la sustitución de los aminoácidos. Cabe destacar, la presencia de un codón de terminación en uno de los clones analizados (Fig. 3.14).

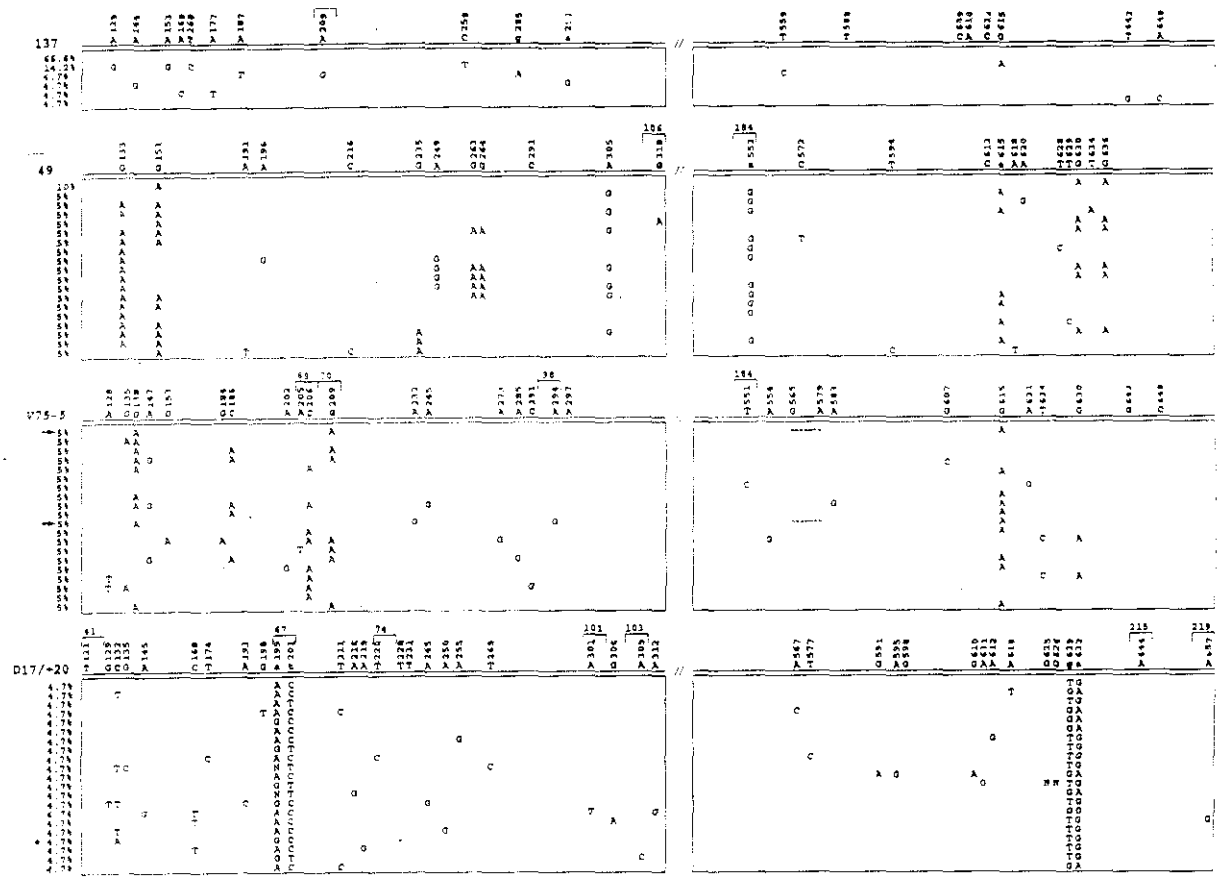


Figura 3.14 Espectro de mutantes de las cuasispecies 137, 49, V75-5 y D17/+20. En cada caja se indican secuencias de nucleótidos únicas en distintas líneas (izquierda, residuos 121 al 324; derecha, residuos 541 al 657). La abundancia relativa de cada una de las secuencias se da en valores de % del total de clones analizados (20 en el caso de las muestras 49 y V75-5 y 21 en el caso de las muestras 137 y D17/+20). La línea sobre cada caja representa nucleótidos de la secuencia consenso que han variado respecto a la secuencia de alguno de los clones del correspondiente espectro de mutantes; las letras en negrita indican aquellos nucleótidos que difieren de la secuencia consenso del correspondiente grupo de muestras (No tratados para las cuasispecies 137, 49 y V75-5 y Tratados para la cuasispecie D17/+20), como se indica en las Figuras 3.14 y 3.15. Las letras en minúscula indican ambigüedades (bandas múltiples) en el patrón del gel de secuencia. Las dos flechas en la caja del V75-5 indican las deleciones observadas. El asterisco en el D17/+20 indica un clon en el que se detectó la deleción del residuo T-228 que provoca un cambio del marco de lectura dando lugar a un codón amar 16 tripletes en dirección 3'.

3.4.5 Cuantificación de frecuencias de mutante

3.4.5.1 Muestras replicadas en células MT-2

El estudio de la secuencia consenso de 23 muestras (sección 3.1) supuso el análisis de 7.158 nucleótidos.

La secuenciación de 5 a 14 clones de los virus procedentes de los pases seriados del virus 304 supuso el análisis de 13.212 nucleótidos.

En esta sección se detalla la frecuencia de mutantes observada en las secuencias consenso de las muestras (Tabla 3.3) así como en las secuencias individuales de los virus clonados molecularmente (Tabla 3.4), lo que supuso el análisis de un total de 20.370 nucleótidos.

3.4.5.1.2 Cuasiespecies replicadas en células MT-2

El análisis de 7.158 nucleótidos de 21 muestras procedentes de pacientes tratados con AZT permitió obtener las siguientes frecuencias de mutante, expresadas como la proporción de nucleótidos mutados respecto a la secuencia consenso del conjunto de las muestras analizadas (Fig. 3.2).

En la Tabla 3.3 se detallan los valores de frecuencia de mutantes en las regiones RT 5' (que incluye los aminoácidos 60 al 99) y RT 3' (que incluye los aminoácidos 181 al 219). Se observa que las frecuencias de mutante son similares para la secuencia consenso en ambas regiones de la RT analizadas. Estos valores también son del mismo orden de magnitud para aquellos codones de la región RT 5' relacionados con resistencia a drogas. En el fragmento RT 3' se detectó una variación nula respecto a la secuencia consenso en dichas posiciones, lo que podría entenderse como una menor aceptación de cambios en dichos codones. Sin embargo, para estos cálculos no se ha tenido en cuenta la presumible preexistencia de genomas con el aminoácido 181 sustituido (Y→C) en una relativa elevada proporción en el aislado 302, en el que se seleccionó dicha subpoblación de manera mayoritaria tras pases en cultivo en ausencia de droga.

Tabla 3.3. Frecuencias de mutante en el gen pol de muestras de VIH-1 replicadas en células MT-2

Frecuencias de mutante ^a			
aa 60 al 99 de la RT		aa 181 al 219 de la RT	
Consenso	Codones implicados en resist. a drogas	Consenso	Codones implicados en resist. a drogas
$1.7 \cdot 10^{-2}$	$3.2 \cdot 10^{-2}$	$2.3 \cdot 10^{-2}$	0

^aLa frecuencia de mutación se define como la proporción de posiciones mutadas respecto a la secuencia consenso de nucleótidos de cada grupo de muestras; se han calculado dividiendo el número de mutaciones (respecto a la consenso) por el número total de nucleótidos secuenciados en cada uno de los grupos (Figura2).

3.4.5.1.2 Poblaciones individuales

Se analizaron 13.212 nucleótidos procedentes de clones moleculares de los virus 304/P1, 304/P11/-3 y 304/P16/-1 (sección 3.2). En la Tabla 3.4 se indican las frecuencias de mutantes obtenidas en cada cuasiespecie tras pases seriados en cultivo en ausencia de droga y a dos m.d.i.

Tabla 3.4. Frecuencias de mutante en el gen pol de poblaciones individuales de VIH-1 adaptadas a cultivo

Muestras ^c	Frecuencias de mutante ^a			
	aa 60 al 181 de la RT		aa 181 al 219 de la RT	
	Codones implicados en		Codones implicados en	
	Consenso	resist. a drogas	Consenso	resist. a drogas
304/P1	$8.6 \cdot 10^{-3}$	$7.7 \cdot 10^{-3}$	$2.2 \cdot 10^{-2}$	$1.4 \cdot 10^{-2}$
304/P16/-1	$4.2 \cdot 10^{-3}$	$1.0 \cdot 10^{-2}$	$1.0 \cdot 10^{-2}$	$4.0 \cdot 10^{-2}$
304/P11/-3	$7.0 \cdot 10^{-3}$	$1.6 \cdot 10^{-2}$	$2.3 \cdot 10^{-3}$	0

^aLa frecuencia de mutación se define como la proporción de posiciones mutadas respecto a la secuencia consenso de nucleótidos de cada grupo de muestras; se han calculado dividiendo el número de mutaciones (respecto a la consenso) por el número total de nucleótidos secuenciados en cada uno de los grupos (Figura 3.6). El origen de las muestras se indica en la Tabla 2.1 de materiales y métodos. Las secuencias de nucleótido sobre las que se han basado los cálculos de frecuencias de mutante se muestran en la Figura 3.6

En este caso se puede observar como la frecuencia de mutantes es del mismo orden de magnitud en todas las posiciones del genoma (implicadas y no implicadas en resistencia a drogas). Destaca también el que este valor es del orden de medio logaritmo menor en el caso de la secuencia consenso de los virus pasados

en cultivo (304/P16/-1 y 304/P11/-3) y fundamentalmente en la región RT 5' respecto al virus original (304/P1). Sin embargo, estos datos se han obtenido tras el análisis de una muestra relativamente pequeña.

3.4.5.2 Muestras no adaptadas a cultivo

El estudio de la secuencia consenso de 60 muestras (secciones 3.4.3 y 3.4.4) supuso el análisis de 18.672 nucleótidos y la secuenciación de 20 o 21 poblaciones individuales de cada una de 4 muestras clonadas molecularmente y previamente secuenciadas por secuenciación cíclica, supuso el análisis de un total de 26.676 nucleótidos.

En esta sección se detalla la frecuencia de mutantes observada en las secuencias consenso de las muestras (Tabla 3.5) así como en las secuencias individuales de las muestras clonadas molecularmente (Tabla 3.6), lo que supuso el análisis de un total de 45.348 nucleótidos.

3.4.5.2.1 Cuasiespecies originales

Se observó una frecuencia de mutantes del orden de 10^{-2} (Tabla 3.5), tanto en las muestras procedentes de pacientes en tratamiento antirretrovírico como entre las muestras procedentes de pacientes no sujetos a tratamiento. Se detectó un mayor porcentaje de mutaciones silenciosas entre los pacientes no tratados, lo que podría indicar una cierta presión de los inhibidores de la RT. Sin embargo los valores de frecuencia de mutantes fueron similares para aquellos codones implicados en resistencia a drogas como para aquellos que no están implicados en este fenómeno.

3.5.2 Poblaciones individuales

La frecuencia de mutantes entre las cuasiespecies individuales varió entre valores de $3.6 \cdot 10^{-3}$ y $1.1 \cdot 10^{-3}$ mutaciones por nucleótido (Tabla 3.6), medio logaritmo menor que en el caso de las muestras procedentes de distintos pacientes, corroborando los datos previamente publicados sobre la mayor heterogeneidad entre muestras de distintos pacientes que en muestras del mismo paciente (ver Introducción). Como sólo se detectaron 26 mutaciones en codones que codifican aminoácidos implicados en resistencia a drogas (y 18 de ellos pertenecían a la muestra V75-5) no se han calculado las frecuencias de mutantes en este último

grupo de codones. Sin embargo, las frecuencias de mutante en dichos codones en la muestra V75-5 fueron similares a las de la secuencia consenso previamente calculadas (Tabla 3.5).

Tabla 3.5. Frecuencias de mutante en el gen pol de secuencias consenso de muestras no adaptadas a cultivo

Grupo de muestras ^b	Frecuencias de mutante ^a			
	aa 41 al 108 de la RT		aa 181 al 219 de la RT	
	Consenso	Codones implicados en resist. a drogas	Consenso	Codones implicados en resist. a drogas
No tratados	$1.6 \cdot 10^{-2}$	$2.0 \cdot 10^{-2}$	$2.5 \cdot 10^{-2}$	$1.1 \cdot 10^{-2}$
Tratados	$2.0 \cdot 10^{-2}$	$2.9 \cdot 10^{-2}$	$3.4 \cdot 10^{-2}$	$0.8 \cdot 10^{-2}$

^aLa frecuencia de mutación se define como la proporción de posiciones mutadas respecto a la secuencia consenso de nucleótidos de cada grupo de muestras; se han calculado dividiendo el número de mutaciones (respecto a la consenso) por el número total de nucleótidos secuenciados en cada uno de los grupos (Figuras 3.11 y 3.12). ^bEl origen de las muestras se indica en las Tablas 2.2 y 2.3 de Materiales y Métodos.

Tabla 3.6. Frecuencias de mutante en el gen pol de poblaciones individuales de VIH-1 no adaptadas a cultivo

Muestras ^b	Frecuencias de mutante ^a			
	aa 41 al 108 de la RT		aa 181 al 219 de la RT	
	Consenso	Codones implicados en resist. a drogas	Consenso	Codones implicados en resist. a drogas
137	$4.4 \cdot 10^{-3}$	$1.0 \cdot 10^{-3}$	$3.6 \cdot 10^{-3}$	$<3.2 \cdot 10^{-3}$
49	$7.8 \cdot 10^{-3}$	$1.1 \cdot 10^{-3}$	$8.7 \cdot 10^{-3}$	$<3.2 \cdot 10^{-3}$
V75-5	$1.1 \cdot 10^{-2}$	$1.8 \cdot 10^{-2}$	$8.5 \cdot 10^{-3}$	$3.3 \cdot 10^{-3}$
D17/+20	$6.3 \cdot 10^{-3}$	$3.3 \cdot 10^{-3}$	$3.6 \cdot 10^{-3}$	$3.3 \cdot 10^{-3}$

^aLa frecuencia de mutación se define como la proporción de posiciones mutadas respecto a la secuencia consenso de nucleótidos de cada grupo de muestras; se han calculado dividiendo el número de mutaciones (respecto a la consenso) por el número total de nucleótidos secuenciados en cada uno de los grupos (Figuras 3.11 y 3.12). Las mutaciones en el residuo 552 de la cuasiespecie 49 y en los residuos 199, 201, 629 y 632 de la cuasiespecie D17/+20 que presentan una heterogeneidad enorme (el consenso se ha definido por menos del 60% de las secuencias) no se han incluido en los cálculos. ^bEl origen de las muestras se indica en las Tablas 2.2 y 2.3 de Materiales y Métodos.

4. DISCUSSION

4.1 Relevancia de la presión selectiva ejercida por la droga en la aparición de variantes resistentes a inhibidores de la retrotranscriptasa

La aparición de variantes del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 con susceptibilidad reducida a inhibidores de la retrotranscriptasa se ha descrito tras ensayos *in vitro* llevados a cabo en presencia del inhibidor correspondiente o tras el estudio *ex vivo* de muestras procedentes de pacientes en tratamiento (ver Introducción, sección 1.4).

En la primera parte del estudio analizó el papel que sobre la aparición de variantes resistentes ejerce la presión selectiva de la droga. Para ello se estudiaron muestras de pacientes, la mayoría en estadio avanzado de la enfermedad, en tratamiento con distintos agentes antirretrovíricos (fundamentalmente con AZT o con ddI).

Los pacientes incluidos en el protocolo AZT (terapia con AZT) habían recibido tratamiento durante más de 1 año en la mayoría de los casos en el momento de la toma de las muestras (Tablas 2.1 y 2.2 de Materiales y Métodos). En el 82% de los virus analizados (Tablas 3.1 y 3.2 de Resultados) se detectaron sustituciones de los aminoácidos 41, 60, 67, 70, 215 y/o 219 de la RT, todos ellos relacionados con la adquisición del fenotipo de resistencia a AZT (Larder y cols, 1989^b; Rubsamen-Waigmann y cols, 1991; Kellam y cols, 1992). Estos datos coinciden con descripciones previas en las que se ha estimado que tras un año de tratamiento con AZT el 89% de los pacientes en estadio tardío de la enfermedad presentan virus resistentes a dicha droga (Richman y cols, 1991^b).

De las sustituciones de aminoácido detectadas y relacionadas con la resistencia a AZT, la más frecuente fue la del aminoácido 215 T→Y, que conlleva la doble mutación ACC→TAC (Tablas 3.1 y 3.2 de Resultados) y que se ha relacionado con una reducción de la susceptibilidad de la enzima frente a AZT en 16 veces respecto a la de tipo salvaje (Larder y cols, 1989^b). Se ha sugerido que este cambio de aminoácido podría tener lugar a través del intermedio T→S (ACC→TCC), cambio que no altera la sensibilidad frente a AZT (Larder y cols, 1991^b) para posteriormente darse la sustitución S→Y/F (TCC→TAC/TTC) (Larder y Kemp, 1989).

En este trabajo se describe la detección del aminoácido 215S (aminoácido 215 serina) en las muestras de dos pacientes en tratamiento con AZT (muestras THF13/+24 y D35/-2). En el caso del paciente D35 se observó la transición de este aminoácido de S a Y (muestra D35/+4) una vez que el paciente no estaba en tratamiento con AZT por ser intolerante a dicha droga y había recibido tratamiento con ddI durante 4 semanas (Tabla 3.2). Este dato sugiere que la Y estaría más

aceptada en dicha posición que la S en ausencia de la presión selectiva de AZT ya que hasta la reciente descripción de la posible resistencia cruzada entre AZT y los inhibidores de la RT didesoxinucleótidos (ddI y ddC) (Mayers y cols, 1994), sólo se había descrito la resistencia cruzada de AZT con derivados de azida (Larder y cols, 1989^c; St Clair y cols, 1991). Esto, así como la descripción de la estabilidad de S215, (la enzima RT con el aminoácido 215S muestra una actividad del 100% respecto a la que presenta la enzima salvaje (Lacey y Larder, 1994^b)) podrían apuntar hacia una posible resistencia cruzada entre AZT y ddI o bien la aparición de dicha mutación podría haber aparecido como consecuencia de la variabilidad al azar del VIH-1.

La combinación de sustituciones de aminoácido relacionadas con resistencia a AZT más frecuentemente detectada fue la de los aminoácidos 41 (M → L) y 215 (T → Y) de la RT (que se observó en el 34% de los casos resistentes a AZT). Esta combinación conlleva una reducción de la susceptibilidad frente a AZT de 60 veces respecto a la enzima tipo salvaje (Kellam y cols, 1992; 1994) y es el marcador de la adquisición del fenotipo de alta resistencia a AZT (Larder, 1994).

El hecho de no haber observado la coincidencia cronológica de cambios genotípicos en los codones que codifican los aminoácidos 41 y 70 en ausencia de otras mutaciones de resistencia a AZT podría indicar la incompatibilidad entre 41L y 70R, sólo compensada por la presencia de mutaciones acompañantes en los codones que codifican los aminoácidos 67, 215 y/o 219. Si se ha observado, sin embargo, el aminoácido 70R acompañado por 215S, que apoyaría la idea de que la S215 es el paso intermedio en la sustitución del aminoácido 215 T → Y/F si se tiene en cuenta el orden de aparición descrito para las mutaciones de resistencia a AZT: el aminoácido 70 es el primero en cambiar de K a R, que se sustituye posteriormente de nuevo a K (tipo salvaje) coincidiendo con la sustitución de los aminoácidos 215 (T → Y/F) primero y 41 (M → L) después. Después aparecen las mutaciones en los codones que codifican los aminoácidos 67 (D → N), 219 (K → Q) y de nuevo 70 (K → R) (Boucher y cols, 1992^b; Kellam y cols, 1994). En las Tablas 3.1 y 3.2 en Resultados se puede observar un orden de aparición de las sustituciones de aminoácido relacionadas con resistencia a AZT similar al descrito.

No se dió, sin embargo, ninguna correlación entre el período de tratamiento y la detección de mutaciones de resistencia, si bien la mayoría de los pacientes presentaban síntomas de SIDA (Tablas 2.1, 2.2 y 2.3 de Materiales y Métodos) lo que favorece la detección de virus resistentes (Richman, 1991^b). Estas mutaciones se manifestaron en algún caso tras 4 semanas de tratamiento (muestra THF17/+4) mientras que en otros se detectó genotipo salvaje incluso después de 124 (muestra D31/+24).

Resultaría interesante estudiar el mecanismo que dispara la aparición de las mutaciones de resistencia a AZT, posiblemente relacionado con el número de ciclos replicativos ocurridos en el individuo infectado (Richman DD, 1993) y con la tasa de variabilidad del virus. Un ejemplo que apoyaría la idea de la importancia del número de ciclos replicativos en la variabilidad genética del VIH-1 es la muestra THF17/+4 que presenta sustituidos los aminoácidos 41, 60, 67, 70 y 215 de la RT tras un período de tratamiento con AZT en combinación con factor humoral del timo ("Thymus humoral factor", THF) de tan sólo 4 semanas. El THF es una hormona del timo que incrementa la diferenciación y maduración de los linfocitos T. Regula la diferenciación de los precursores de las células T, permitiendo un equilibrio entre la proporción de células T citotóxicas y ayudadoras ("helper") (Trainin, 1990). Sin embargo, el VIH replica fundamentalmente en células T activadas (Gallo y cols, 1984; Levy y cols, 1984), lo que hace suponer que el THF podría fomentar la replicación vírica incrementando, por tanto, el número de ciclos de replicación. Este hecho podría explicar la presencia de tal elevado número de mutaciones detectadas en la muestra. Otro ejemplo sería la muestra 304 que procede de un niño infectado por transfusión de sangre infectada con VIH-1 en 1984 y en estadio avanzado de la enfermedad en el momento de la toma de la muestra 7 años después. La mayor heterogeneidad genética del VIH-1 a medida que avanza la enfermedad está descrita en la literatura (McNearney y cols, 1992) y está probablemente relacionada con el número de ciclos replicativos ocurridos desde el momento de la infección.

En general la comparación de los datos de tipo molecular obtenidos de la secuenciación directa de productos de PCR con los datos de tipo biológico mostró una correlación entre la sustitución de determinados aminoácidos de la RT y la adquisición de fenotipo de resistencia a AZT, con valores de la concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) crecientes al aumentar el número de sustituciones de los aminoácidos relacionados con dicho fenotipo. Sin embargo, los virus 304 y 304P, que presentaban 5 de las 6 mutaciones relacionadas con resistencia a AZT (Tabla 3.1) no presentan el fenotipo altamente resistente esperado (Larder y cols, 1989^b; 1991^b). Esto podría estar relacionado con la presencia de cambios nucleotídicos en otros codones que pudieran contrarrestar su efecto, como se ha descrito en el caso de mutaciones implicadas en resistencia a diversas drogas (Larder, 1992; Boucher y cols, 1993^c; Emini y cols, 1993; Larder y cols, 1993; Richman y cols, 1994). En el caso del virus 302, que presentaba sustituidos los aminoácidos 41 y 215, que conlleva un aumento de la CI_{50} de 60 veces respecto al virus salvaje (Kellam y cols, 1992) por lo que era de esperar que presentara fenotipo altamente resistente a AZT, el fenotipo de resistencia parcial a AZT vendría determinado por

la presencia de la sustitución Y→C del aminoácido 181 en la población inicial del virus en una proporción relativamente elevada, aunque por debajo del límite de sensibilidad del método de secuenciación empleado (Larder, 1992; Richman y cols, 1994). Esto explicaría por otro lado, la selección de dicha sustitución Y181→C tras pases *in vitro* a elevada multiplicidad de infección (m.d.i) en ausencia de presión selectiva de la droga (ver Resultados, sección 3.3). Por el contrario, en la muestra 2080, que muestra un valor de la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) de 0.5 μM, sí se observó el efecto sinérgico descrito en la literatura para la combinación de las sustituciones de los aminoácidos 41 y 215 (Kellam y cols, 1992).

Los resultados obtenidos muestran una clara relación entre la administración de la droga y la detección de variantes resistentes, tanto en muestras cultivadas como en las muestras de pacientes estudiadas antes de su adaptación a cultivos celulares. Esto indica que la droga ejerce una selección positiva y favorece la selección de variantes con mutaciones respecto al virus de tipo salvaje que confieren resistencia a AZT, como se muestra claramente en el análisis de clones del virus 304 antes y después de los pases seriados.

El estudio molecular de virus procedentes de pacientes tratados con ddI no permitió detectar variantes del VIH-1 resistentes a la droga incluso en pacientes en tratamiento durante 56 semanas; *no se detectaron mutaciones en los codones que codifican los aminoácidos 65, 74, 135 y/o 184* (Gu y cols, 1994; Zhang y cols, 1994; Gu y cols, 1992; St Clair y cols, 1991) (ver sección 1.4 de Introducción) ni mutaciones en otros residuos que pudieran relacionarse con el fenotipo de resistencia a ddI. Esto podría explicarse porque: *i)* la droga no estuviera ejerciendo suficiente presión sobre el virus para requerir la selección de variantes con mutaciones de resistencia o *ii)* la presencia de las mutaciones de resistencia a ddI (en los codones que codifican los aminoácidos 65, 74, 135 y 184) en las cuasiespecies naturales del VIH-1 estuviera en una proporción menor que en la que se encuentran los variantes relacionados con resistencia a otros antirretrovíricos. Estudios realizados por mutagénesis dirigida han mostrado que la sustitución del aminoácido 74L de la RT repercute en una disminución de la actividad enzimática (Lacey y Larder, 1994^b). Este hecho explicaría la detección únicamente de genotipo salvaje en dicha posición. Sin embargo, las sustituciones I→L del aminoácido 135 y M→I del aminoácido 184 se han detectado en este estudio en muestras procedentes de pacientes sin tratar con ddI. La presencia de 184I en la cuasiespecie natural de un paciente no tratado sugiere la pre-existencia de dicha

sustitución de una manera no minoritaria en el enjambre de genomas que integran una cuasiespecie (Fig. 3.12 en Resultados). El cambio I135L se detectó tras pases seriados a baja multiplicidad de infección (sección 3.2 en Resultados) por lo que dicho cambio podría estar representado de manera minoritaria en la cuasiespecie vírica original (Sánchez-Palomino y cols, 1993) y, por tanto, por debajo de la sensibilidad de nuestro método de secuenciación directa de productos de PCR.

El estudio molecular de una muestra procedente de un paciente tratado con ddC durante 20 semanas presentó el aminoácido 69 sustituido de T→Y. Se requerirían estudios de susceptibilidad a droga de tipo biológico para determinar si esta sustitución presenta el mismo efecto sobre la susceptibilidad de la RT a ddC que el cambio T→D (Fitzgibbon y cols, 1992).

El estudio de la estabilidad de las mutaciones de resistencia a AZT *in vitro* y en ausencia de la droga, tras pases en cultivo de aislados resistentes a AZT en ausencia de inhibidor, permitió detectar genomas de tipo salvaje en los codones que codifican los aminoácidos 60, 67 y 70 una vez eliminada la droga.

Los experimentos de clonado molecular permitieron identificar que el mecanismo que subyace a la aparición de genomas de tipo salvaje tras la eliminación de la droga responde a un proceso de selección de poblaciones de tipo salvaje pre-existentes en forma minoritaria en la población original (predominantemente mutada) más que a un proceso de reversión verdadera.

Los resultados obtenidos indican una clara relación entre la administración de AZT y la aparición de variantes resistentes a dicho inhibidor. Las mutaciones relacionadas con el fenotipo de resistencia no presentan desventajas replicativas *in vitro*, fundamentalmente aquellas en los codones que codifican los aminoácidos 41 y 215 (Fig 3.2 en Resultados), que son las más frecuentemente detectadas entre los pacientes en tratamiento prolongado y confieren un nivel elevado de resistencia a AZT (Kellam y cols, 1992; 1994).

El análisis de virus procedentes de pacientes en tratamiento con AZT permitió detectar una proporción de virus resistentes a AZT similar entre las muestras adaptadas y las no adaptadas a cultivo celular (ver sección 3.1 de Resultados). De los datos obtenidos se desprende que los genomas que presentan sustituciones de los aminoácidos implicados en resistencia a AZT (M41L, V60I, D67N, K70R, T215Y/F y/o K219Q) no presentan desventaja replicativa *in vitro*, si bien hay que tener en cuenta que no se llevó a cabo un estudio sistemático

comparado de muestras antes y después de su adaptación a cultivo. Cabe destacar, sin embargo, la detección del aminoácido 215 serina (215S) únicamente en aquellas muestras analizadas directamente de las células del paciente, lo que podría responder a la selección negativa durante el cultivo celular de aquellos genomas que presentan el aminoácido de la RT 215S.

Los consiguientes pases seriados en células MT-2 a los que se sometió al virus 304 previamente replicado en MT-2, mostraron como el cultivo celular selecciona genomas pre-existentes en el virus original reduciendo la heterogeneidad de las cuasiespecies tras los pases (Figs. 3.5 y 3.6 en Resultados). A m.d.i baja se observó la selección de aquellos variantes presentes de manera minoritaria de la población inicial (Meyerhans y cols, 1989; Wolfs y cols, 1990; Sánchez-Palomino y cols, 1993) (genomas en los que los aminoácidos 60, 67 y 70 de la RT presentaban genotipo salvaje y el aminoácido 135 sustituido a L, cambio relacionado con resistencia a ddI (Gao y cols, 1992; St Clair, 1993)).

4.2 Aislados del VIH-1 resistentes naturales a inhibidores de la RT

La aparición de variantes del VIH-1 resistentes a drogas se ha descrito, tanto *in vitro* como *ex vivo*, en presencia de la presión selectiva de la droga (sección 1.4). Sólo recientemente Mohri y cols (1993) describieron la detección de virus parcialmente resistente a AZT en un paciente no tratado con la droga tras el aislamiento del virus por cocultivo de CMSP. Se sugirieron tres posibles explicaciones: *i)* la toma no declarada de AZT por parte del paciente, *ii)* la posible transmisión de virus resistente a AZT (Ericé y cols, 1993) y *iii)* la aparición *de novo* de la mutación AAA→AGA en el codón que codifica el aminoácido 70 de la RT debido a la variabilidad que presenta el VIH.

De los 23 aislados del VIH-1 analizados procedentes de pacientes tratados únicamente con AZT se identificaron dos resistentes a inhibidores de la RT con los que los pacientes no habían sido tratados. En ambos casos los genomas que presentaban los cambios de nucleótido observados se seleccionaron en ausencia de cualquier inhibidor de la RT; en el caso de la muestra 304 las mutaciones de resistencia a ddC y a D4T se encontraron en la secuencia consenso del virus aislado a partir de las CMSP del paciente (únicamente tratado con AZT) y en el caso 302 la mutación de resistencia a nevirapina se seleccionó tras pases seriados del aislado a m.d.i alta en ausencia de droga. Estas muestras proceden de sendos pacientes pediátricos infectados en 1982 (muestra 302) y 1984 (muestra 304),

respectivamente, por transfusión de sangre infectada con VIH-1. En dichas fechas, los inhibidores nevirapina, ddC y D4T no estaban en uso. En el momento de aislamiento de las muestras (enero de 1991) ninguna de las drogas mencionadas (nevirapina, ddC y D4T) se había empleado en España ni en protocolos clínicos de investigación, ni en laboratorios de investigación ni para uso médico general (Nájera y González La Hoz, 1994). Por otro lado, el tipo de paciente de que se trata hace muy improbable una reinfección por contacto con pacientes extranjeros incluidos en protocolos clínicos de investigación en tratamiento con dichas drogas. La muestra 022 procede de un paciente americano incluido en el protocolo 016 de ACTG (Fischl y cols, 1986), en tratamiento con AZT y no fue tratado con ddC.

Estos datos sugieren la posibilidad de la aparición de mutaciones en la RT del VIH-1 como consecuencia de la variabilidad al azar de este virus, como ocurre en el caso de los retrovirus y virus RNA en general. La elevada tasa de variación de la retrotranscriptasa debido a la ausencia de actividad 5'→3' exonucleasa, a la posibilidad de recombinación de las dos cadenas de RNA presente en el virión y de hipermutación llevan a una elevada tasa de heterogeneidad genética, no sólo entre pacientes distintos (Balfe y cols, 1990; Alizon y cols, 1986; Myers y cols, 1991) sino también en un mismo paciente (Hahn y cols, 1986; Saag y cols, 1988; Meyerhans y cols, 1989; Wolf y cols, 1990; Delassus y cols, 1991; Kusumi y cols, 1992; Wong y cols, 1994).

Los resultados obtenidos, tanto de las secuencias consenso de muestras de distintos pacientes como de las secuencias de poblaciones individuales del virus sujeto a pases seriados *in vitro*, reflejan la extensa variabilidad genética que presenta el VIH-1 (Goodenow y cols, 1989; Meyerhans y cols, 1989; Wain-Hobson y cols, 1989; Delassus y cols, 1991; Kusumi y cols, 1992; Vartanian y cols, 1992; ver Introducción, sección 1.5.1). Por ello, hay que referirse al VIH (al igual que a los virus RNA y al resto de los retrovirus) en términos de cuasiespecie (Introducción, sección 1.5), en la que co-existen esencialmente todas las mutaciones de nucleótido sencillas y dobles y, en proporción decreciente, mutaciones triples y cuádruples (Domingo y cols, 1985; Steinhauer y Holland, 1986). En esta heterogeneidad genética también juega un papel de gran importancia el número de provirus que se ha estimado puede haber en un individuo seropositivo (del orden de 10^9 - 10^{12} copias) (Wain-Hobson, 1993; Piatak y cols, 1993^{a,b}; Dalgleish, 1993), así como la diferente proporción en que está presente cada mutante en el conglomerado que compone la cuasiespecie. Quizá sea esta una posible explicación de las diferencias observadas en cuanto al tiempo requerido para el surgimiento de variantes resistentes a drogas, factor que también

condiciona la aparición de mutantes *in vitro*, como sería el caso del virus 302 (sección 3.3 en Resultados).

Los resultados obtenidos permiten concluir que el mecanismo principal que subyace a la aparición de mutaciones de resistencia a inhibidores de la RT es el de la selección de variantes resistentes pre-existentes en la población inicial. Hasta la fecha la dominancia de variantes resistentes a inhibidores de la RT se ha descrito únicamente en presencia de la presión selectiva de la droga.

De este trabajo se desprende que la dominancia de un determinado tipo de variantes responde a un proceso de selección de variantes pre-existentes en la cuasiespecie original. Además se muestra la selección de dichos variantes en ausencia de droga.

El estudio *in vitro* de posibles combinaciones terapéuticas dirigidas contra la retrotranscriptasa, tras pases seriados en cultivo en presencia de los correspondientes inhibidores, ha llevado a la selección de genomas con múltiples mutaciones de resistencia y con fenotipo de resistencia a múltiples drogas en ensayos *in vitro* de sensibilidad (Larder y cols, 1993; Emini y cols, 1993).

En este trabajo se describe un aislado viable (virus 304) que presenta mutaciones de resistencia a AZT (sustituciones de los aminoácidos 41, 60, 67, 70 y 215 de la RT), a ddC (la doble mutación en el codón que codifica el aminoácido 69) y a D4T (una mutación doble respecto a los virus de referencia en el codón que codifica el aminoácido 75). Otro aislado (022) presentaba mutaciones de resistencia a AZT (sustituciones de los aminoácidos 67, 70 y 219) y a ddC (aminoácido 69) y otro (virus 302) a AZT (aminoácidos 41 y 215) y a nevirapina (aminoácido 181). Esto apoya descripciones previas de la posibilidad de selección de virus viable con fenotipo de resistencia a múltiples drogas (Larder y cols, 1993; Emini y cols, 1993) y que se contraponen a la primera descripción de Chow y cols (1993^{a,b}) que llevó a la iniciación de la "terapia de convergencia" y según la cual la terapia combinada con AZT, ddI y nevirapina llevaría a la eliminación de la infección por la inviabilidad del VIH-1 resistente a las tres drogas.

4.3 Variabilidad en las cuasiespecies naturales del VIH-1

La naturaleza del fenómeno de la aparición de variantes con sensibilidad reducida a inhibidores de la RT no se conoce con exactitud aunque en el caso de determinadas drogas podría estar relacionado con la capacidad de la enzima de reconocer al sustrato (Martin y cols, 1993) o con la longitud de la cadena del DNA molde (Boyer y cols, 1994). Sin embargo hasta la fecha no se ha descrito el mecanismo de aparición de dichos variantes.

El análisis de las cuasiespecies naturales del VIH-1 en el gen *pol* llevado a cabo muestra claramente la presencia de mutaciones relacionadas con resistencia a drogas en el provirus procedente de pacientes no tratados con inhibidores de la RT o tratados con drogas distintas de aquellas a las que los virus muestran susceptibilidad reducida o resistencia. Estos resultados se obtuvieron tras el análisis de muestras no sujetas a cultivo celular para eliminar la posibilidad de alteraciones genéticas (Meyerhans y cols, 1989; Delassus y cols, 1991; Kusumi y cols, 1992; Smith y cols, 1993). Se identificaron 19 variantes con mutaciones en codones que codifican aminoácidos de la RT implicados en resistencia a drogas con los que los pacientes no habían sido tratados y en los que la transmisión de virus resistentes no parece posible por la no disponibilidad de los compuestos, como se ha detallado en la sección 4.3 para ddC, D4T e inhibidores de la RT no análogos de nucleósido. El inhibidor FTC no se ha incluido en protocolos de investigación en España y con 3TC se iniciaron en Junio de 1993, fecha posterior al aislamiento de la muestra 49 resistente a estos compuestos (Tabla 2.3 en Materiales y Métodos).

En las muestras procedentes de pacientes tratados con inhibidores de la RT en los que se detectaron cambios de aminoácidos implicados en resistencia a drogas con los que no habían sido tratados, la posibilidad de resistencia cruzada también se ha desestimado por la naturaleza de los cambios identificados. Se ha descrito resistencia cruzada entre AZT y compuestos derivados de azida (Larder y cols, 1989^b), entre ddI y ddC (St Clair y cols, 1991; Gu y cols, 1992; 1994; Gao y cols, 1992; Zhang y cols, 1994) y de estos dos últimos con 3TC (Gu y cols, 1992; 1994). Recientemente, sin embargo, se ha apuntado la posible resistencia cruzada entre AZT y ddI y ddC (Mayers y cols, 1994).

Los valores de las frecuencias de mutante obtenidas tanto para las muestras replicadas en células MT-2 como para las muestras no adaptadas a cultivo (Tablas 3.3 y 3.5 en Resultados) mostraron valores similares y semejantes a las frecuencias de mutantes previamente descritas para el gen *pol* de distintos VIH-1 respecto a los virus de referencia LAV_{BRU} y LAV_{ELI} (Alizon y cols, 1986). La menor frecuencia de mutante observada en aquellos codones implicados en resistencia a

drogas incluidos en la región que comprende los aminoácidos 181 al 219 entre las muestras cultivadas podría deberse a la reducida muestra estudiada, o a cierta selección debida al cultivo celular (que se ha observado reduce la heterogeneidad genética).

El hecho de que las frecuencias de mutante sean similares para aquellos codones que codifican aminoácidos implicados en resistencia a drogas y para los que no lo están, pone de relieve la relevancia de la variabilidad genética en la aparición de variantes resistentes y se puede esperar, por motivos estadísticos, que ocasionalmente tengan lugar mutaciones en codones implicados en resistencia a drogas en ausencia de presión selectiva de la droga.

Para ahondar en la naturaleza de la aparición de los cambios de aminoácido implicados en resistencia a drogas se analizaron las cuasiespecies de 4 muestras. En general, los valores del espectro de mutantes de cuasiespecies individuales resultaron ser del orden de 4 veces menores que los valores obtenidos tras la comparación de muestras independientes, tanto en los virus adaptados a cultivo como en los no adaptados (Tablas 3.5 y 3.6). Entre las muestras no adaptadas a cultivos celulares se observó que la frecuencia de mutantes entre los pacientes no tratados es ligeramente inferior en la zona entre los aminoácidos 181 y 195 ($5.5 \cdot 10^{-3}$ sustituciones por nucleótido) que en la zona entre los aminoácidos 196 y 219 ($4.2 \cdot 10^{-2}$ sustituciones por nucleótido), al igual que en el caso de las muestras adaptadas a cultivo (que procedían de pacientes tratados). En el caso de las muestras no replicadas en células MT-2 y procedentes de pacientes tratados, se obtuvieron valores similares ($1.6 \cdot 10^{-2}$ y $5.5 \cdot 10^{-2}$ sustituciones por nucleótido respectivamente) en ambas zonas. Estas frecuencias de mutante se correspondieron con la presencia de mutaciones relacionadas con resistencia a droga en poblaciones individuales, que no se vieron reflejadas en la secuencia consenso de la muestra.

Estos resultados confirman la posibilidad de la aparición de mutaciones de resistencia al azar y debido a la variabilidad del VIH-1 en genomas individuales en la cuasiespecie, así como la posibilidad de selección de dichos genomas siempre que la capacidad replicativa del virus no se vea comprometida.

Por otro lado, el estudio de muestras de VIH-1 no adaptadas a cultivo celular permitió detectar codones de terminación en algunas de las secuencias consenso. La presencia de un elevado porcentaje de genomas defectivos en individuos infectados se ha descrito con anterioridad (Wain-Hobson, 1989; Meyerhans y cols, 1989; Vartanian y cols, 1992; Wolfs y cols, 1990; Balfe y cols, 1990). Entre las secuencias consenso de las muestras replicadas en cultivo no se detectaron genomas defectivos, aunque sí se observó un codón de terminación en

uno de los clones individuales del virus 304 tras pases seriados. Una vez más se pone de manifiesto la presión selectiva que ejercen las condiciones de cultivo sobre las cuasiespecies.

Entre las muestras no adaptadas a cultivo se detectó un virus en que se observó una hipermutación G→A, como se ha descrito con anterioridad en otros genes del VIH (Vartanian y cols, 1991; 1994; Meyerhans y cols, 1994) así como en otros virus (Pathak y Temin, 1991). Aunque la presencia de genomas hipermutados no necesariamente corresponde con genomas defectivos, como se ha descrito para el virus respiratorio sincitial (Rueda y cols, 1994), en este caso los dos aminoácidos D supuestamente implicados en la catálisis enzimática (Larder y cols, 1987; Delareu y cols, 1991) estaban sustituidos, por lo que sería presumible que dicho genoma fuera defectivo.

En este estudio, el análisis de aislados ha revelado la existencia de mutantes resistentes a inhibidores de la RT en las cuasiespecies de VIH que no han sido expuestas a dichos inhibidores. Estos datos apuntan a la relevancia de la variabilidad genética del VIH-1 en el fenómeno de desarrollo de resistencias a antivirales, así como a la posibilidad de selección de variantes resistentes en ausencia de la presión selectiva de la droga.

La selección de virus RNA resistentes a drogas *in vivo* o *in vitro* se han descrito para una variedad de virus (Domingo, 1989; Domingo y Holland, 1994). La tolerancia de cambios de aminoácido que presenta la retrotranscriptasa se ha ilustrado en este trabajo tanto por el análisis de secuencias consenso de pacientes individuales como por el de clones moleculares del espectro de mutantes.

Este estudio pone de manifiesto la necesidad de controlar y evitar el uso indiscriminado de agentes antirretrovíricos como ha sido descrito con anterioridad para una variedad de virus (Domingo y Holland, 1992; Duarte y cols, 1994).

5. CONCLUSIONES

1. El tratamiento de pacientes infectados por el VIH con AZT ejerce una presión selectiva sobre las cuasiespecies del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) favoreciendo la dominancia de variantes resistentes (en algunos casos tras sólo 12 semanas de tratamiento).

2. En pacientes intolerantes a AZT y tratados con ddI durante períodos de hasta 56 semanas no se ha observado la presencia de variantes resistentes en su secuencia consenso.

3. En virus con genotipo resistente a AZT, la estructura de cuasiespecies del VIH-1 permite la co-existencia de genomas mutantes con genomas de tipo salvaje.

4. En este trabajo se ha podido demostrar en condiciones de cultivo celular que el mecanismo de re-aparición de virus de tipo salvaje tras la eliminación del tratamiento con AZT responde a la imposición de poblaciones con genotipo salvaje presentes de manera minoritaria en la población global y no a un fenómeno de reversión verdadera.

5. En ausencia de la presión selectiva de la droga se han detectado aislados resistentes a drogas no empleadas en el tratamiento de los pacientes (no análogos de nucleósido y D4T).

6. La estructura de cuasiespecies del VIH-1 le confiere una heterogeneidad genética tal que permite la pre-existencia de mutantes resistentes a inhibidores de la RT aún en ausencia de tratamiento. Ello se ha documentado por el cálculo de frecuencias de mutante promedio y frecuencias de mutante en los codones que codifican aminoácidos relacionados con resistencia a drogas.

7. Se han detectado genomas con múltiples mutaciones implicadas en resistencia a drogas en las cuasiespecies del VIH-1 procedentes de pacientes tanto tratados como no tratados.

8. Se ha detectado un genoma del VIH-1 viable con múltiples mutaciones, diez de las cuales están relacionadas con resistencia a tres inhibidores de la RT.

9. Este trabajo pone de manifiesto la importancia de las cuasiespecies como reservorios de variantes fenotípicas, de enorme relevancia para el control del SIDA.

6. BIBLIOGRAFIA

Albert J, Abrahamsson B, Naggy K, Aurelius E, Gaines SH, Nyström G y Fenyö EM. Rapid development of isolate-specific neutralizing antibodies after primary HIV-1 infection and consequent emergence of virus variants which resist neutralization by autologous sera. *AIDS* 1990; 4: 107-112.

Albert J, Wahlberg J, Lundeberg J, Cox S, Sandström E, Wahren B y Uhlén M. Persistence of Azidothymidine-Resistant Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA Genotypes in Posttreatment Sera. *J Virol* 1992; 66: 5627-5630.

Allen JS, Coligan JE, Lee TH, Mc Lane MF, Kanki P y cols. 1985. *Science*; 230: 810-813.

Almoguera C, Shibata D, Forrester K, Martín J, Arnheim N y Perucho M. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain c-K-ras genes. *Cell* 1988; 53: 549-554.

Araya A, Keith G, Fournier M, Gandar JC, Labouesse J y Litvak S. Photochemical cross-linking studies on the interactions of avian myeloblastosis virus reverse transcriptase with primer tRNA Trp and TTP. *Arch Biochem Biophys* 1980; 205: 437-438.

Arendrup M, Nielsen C, Hansen J-ES y cols. Autologous HIV-1 neutralizing antibodies: emergence of neutralization-resistant escape virus and subsequent development of escape virus neutralizing antibodies. *J Acquir Immune Defic Syndrome* 1992; 5: 303-307.

Arnold E, Jacobo-Molina A, Nanni RG, Williams RL, Lu X, Ding J, Clark ADJr, Zhang A, Ferris AL, Clark P, Hizi A y Hughes SH. Structure of HIV-1 reverse transcriptase/DNA complex at 7 Å resolution showing active site locations. *Nature* 1992; 357: 85-89.

Arrigo SJ y Chen ISY. Rev is necessary for translation but not for cytoplasmic accumulation of HIV-1 vif, vpr and env/vpu 2 RNAs. *Genes Dev* 1991; 5: 808-819.

Arya SK, Guo C, Josephs SF y Wong-Staal F. Trans-activator gene of human T-lymphotropic virus type III (HTLV-III). *Science* 1985; 229: 69-73.

Asjö B, Morfeldt-Manson L, Albert J, Biberfeld G, Karlsson A, Lidman K y Fenyö EM. Replicative capacity of human immunodeficiency virus from patients with varying severity of HIV infection. *Lancet* 1986; ii: 660-662.

Baba M, Tanaka H, De Clercq E, Pauwels R, Balzarini J, Schols D, Nakashima H, Perno CF, Walker RT y Miyasaka T. Highly specific inhibitors of HIV-1 by a novel 6-substituted acyclovir derivative. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 165: 1375-1381.

Balfe P, Simmonds P, Ludlam CA, Bishop JO y Leigh-Brown AJ. Concurrent evolution of human immunodeficiency virus type 1 in patients infected from the same source: rate of sequence change and low frequency of inactivating mutations. *J Virol* 1990; 64: 6221-6233.

Ball JK, Holmes EC, Whitwell H y Desselberger U. Genomic variation of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1): molecular analyses of HIV-1 in sequential blood samples and various organs obtained at autopsy. *J Gen Virol* 1994; 75: 867-879.

Baltimore D. Viral RNA dependent DNA polymerase. *Nature* 1970; 226: 1211-1213

Balzarini J, Herdewijk P y De Clercq E. Differential patterns of intracellular metabolism of 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxythymidine and 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine, two potent anti-human immunodeficiency virus compounds. *J Biol Chem* 1989; 264: 6127-6133.

Balzarini J, Karlsson A, Pérez-Pérez M-J, Camarasa M-J, Tarpley WG y De Clerk E. Treatment of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)- infected cells with combinations of HIV-1-specific inhibitors results in a different resistance pattern than does treatment with single-drug therapy. *J Virol* 1993; 67: 535 -553.

Bandrés JC y Ratner L. Human immunodeficiency virus type 1 nef protein down-regulates transcription factors NF- κ B and AP-1 in human T cells in vitro after T-cell receptor stimulation. *J Virol* 1994; 68: 3243-3249.

Barat C, Lullien V, Schatz O, Keith G, Nugeyre MT, Grüninger-Leitch F, Barré-Sinoussi F, LeGrice SFJ y Darlix JL. HIV-1 reverse transcriptase specifically interacts with the anticodon domain of its cognate primer tRNA. *EMBO J* 1989; 8: 3279-3285.

Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Venize-Brun F, Rouzioux C, Rozemaum W y Montaigner L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983; 220: 868-871.

Baschelet E, Domingo E y Weissman C. The proportion of revertant and mutant phage in a growing population as a function of mutation and growth rate. *Gene* 1976; 1: 27-32

Benko DM, Schwartz S, Pavlakis GN y Felber BK. A novel human immunodeficiency virus type 1 protein, tev, shares sequences with tat, env and rev proteins. *J Virol* 1990; 64: 2505-2518.

Berkhout B, Silverman RH y Jeang K-T. Tat trans-activates the human immunodeficiency virus through a nascent RNA target. *Cell* 1989; 59: 273-282.

Boege U, Kobasa D, Onodera S, Parks GD, Palmenberg AC y Scraba DG. Characterization of Mengo virus neutralization epitopes. *Virology* 1991; 181: 1-13.

Boucher CAB^a, Cammack N, Schipper P, Schuurman R, Rouse P, Wainberg MA y Cameron J. High-level resistance to (-) enantiomeric 2'-deoxy-3'-thiacytidine in vivo is due to one amino acid substitution in the catalytic site of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 2231-2234.

Boucher CAB^a, Lange JMA, Miedema FF, Weverling GJ, Koot M, Mulder JW, Goudsmit J, Kellam P, Larder BA y Tersmette M. HIV-1 biological phenotype and the development of zidovudine resistance in relation to disease progression in asymptomatic individuals during treatment. *AIDS* 1992; 6: 1259-1264.

Boucher CAB^b, O'Sullivan E, Mulder JW, Ramautarsing C, Kellam P, Darby G, Lange JMA, Goudsmit J and Larder BA. Ordered appearance of zidovudine (AZT) resistant mutations during treatment. *J Infect Dis* 1992; 165: 105-110.

Boucher CAB^b, Schuurman R, Nijhuis M, Van Leeuwen R, Danner S, Kaye S, Mulder J, Sninsky J y Kwok S. Acquisition of 3TC resistance mutations coincides with an increase in viral load. The first national conference on human retroviruses and related infections. Washington, DC, December 1993.

Boucher CAB^c, Leeuwen Rv, Kellam P, Schipper P, Tinajel J, Lange JMA y Larder BA. Effects of discontinuation of zidovudine treatment on zidovudine sensitivity of human immunodeficiency virus type 1 isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 1525-1530.

Boyer y cols. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 4882-4886.

Browne M, Mayer K, Chafee S, Dudley M, Posner M, Sreinberg S, Graham K, Geletko S, Zinner S, Denman S, Dunkle L, Kaul S, MacLaren C, Skowron G, Kouttab N, Kennedy T, Weitberg A y Curt G. 2',3'-didehydro-3'-deoxythymidine (d4T) in patients with AIDS or AIDS-related complex: a phase I trial. *J Infect Dis* 1993; 167: 21-27.

Byrnes VW, Emini EA, Schleif WA, Condra J, Schneider CL, Long WJ, Wolfrang JA, Graham DJ, Gotlib L, Schlabach AJ, Wolanski BS, Blahy O, Quintero JC, Rhodes A, Roth E, Titus DL y Sardana VV. Susceptibilities of human immunodeficiency virus type 1 enzyme and viral variants expressing multiple resistance-engendering amino acid substitutions to reverse transcriptase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 1404-1407.

Byrnes VW, Sardana W, Schleif WA, Condra JH, Waterbury JA, Wolfgang JA, Long WJ, Schneider CL, Schlabach AJ, Wolanski BS, Graham DJ, Gotlib L, Rhodes A, Titus DL, Roth E, Blahy OM, Quintero JC, Staszewski S y Emini E. Comprehensive mutant enzyme and viral variant assesment of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase resistance to non-nucleoside inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 1576-1579.

Cao J, Vasir B y Sodroski J. Changes in the cytopathic effects of human immunodeficiency virus type 1 associated with a single amino acid alteration in the ectodomain of the gp41 transmembrane glycoprotein. *J Virol* 1994; 68: 4662-4668.

Centers for Disease Control. Classification system for HTLV-III/LAV infections. *MMWR* 1986; 35: 334-339.

Centers for Disease Control. Classification system for human immunodeficiency virus (HIV) infection in children under 13 years of age. *MMWR* 1987; 36: 225-236.

Cheeseman SH, Hattox SE, McLaughlin MM, Koup RA, Andrews C, Bova CA, Pav JW, Sullivan JL y Keims JJ. Pharmacokinetics of nevirapine: initial single-rising-dose study in humans. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 178-182.

Cheng-Mayer C, Homsy J, Evans LA y Levy JA. Identification of human immunodeficiency virus subtypes with distinct patterns of sensitivity to serum neutralization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 2815-2819.

Chesebro B y Wehrly K. Development of a sensitive quantitative focal assay for human immunodeficiency virus infectivity. *J Virol* 1988; 62: 3779-3788.

Chow Y-K^a, Hirsch MS, Merrill DP, Bechtel LJ, Eron JJ, Kaplan JC y D'Aquila R. Use of evolutionary limitations of HIV-1 multidrug resistance to optimize therapy. *Nature* 1993; 361: 650-654.

Chow Y-K^b, Hirsch MS, Kaplan JC y D'Aquila RT. HIV-1 error revealed. *Nature* 1993; 364: 679.

Coates JAV^a, Cammack N, Jenkinson HJ, Mutton IM, Pearson BA, Storer R, Cameron JM y Penn CR. The separated enantiomers of 2'-deoxy-3'-thiacytidine (BCH 189) both inhibit human immunodeficiency virus replication in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 202-205.

Coates JAV^b, Cammack N, Jenkinson HJ, Jowett AJ, Jowett MI, Pearson BA, Penn CR, Rouse PL, Viner KC y Cameron JM. (-)-2'-deoxy-3'-thiacytidine is a potent, highly selective inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 and type 2 replication in vivo. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 733-739.

Cochrane AW, Perkins A y Rosen CA. Identification of sequences important in the nucleolar localization of human immunodeficiency virus rev: relevance of nucleolar localization to function. *J Virol* 1990; 64: 881-885.

Coffin JM, Tschlis PN, Baker CS y Voynow S. Variation in avian retrovirus genomes. *Ann NY Acad Sci* 1980; 354: 410-415.

Coffin JM. Genetic variation in AIDS viruses. *Cell* 1986; 46: 1-4.

Coffin JM. Structure and classification of retroviruses. En: *The Retroviridae I* 1992. (Levy JA ed). Plenum Press, New York y London.

Coffin JM^a. Retroviridae and their replication. In: *Virology 1990*. (Fields N, Knipe DM, Chanock RM, Hirsch MS, Melnick JL, Monath TP y Roizman B eds). Raven Press, New York.

Coffin JM^b. Genetic variation in retroviruses. En: *Applied virology research*, vol 2, (Kurstak E, Marusyk RG, Murphy FA y Van Regenmortel MHV, eds). New York: Plenum Publishing; 1990.

Cohen EA, Terwilliger EF, Jalinoos Y, Proulx J, Sodroski JG y Haseltine WA. Identification of HIV-1 vpr product and function. *J Acquir Immune Defic Syndrome* 1990; 3: 11-18.

Concorde Coordinating Committee. MRC/ANRS randomised double-blind controlled trial of immediate and deferred zidovudine in symptom-free HIV infection. *Lancet* 1994; 343: 871-881.

Connolly KJ y Hammer S. Antiretroviral Therapy: Reverse Transcriptase Inhibition. *Antimicrob Agents and Chemother* 1992; 36: 245-254.

Connor RI y Ho DD. Human immunodeficiency virus type 1 variants with increased replicative capacity develop during the asymptomatic stage before disease progression. *J Virol* 1994; 68: 4400-4408.

Cristina J, López JA, Albo C, García-Barreno B, García J, Melero JA y Portela A. Analysis of genetic variability in human respiratory syncytial virus by the RNase A mismatch cleavage method: subtype divergence and heterogeneity. *Virology* 1990; 174: 126-134

Cristina J, Moya A, Arbiza J, Russi J, Hortal M, Albo C, García-Barreno B, García O, Melero JA y Portela A. Evolution of the G and P genes of human respiratory syncytial virus (subgroup A) studied by the RNase A mismatch cleavage method. *Virology* 1991, 184: 210-218.

Dahlberg JE. An overview of retrovirus replication and classification. En: *Immunodeficiency Disorders and Retroviruses* (Kalman Perk ed). Londres, Academic Press 1991.

Dagleish AG. Viral burden in AIDS. *Nature* 1993; 366: 22.

Darby G y Larder BA. The Clinical Significance of Antiviral Drug Resistance. 4th Forum in *Virology*. 1992; 116-120.

de Bethune MP, Pauwels R, Andries K y cols. AZT resistance reversal by the nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor α -APA R18893 in a symptomatic HIV-infected individual. Second International Drug Resistance Workshop, 1993, Noordwijk, The Netherlands.

De Borde DC, Naeye VW, Herlocher L Y Maassab HF. Resolution of a common RNA sequencing ambiguity by terminal deoxynucleotidyl transferase. *Anal Biochem* 1986; 157: 275-282.

De Clerq E. HIV Inhibitors Targeted at the Reverse Transcriptase. *AIDS Research and Human Retroviruses* 1992; 8:119-134.

De Clerq E. HIV-1 specific RT inhibitors: Highly selective inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 that are specifically targeted at the viral reverse transcriptase. *Medicinal Research Reviews* 1993; 13: 229-258.

De Jong JJ, De Ronde A, Keulen W, Tersmette M y Goudsmit J. Minimal requirements for the human immunodeficiency virus type 1 V3 domain to support the syncytium-inducing phenotype: analysis by single amino acid substitution. *J Virology* 1992; 66: 6777-6780.

de la Torre JC, Wimmer E y Holland JJ. Very high frequency of reversion of guanidine resistance in clonal pools of guanidine-dependent type 1-poliovirus. *J Virology* 1990; 64: 664-671.

De Vreese K, Debyser Z, Vandamme A-M et al. Resistance of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase to TIBO Derivatives Induced by Site-Directed Mutagenesis. *Virology* 1992; 188: 900-904.

Debyser Z, Pauwels R, Desmyter J, Kukla M, Janssen J y De Clercq E. An antiviral target on reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1 revealed by tetrahydroimidazo-[4,5,1-jk][1,4] benzodiazepin-2 (1H)-one and -thione derivatives. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 1451-1455.

Delarue M, Poch O, Tordo N, Moras D y Argos P. *Protein Eng* 1990; 6: 461-467.

Delassus S, Cheynier R y Wain-Hobson S. Evolution of human immunodeficiency virus type 1 nef and long terminal repeat sequences over 4 years in vivo and in vitro. *J Virol* 1991; 65: 225-231.

Delassus S, Cheynier R y Wain-Hobson S. Nonhomogeneous distribution of human immunodeficiency virus type 1 proviruses in the spleen. *J Virol* 1992; 66: 5642-5645.

Demeter L, Resnick L, Nawaz T, Timpone JG Jr., Batts D y Reichman RC. Phenotypic and genotypic analysis of atazanavir (ATV) susceptibility of HIV-1 isolates obtained from patients receiving ATV monotherapy in a phase I clinical trial (ACTG 187): comparison to patients receiving combination therapy with ATV and zidovudine. Third Workshop on Viral Resistance, 1993, Gaithersburg, MD, USA.

Di Marzo Veronese F, Copeland TD, De Vico AL, Rahman R, Oroszlan S, Gallo RC y Sarngadharan M. Characterization of highly immunogenic p66/p51 as the reverse transcriptase of HTLV III/LAV. *Science* 1986; 231: 1289-1291.

Díez J, Hofner M, Domingo E y Donaldson AI. Foot and mouth disease virus strains isolated from persistently infected cell cultures are attenuated for mice and cattle. *Virus Research* 1990; 18: 3-8.

Domingo E y Holland JJ. Mutation rates and rapid evolution of RNA viruses. In: *The evolutionary biology of viruses*. (Morse SS, ed) Raven Press 1994; 161-184.

Domingo E, Holland JJ y Alhquist P. *RNA genetics* 1988. Boca Raton, Florida, CRC Press Inc.

Domingo E, Martínez-Salas E, Sobrino F, de la Torre J, Portela A, Ortin J, López-Galíndez C, Pérez-Breña P, Villanueva N, Nájera R, Vandepol S, Steinhauer D, DePolo N y Holland JJ. The quasispecies (extremely heterogeneous) nature of viral RNA genome populations: biological relevance, a review. *Gene* 1985; 40: 1-8.

Domingo E, Sabo D, Taniguchi T y Weissman C. Nucleotide sequence heterogeneity of an RNA phage population. *Cell* 1978; 13: 735-744.

Dougherty JP^a y Temin HM. Determination of the rate of base-pair substitution and insertion mutation in retrovirus replication. *J Virol* 1988; 62: 2817-2822.

Dougherty JP^b y Temin HM. High mutation rate of a spleen necrosis virus-based retrovirus vector. *Mol Cell Biol* 1988; 6: 4387-4395.

Du DL, Volpe DA, Grieshaber CK y Murphy MJ Jr. In vitro myelotoxicity of 2',3'-dideoxynucleosides on human hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol* 1990; 18: 832-836.

Duweke TJ, Pushkarskaya T, Poppe SM, Swaney SM, Zhao Q, Chen SY, Stevenson M y Tarpley WG. A mutation in reverse transcriptase of bis(heteroaryl)piperazine-resistant human immunodeficiency virus type 1 that confers increased sensitivity to other non-nucleoside inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 4713-4717.

Durbin RK y Stollar V. Sequence analysis of the E2 gene of a hyperglycosylated, host restricted mutant of Sindbis virus and estimation of mutation rate from frequency of revertants. *Virology* 1986; 154: 135-143.

Eigen M, McCaskill J y Schuster P. Molecular quasi-species. *J Phys Chem* 1988; 92: 6881-6891.

Eigen M. Self-organization of matter and the evolution of biological macromolecules. *Naturwissenschaften* 1971; 58: 465-523.

Eigen M^a y Briebricher CK. Role of genome variation in virus evolution. En: *RNA genetics*; vol III 1988. (Domingo E, Holland JJ y Ahlquist P, eds). Boca Raton, CRS Press.

Eigen M^b y Briebricher CK. Sequence space and quasispecies distribution. En: *RNA genetics*; vol III 1988. (Domingo E, Holland JJ y Ahlquist P eds). Boca Raton, CRS Press.

Emerman M, Vazeaux R y Peden K. The rev gene product of the human immunodeficiency virus affects envelope specific RNA localization. *Cell* 1989; 57:1155-1165.

Emimi EA, Graham DJ, Gotlib L, Condra JH, Byrnes VW y Schleif WA. HIV-1 and multidrug resistance. *Nature* 1993; 364:679.

Emini EA, Jameson BA, Lewis AJ, Larsen GR y Wimmer E. Poliovirus neutralization epitopes: analysis and localization with neutralizing monoclonal antibodies. *J Virol* 1982; 43: 997-1005.

Epstein LG, Kuiken C, Blumberg BM, Hartman S, Sharer LR, Clement M y Goudsmit J. HIV-1 V3 domain variation in brain and spleen of children with AIDS: tissue-specific evolution within host-determined quasispecies. *Virology* 1991; 180: 583-590.

Erice A, Mayers DL, Strike DHG, Sannerud KJ, McCutchan FE, Henry K y Balfour HJr. Brief report: primary infection with zidovudine-resistant human immunodeficiency virus type 1. *The Lancet* 1993; 328: 1163-1165.

Fauci AS. Multifactorial nature of human immunodeficiency virus disease: implications for therapy. *Science* 1993; 262: 1011-1018.

Feinberg MB, Jarrett RF, Aldovini A, Gallo R y Wong-Staal F. HTLV-III expression and production involve complex regulation at the levels of splicing and translation of viral RNA. *Cell* 1986; 46: 807-817.

Felber BK y Pavlakis GN. Molecular biology of HIV-1: positive and negative regulatory elements important for virus expression. *AIDS* 1993; 7 (suppl 1): S51-S62.

Felber BK, Hadzopoulou-Cladaras M, Cladaras C, Copeland T y Pavlakis GN. Rev protein of human immunodeficiency virus type 1 affects the stability and transport of the viral mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 1495-1499.

Feng S y Holland EC. HIV tat trans-activation requires the loop sequence within TAR. *Nature* 1988; 334: 165-168.

Fenyö EM, Morfeld-Manson L, Chiodi F, Lind B, von Gegerfelt A, Albert J, Olausson E y Asjö B. Distinct replicative and cytopathic characteristics of human immunodeficiency virus isolates. *J Virol* 1988; 62: 4414-4419.

Fields N, Knipe DM, Chanock RM, Hirsch MS, Melnick JL, Monath TP y Roizman B eds. *Virology* 2ª edición 1990. Raven Press, New York.

Fischl M, Richman D, Grieco M, Gottlieb M, Volderding P, Laskin O, Leedom J, Groopman J, Mildvan D, Schooley R, Jackson G, Durack D, King D y the AZT collaborative working group. The efficacy of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. *N Eng J Med* 1987; 317: 185-191.

Fisher AG, Ensoli B, Looney D, Rose A, Gallo RC, Saag MS, Shaw GM, Hahn BH y Wong-Staal F. Biologically diverse molecular variants within a single HIV-1 isolate. *Nature* 1988; 334: 444-447.

Fitzgibbon JE, Howell RM, Haberzettl CA, Sperber SJ, Gocke DJ y Dubin DT. Human immunodeficiency virus type 1 pol gene mutations which cause decreased susceptibility to 2',3'-dideoxycytidine. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 153-157.

Fitzgibbon JE, Howell RM, Schwartzer TA, Gocke DJ y Dubin DT. In vivo prevalence of azidothymidine (AZT) resistance mutations in an AIDS patient before and after AZT therapy. *AIDS Research and human retroviruses* 1991; 7: 265-269.

Freed EO, Myers DJ y Risser K. Mutational analysis of the cleavage sequence of human immunodeficiency virus type 1 env glycoprotein precursor gp160. *J Virol* 1989; 63: 4670-4675.

Fu TB y Taylor J. When retroviral reverse transcriptases reach the end of their RNA templates. *J Virol* 1992; 66: 4271-4278.

Gabuza DH, Lawrence K, Langhoff E, Terwilliger E, Dorfman T, Haseltine WA y Sodroski J. Role of vif in replication of human immunodeficiency virus type 1 in CD4+ T lymphocytes. *J Virol* 1992; 66: 6489-6495.

Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, Shearer GM, Kaplan M, Haynes BF, Palker TJ, Redfield R, Oleske J y Safai B. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* 1984; 224: 500-503.

Gallo RC, Sarin PS, Gelmann EP, Pobert-Guroff M, Richardson E, Kalyanaraman VS, Mann D, Sidhu GD, Stahl RE, Zolla-Pazner S, Leibowitch J y Popovic M. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983; 220: 865-867.

Gao Q, Gu Z, Parniak, Cameron J, Cammack N, Boucher C y Wainberg MA. The same mutation that encodes low-level human immunodeficiency virus type 1 resistance to 2',3'-dideoxyinosine and 2',3'-dideoxycytidine confers high-level resistance to the (-) enantiomer of 2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 1390-1392.

Gao Q, Gu Z, Parniak, Li X y Wainberg MA. In Vitro Selection of Variants of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Resistant to 3'-Azido-3'-Deoxythymidine and 2',3'-Dideoxyinosine. *J Virol* 1992; 66: 12-19.

Garret M, Romby P, Jieje R y cols. *Nucleic Acid Research*, 12: 2259-71.

Goldman ME, O'Brien JA, Ruffing TL, Nunberg JH, Schleif WA, Quintero JC, Siegl PK, Hoffman JM, Smith AM y Emini EA. L-696,229 Specifically Inhibits Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase and Possesses Antiviral Activity In Vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 1019-1023.

Goodenow M, Huet T, Saurin W, Kwok S, Sninsky J y Wain-Hobson S. HIV-1 isolates are rapidly evolving quasispecies: Evidence for viral mixtures and preferred nucleotide substitutions. *J Acquir Immune Defic Syndrome* 1989; 2: 344-352.

Groenink M, Fouchier RAM, de Goede REY, de Wolf F, Gruters RA, Cuypers HThM, Huisman HG y Tersmette M. Phenotypic heterogeneity in a panel of infectious molecular human immunodeficiency virus type 1 clones derived from a single individual. *J Virol* 1991; 65: 1968-1975.

Gu Z, Gao Q, Fang H, Salomon H, Parniak MA, Goldberg E, Cameron J y Wainberg MA. Identification of a mutation at codon 65 in the IKKK motif of reverse transcriptase that encodes human immunodeficiency virus resistance to 2',3'-dideoxycytidine and 2', 3'-dideoxy-3'-thiacytidine. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 275-281.

Gu Z, Gao Q, Li X, Parniak MA y Wainberg MA. Novel mutation in the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase gene that encodes cross-resistance to 2',3'-dideoxyinosine and 2',3'-dideoxycytidine. *J Virol* 1992; 66: 7128-7135.

Guy B, Rivière Y, Dott K, Regnault A y Kieny MP. Mutational analysis of the nef protein. *Virol* 1990; 176: 413-425.

Hahn BH, Gonda MA, Shaw GM, Popovic M, Hoxie JA, Gallo RC y Wong-Staal F. Genomic diversity of the acquired immune deficiency syndrome virus HTLV-III: Different viruses exhibit greatest divergence in their envelope genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 4813-4817.

Hahn BH, Shaw GM, Arya SK, Popovic M, Gallo RC y Wong-Staal F. Molecular cloning and characterization of the HTLV-III virus associated with AIDS. *Nature* 1984; 312: 166-169.

Hahn BH, Shaw GM, Taylor ME, Redfield RR, Markham PD, Salahuddin SZ, Wong-Staal F, Gallo RC, Parks ES y Parks WP. Genetic variation in HTLV-III/LAV over time in patients with AIDS or at risk for AIDS. *Science* 1986; 232: 1548-1553.

Hahn CS^a, Rice CM, Strauss EG, Lenches EM y Strauss JH. Sindbis virus ts 103 has a mutation in glycoprotein E2 that leads to defective assembly of virions. *J Virol* 1989; 63: 3459-3465.

Hahn CS^b, Strauss EG y Strauss JH. Mapping of RNA temperature-sensitive mutants of Sindbis virus: assignment of complementation groups A, B and G to nonstructural proteins. *J Virol* 1989; 63: 3142-3150.

Harada S, Koyanagi Y y Yamamoto N. *Science* 1985; 229: 563.

Heinzinger NK, Bukrinsky MI, Haggerty SA, Ragland AM, Kewalramani V, Lee MA, Gendelman HE, Ratner L, Stevenson M y Emerman M. The vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 7311-7315

Ho HT y Hitchcock MJ. Cellular pharmacology of 2',3'-dideoxy-2',3'-didehydrothymidine, a nucleoside analog active against human immunodeficiency virus. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33: 844-849.

Holland JJ, de la Torre JC y Steinhauer DA. RNA virus populations as quasispecies. *Curr Top Microbiol Immunol* 1992; 176: 1-20.

Holland JJ, de la Torre JC, Clarke DK y Duarte E. Quantitation of relative fitness and great adaptability of clonal populations of RNA viruses. *J Virol* 1991; 65: 2960-2967.

Holland JJ, de la Torre JC, Steinhauer DA, Clarke DK, Duarte E y Domingo E. *Virus mutation frequencies can be greatly underestimated by monoclonal antibody neutralization of virions.* *J Virol* 1989; 63: 5030-5036.

Hostomsky Z, Hostomska Z, Fu T-B y Taylor J. The reverse transcriptase of HIV-1: functionality of the subunits of the heterodimer in DNA synthesis. *J Virol* 1992; 66: 3179-3192.

Hovanessian AG. On the HIV nef-gene product. *Research in Virology* 1992; 143: 31-81.

Jacobo-Molina A y Arnold E. HIV reverse transcriptase structure-function relationships. *Biochemistry* 1991; 30: 6351-6361.

Jacobo-Molina A, Ding J, Nanni R, Clark AD, Lu X, Tantillo C, Williams RL, Kramer G, Ferris AL, Clark P, Hizi A, Hughes SH y Arnold E. Crystal structure of HIV-1 reverse transcriptase complexed with double-stranded DNA at 3.0 Å resolution shows bent DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 6320-6324.

Japour AJ, Chatis PA, Eigenrauch HA y Crumpacker CS. Detection of human immunodeficiency virus type 1 clinical isolates with reduced susceptibility to zidovudine and dideoxyinosine by RNA-RNA hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 3092-3096.

Ji J y Loeb LA. Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase copying RNA *in vitro*. *Biochemistry* 1992; 31: 954-958.

Johnson MS, McClure MA, Feng D-F, Gray J y Doolittle RF. Computer analysis of retroviral pol genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 7648-7652.

Johnson V, Saag M, Decker J, Sommadossi JP, Myers M, Cort S, Hall D, Griffin J, Lifson J y Shaw G. Viral resistance in adults treated with nevirapine (NVP) added to established nucleoside RT inhibitors regimens of ZDV+ddC, ZDV+ddI or ddI alone. Third international workshop on HIV Drug Resistance, 2-5 Agosto 1994, Kauai, Hawaii.

Johnston MI y Hoth DF. Present status and future prospects for HIV therapies. *Science* 1993; 260: 1286-1293.

Kahn JO, Lagakos SW, Richman DD, Cross A, Pettinelli C, Liou SH, Brown M, Volderbing PA, Crumpacker CS, Beall G y the NIAD Aids clinical trials group. A controlled trial comparing continued zidovudine with didanosine in HIV infection. *N Engl J Med* 1992; 327: 581-587.

Kaminchik J, Bashan N, Itach A, Sarver N, Gorecki M y Panet A. Genetic characterization of human immunodeficiency virus type 1 nef gene products translated *in vivo* and expressed in mammalian cells. *J Virol* 1991; 65: 583-588.

Kan NC, Franchini G, Wong-Staal F, Du Bois GC, Robey WG, Lastenberger JA y Papas TS. Identification of HTLV-III/LAV sor gene product and detection of antibodies in human sera. *Science* 1986; 231: 1553-1555.

Kaye S, Lovedale C, Comber E y Tedder RS. The acquisition mutations in serum HIV-1 RNA predicts their acquisition in PBMC proviral DNA. Third international workshop on HIV drug resistance, Kauai, Hawaii, Agosto 1994.

Kellam P, Boucher CAB y Larder BA. Fifth mutation in HIV-1 reverse transcriptase contributes to the development of high-level resistance to zidovudine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 1934-1938.

Kellam P, Boucher CAB, Tijnagel JM y Larder BA. Zidovudine treatment results in the selection of human immunodeficiency virus type 1 variants whose genotypes confer increasing levels of drug resistance. *J Gen Virol* 1994; 75: 341-351.

Klimkait T, Strebel K, Hoggan MD, Martin MA y Orenstein JM. The human immunodeficiency virus type 1-specific protein vpu is required for efficient virus maturation and release. *J Virol* 1990; 64: 621-629.

Kohlstaedt LA, Wang J, Friedman JM, Rice PA y Steitz TA. Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science* 1992; 256: 1783-1790.

Kohlstaedt LA, Wang J, Rice PA, Friedman JM y Steitz TA. The structure of HIV-1 reverse transcriptase. In: *Reverse transcriptase*. (Skalka AM y Goff SP, eds). Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1993.

Koot M, Vos AHV, Keet RPM, Goede de REY, Dercksen MW, Terpstra FG, Coutinho RA, Miedema F y Tersmette M. HIV-1 biological phenotype in long-term infected individuals evaluated with an MT-2 cocultivation assay. *AIDS* 1992; 6: 49-54.

Kozarsky K, Penman M, Basiripour L, Haseltine W, Sodroski J y Krieger M. Glycosylation and processing of the human immunodeficiency virus type 1 env proteins. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1989; 2: 163-169.

Kusumi K, Conway B, Cunningham S, Berson A, Evans C, Iversen AKN, Colvin D, Gallo MV, Coutre S, Shpaer EG, Faulkner DV, deRonde A, Volkman S, Williams C, Hirsch MS y Mullins JI. Human immunodeficiency virus type 1 envelope gene structure and diversity in vivo and after cocultivation in vitro. *J Virol* 1992; 66: 875-885.

Lacey SF^a y Larder BA. A novel mutation (V75T) in the HIV-1 reverse transcriptase confers resistance to 2',3'-dideoxy-2',3'-dideoxythymidine (D4T) in cell culture. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 1428-1432.

Lacey SF^b y Larder BA. Mutagenic study of codons 74 and 215 of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase, which are significant in nucleoside analog resistance. *J Virol* 1994; 68: 3421-3424.

Lambert JS, Seidlin M, Reichman RC, Planck CS, Laverty M, Morse GD, Knupp C, McLaren C, Pettinelli C, Valentine FT y Dolin R. 2',3'-dideoxyinosine (ddI) in patients with acquired immunodeficiency syndrome or AIDS-related complex. *N Engl J Med* 1990; 322, 1333-1340.

Larder BA, Chesebro B y Richman DD. Susceptibilities of zidovudine-susceptible and -resistant human immunodeficiency virus isolates to antiviral agents determined by using a quantitative plaque reduction assay. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34: 436-441.

Larder BA, Kellam P y Kemp SD. Convergent combination therapy can select viable multidrug-resistant HIV-1 in vitro. *Nature* 1993; 365: 451-453.

Larder BA, Purifoy DJM, Powell KL y Darby G. Site specific mutagenesis of AIDS virus reverse transcriptase. *Nature* 1987; 327: 716-717.

Larder BA. 3'-azido-3'-deoxythymidine resistance suppressed by a mutation conferring human immunodeficiency virus type 1 resistance to nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 2664-2669.

Larder BA. Interactions between drug resistance mutations in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *J Gen Virol* 1994; 75: 951-957.

Larder BA^a, Coates KE y Kemp SD. Zidovudine-resistant human immunodeficiency virus selected by passage in cell culture. *J Virol* 1991; 65: 5232-5236.

Larder BA^a, Darby G y Richman DD. HIV with reduced sensitivity to zidovudine (AZT) isolated during prolonged therapy. *Science* 1989; 243: 1731-1734.

Larder BA^b and Kemp SD. Multiple Mutations in HIV-1 Reverse Transcriptase Confer High-Level Resistance to Zidovudine (AZT). *Science* 1989; 246: 1155-1158.

Larder BA^b, Kellam P y Kemp S. Zidovudine-resistance predicted by direct detection of mutations in DNA from human immunodeficiency virus type 1 infected lymphocytes. *AIDS* 1991; 5: 137-144.

Larder BA^c, Kemp SD y Purifoy DJM. Infectious potential of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase mutants with altered inhibitor sensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 4803-4807.

Laurent AG, Hovanessian AG, Rivière Y, Krust B, Regnault A, Montaigner L, Findeli A, Kieny MP y Guy B. Production of a non-functional nef protein in human immunodeficiency virus type 1-infected CEM cells. *J Gen Virol* 1990; 71: 2273-2281.

LeGrice SFJ, Naas T, Wohlgensinger B y Schatz O. Subunit-selective mutagenesis indicates minimal polymerase activity in heterodimer-associated p51 HIV-1 reverse transcriptase. *EMBO J* 1991; 10: 3905-3911.

Leider JM, Palese P y Smith FL. Determination of the mutation rate of a retrovirus. *J Virol* 1988; 62: 3084-3091.

Levy JA, Hoffman AD, Kramer SM, Landis JA, Shimabukuro JM y Oshiro LS. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science* 1984; 255: 840-842.

Levy JA. Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Microb Reviews* 1993; 57: 183-289.

Li W-H, Tanimura M y Sharp PM. Rates and dates of divergence between AIDS virus nucleotide sequences. *Mol Biol Evol* 1988; 5: 313-330.

Lighfoote MM, Coligan JE, Folks TM, Fauci AS, Martin MA y Venkatesan S. Structural characterization of reverse transcriptase and endonuclease polypeptides of the acquired immunodeficiency syndrome virus. *J Virol* 1986; 60: 771-775.

Lisignoli G, Facchini A, Cattini L, Monaco MCG, Degrassi A y Mariani E. In vitro toxicity of 2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine (BCH189/3TC), a new synthetic anti-HIV-1 nucleoside. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy* 1992; 3: 299-303.

López-Galíndez C, López JA, Melero JA, de la Fuente L, Martínez C, Ortín J y Perucho M. Analysis of genetic variability and mapping of point mutations in influenza virus by the RNase A mismatch cleavage method. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 3522-3526.

López-Galíndez C, Rojas JM, Nájera R, Richman DD y Perucho M. Characterization of genetic variation and 3'-azido-3'-deoxythymidine-resistance mutations of human immunodeficiency virus by the RNase A mismatch cleavage method. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 4280-4284.

Louwagie J, McCutchan F, Peeters M, Brennan TP, Sanders-Buell E, Eddy GA, van der Groen G, Fransen K, Gersy-Damet G-M, Deleys R y Burke DS. Phylogenetic analysis of gag genes from 70 international HIV-1 isolates provides evidence for multiple genotypes. *AIDS* 1993; 7: 769-780.

Malim MH, Tiley LS, McCarn DF, Rusche JR, Hauber J y Cullen BR. HIV-1 structural gene expression requires binding of the rev-transactivator to its RNA target sequence. *Cell* 1990; 60: 675-683.

Malim MH^a, Böhnlein S, Hauber J y Cullen BR. Functional dissection of the HIV-1 rev transactivator: derivation of a trans-dominant repressor of rev function. *Cell* 1989; 58: 205-214.

Malim MH^b, Böhnlein S, Fenrick R, Le S-Y, Maizel JV y Cullen BR. Functional comparison of the rev trans-activator: derivation of a trans-dominant repressor of rev function. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 8222-8226.

Martin JL, Wilson JE, Haynes RL y Furman PA. Mechanism of resistance of human immunodeficiency virus type 1 to 2',3'-dideoxyinosine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 6135-6139.

Martínez MA, Carrillo C, González-Candelas F, Moya A, Domingo E y Sobrino F. Fitness alteration of foot-and-mouth disease virus mutants: measurements of adaptability of viral quasispecies. *J Virol* 1991; 65: 3954-3957.

Mayers DL, Japour AJ, Arduino J-M, Hammer SM, Reichman R, Wagner KF, Chung R, Lane J, Crumpacker CS, McLeod GX, Beckett LA, Roberts CR, Winslow D, Burke D y the RV43 Study Group. Dideoxynucleoside resistance emerges with prolonged zidovudine monotherapy. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 307-314.

McNearby T, Hornickova Z, Markham R, Birdwell A, Arens M, Saah A y Ratner L. Relationship of human immunodeficiency virus type 1 sequence heterogeneity to stage of disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 10247-10251.

Mellors JW, Dutschman GE, Im GJ, Tramontano E, Winkler SR y Cheng YC. In vitro selection and molecular characterization of human immunodeficiency virus type 1 resistant to non-nucleoside inhibitors of reverse transcriptase. *Mol Pharm* 1992; 41: 446-451.

Mellors JW, Im GJ, Tramontano E, Winkler SR, Medina DJ, Dutschman GE, Bazmi HZ, Piras G, González CJ y Cheng Y-C. A single conservative amino acid substitution in the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1 confers resistance to (+)-(5S)-4,5,6,7-tetrahydro-5-methyl-6-(3-methyl-2-butenyl)imidazo[4,5,1-jk,11,4]benzodiazepin-2(1H)-thione (TIBO 82150). *Molec Pharmacol* 1993; 43: 11-16.

Meltzer MS, Skillman DR, Hoover DL, Hanson BD, Turpin JA, Kalter DC y Gendelman HE. HIV and the immune system: Macrophages and the human immunodeficiency virus. *Immunol. Today* 1990; 11: 217-223.

Merigan TC y Skowron G. Safety and tolerance of dideoxycytidine as a single agent. Results of early-phase studies in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) or advanced AIDS-related complex. Study group of the AIDS clinical trials group of the national institute of allergy and infectious diseases. *Am J Med* 1990; 88: 11S-15S.

Merluzzi VJ, Hargrave KD, Labadia M, Grozinger K, Skoog M, Wu JC, Shih C-K, Eckner K, Hattox S, Adams J, Rosenthal AS, Faanes R, Eckner RJ, Koup RA y Sullivan JL. Inhibition of HIV-1 replication by a nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor. *Science* 1990; 250: 1411-1413.

Meyerhans A, Cheyner R, Albert J, Seth M, Kwok S, Sninsky J, Morfeldt-Månson, Asjö B y Wain-Hobson S. Temporal fluctuations in HIV quasispecies in vivo are not reflected by sequential HIV isolations. *Cell* 1989; 58: 901-910.

Meyrhans A, Vartanian JP, Hultgren C, Plikat U, Karlsson A, Wang L, Eriksson S y Wain-Hobson S. Restriction and enhancement of human immunodeficiency virus type 1 replication by modulation of intracellular deoxynucleoside triphosphate pools. *J Virol* 1994; 68: 535-540.

Minor PD, Ferguson M, Evans DMA, Almond JW y Icenogle JP. Antigenic structure of polioviruses 1, 2 and 3. *J Gen Virol* 1986; 67: 1283-1291.

Minor PD, Schild GC, Bootman J, Evans DM, Ferguson M, Reeve P, Spitz M, Stanway G, Cann AJ, Hauptmann R, Clarke LD, Mountford RC y Almond JW. Location and primary structure of a major antigenic site for poliovirus neutralization. *Nature* 1983; 301: 674-679.

Mitsuya H y Broder S. Inhibition of the *in vitro* infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus (HTLV-III/LAV) by 2',3'-dideoxynucleosides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 1911-1915.

Mitsuya H y Broder S. Strategies for antiviral therapy in AIDS. *Nature* 1987; 325: 773-778.

Mitsuya H, Yarchoan R, Kageyama S y Broder S. Targeted therapy of human immunodeficiency virus-related disease. *The FASEB J* 1991; 5: 2369-2381.

Mitsuya H, Weinhold KJ, Furman PA, St Clair MH, Lehrman SN, Gallo RC, Bolognesi D, Barry DW y Broder S. 3'-azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 7096-7100.

Miyasaka T, Tanaka H, Baba M, Hayakawa H, Walker RT, Balzarini J y De Clercq E. A novel lead for specific anti-human immunodeficiency virus type 1 agents: 1-[(2-hydroxyethoxy) methyl]-6-(phenylthio) thymine. *J Med Chem* 1989; 32: 2507-2509.

Modrow S, Hahn BH, Shaw GM, Gallo RC, Wong-Staal F y Wolf H. Computer assisted analysis of envelope protein sequences of seven human immunodeficiency virus isolates: Prediction of antigenic epitopes in conserved and variable regions. *J Virol* 1987; 61: 570-578.

Mohri H, Singh MK, Ching WTW y Ho DD. Quantitation of zidovudine-resistant human immunodeficiency virus type 1 in the blood of treated and untreated patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 25-29.

Molina JM y Groopman JE. Bone marrow toxicity of dideoxyinosine. *N Engl J Med* 1989; 321: 1478.

Monk RJ, Malik FG, Stokesberry D y Evans LH. Direct determination of the point mutation rate of a murine retrovirus. *J Virol* 1992; 66: 3683-3689.

Montaigner L y Clavel F. *Human immunodeficiency viruses*. En: *Encyclopedia of virology*, (Webster R y Granoff A, eds). Academic Press, San Diego, 1994.

Montaigner L, Chermann JC, Barre-Sinoussi F, Chamaret S, Gruest J, Nugeyre MT, Rey F, Dauguet C, Axler-Blin C, Venize-Brun F, Rouzioux C, Saimot AG, Rozemaum W, Gluckman JC, Klatzmann D, Vilmer E, Griselli C, Gazengel C y Brunet JB. A new human T-lymphotropic retrovirus: characterization and possible role in lymphadenopathy and acquired immune deficiency syndromes. En: *Human T-cell leukemia/lymphoma virus 1984*. (Gallo RC, Essex ME y Gross L eds). Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory.

Muckenthaler M, Gunkel N, Levantis P, Broadhurst K, Goh B, Colvin B, Foster G, Jackson GG y Oxford JS. Sequence analysis of an HIV-1 isolate which displays unusually high-levels of AZT-resistance in vitro. *J Med Virol* 1992; 36: 79-83.

Myers GM, Korber JA, Berzofsky RF, Smith RF y Pavlakis GN. A compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences. *Human retroviruses and AIDS 1993*. Theoretical biology and biophysics group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, New Mexico.

Myers RM, Larin Z y Maniatis T. *Science* 1985; 230: 1242-1246.

Nájera I^a, Richman DD, Olivares I, Rojas JM, Peinado MA, Perucho M, Nájera R y López-Galíndez C. Natural occurrence of drug resistance mutations in the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1 isolates. *AIDS Research Human Retrovirus* 1994 (en prensa).

Nájera I^b, Holguín A, Quiñones-Mateu ME, Muñoz-Fernández MA, Nájera R, López-Galíndez C y Domingo E. The pol gene quasispecies of human immunodeficiency virus. Mutations associated with drug resistance in virus from patients undergoing no drug therapy. (enviado a publicación).

Nájera R y González La Hoz J. Terapia específica sobre VIH-1. Reuniones de consenso sobre la infección por VIH. Sociedad española interdisciplinaria del SIDA, A.D.S. printing, SA, Madrid, 1994.

Nunberg JH, Schleif WA, Boots EJ, O'Brien JA, Quintero JC, Hoffman JM Jr, Emini EA y Goldman ME. Viral resistance to human immunodeficiency virus type 1-specific pyridinone reverse transcriptase inhibitors. *J Virol* 1991; 65: 4887-4892.

Ogawa K, Shibata R, Kiyomasu T, Higuchi Y, Kishida Y, Ishimoto A y Adachi A. Mutational analysis of the human immunodeficiency virus vpr open reading frame. *Virology* 1989; 63: 4110-4114.

Owen J y Palukaitis P. Characterization of cucumber mosaic virus. I Molecular heterogeneity mapping of RNA 3 in eight CMV strains. *Virology* 1988; 166: 495-502.

Pang S, Vinters HV, Akashi T, O'Brien WA y Chen ISY. HIV-1 env sequence variation in brain tissue of patients with AIDS-related neurologic disease. *J Acquir Immune Defic Syndrome* 1991; 4: 1082-1092.

Parvin JD, Moscona A, Pan WT, Leider JM y Palese P. Measurement of the mutation rates of animal viruses: influenza A virus and poliovirus type 1. *J Virol* 1986; 59: 377-383.

Patel y Preston. Marked infidelity of HIV reverse transcriptase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994.

Pathak V^a y Temin HM. Broad spectrum of in vivo forward mutations, hypermutations and mutational hotspots in a retroviral shuttle vector after a single replication cycle: substitutions, frameshifts and hypermutations. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 6019-6023.

Pathak V^b y Temin HM. Broad spectrum of in vivo forward mutations, hypermutations and mutational hotspots in a retroviral shuttle vector after a single replication cycle: deletions and deletions with insertions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 6024-6028.

Pauwels R, Andries K, Debyser Z, Kukla MJ, Schols D, Breslin HJ, Wostenborghs R y cols. 1992.

Pauwels R, Andries K, Desmyter J, Schols D, Kukla MJ, Breslin HJ, Raeymaeckers A, Van Gelder J, Wostenborghs R, Heykants J, Schellekens K, Janssen MAC, De Clercq E y Janssen PAJ. Potent and selective inhibition of HIV-1 replication *in vitro* by a novel series of TIBO derivatives. *Nature* 1990; 343: 470-474.

Peinado MA, Fernández-Renart M, Capella G, Wilson L y Perucho M. Mutations in the p53 supressor gene do not correlate with c-k-ras mutations in colorectal cancer. *Int J Oncology* 1993; 2: 123.

Piatak MJr^a, Luk K-C, Saag MS, Kappes JC, Yang LC, Lifson JD, Clark SJ, Hahn BH y Shaw GM. Viral dynamics in primary HIV-1 infection. *Lancet* 1993; 341: 1099.

Piatak MJr^b, Saag MS, Yang LC, Clark SJ, Kappes JC, Luk KC, Hahn BH, Shaw GM y Lifson JD. High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science* 1993; 259: 1749-1754.

Prasad VR, Lowy I, de los Santos T, Chiang L y Goff SP. Isolation and characterization of a dideoxyguanosine triphosphate-resistant mutant of human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 11363-11367.

Ratner L, Haseltine W, Patarca R, Livak KJ, Starcich B, Josephs SF, Doran ER, Rafalski JA, Whichorn EA, Baumeister K, Ivanoff L, Petteway SR, Pearson ML, Lautenberger JA, Papas TS, Chrayeb J, Chang NT, Gallo RC y Wong-Staal F. Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III. *Nature* 1985; 313: 277-284.

Rhim H, Park J y Morrow CD. Deletions in the tRNA^{Lys} primer-binding site of human immunodeficiency virus type 1 identify essential regions for reverse transcriptase. *J Virol* 1991; 65: 4555-4564.

Richman DD, Havlir D, Corbeil J, Looney D, Ignacio C, Spector SA, Sullivan J, Cheeseman S, Barringer K, Pauletti D, Shih C-K, Myers M y Griffin J. Nevirapine resistance mutations of human immunodeficiency virus type 1 selected during therapy. *J Virol* 1994; 68: 1660-1666.

Richman DD. Resistance of clinical isolates of human immunodeficiency virus to antiretroviral agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 1207-1213.

Richman DD^a, Grimes JM y Lagakos SW. Effect of stage of disease and drug dose on zidovudine susceptibilities of isolates of human immunodeficiency virus. *J Acquir Immune Defic Syndrome* 1990; 3: 743-746.

Richman DD^a, Guatelli JC, Grimes J, Tsiatis A y Gingeras TR. Detection of mutations associated with zidovudine resistance in human immunodeficiency virus utilizing the polimerase chain reaction. *J Infect Dis* 1991; 164: 1075-1081.

Richman DD^b, Rosenthal AS, Skoog M, Eckner RJ, Chou TC, Sabo JP y Merluzzi VJ. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 305.

Richman DD^b. Selection of zidovudine-resistant variants of human immunodeficiency virus by therapy. *Current topics in Microbiology and Immunology* 1990; 176: 130-142.

Richman DD^c, Shih C, Lowry I, Rose J, Prodanovich P, Goff S and Griffin J. Human immunodeficiency virus type 1 mutants resistant to nonnucleoside inhibitors of reverse transcriptase arise in tissue culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 11241-11245.

Richman DD^c. Protocol development. Propagation of AZT-resistant clinical isolates. Courier No. 90-03. November 1990.

Rojas JM, Dopazo J, Martín-Blanco E, López-Galíndez C y Tabarés E. Analysis of genetic variability of populations of herpes simplex virus. *Virus Research* 1993; 28: 249-261.

Rojas JM, Dopazo J, Nájera I, Sánchez-Palomino S, Olivares I, Martín MJ, Bernal A, García Sáiz A, Nájera R y López-Galíndez C. Molecular epidemiology of HIV-1 in Madrid. *Virus Research* 1994; 31: 331-342.

Romero DL, Busso M, Tan CK, Reusser F, Palmer JR, Poppe SM, Aristoff PA, Downey M, So AG, Resnick L y Tarpley WG. Nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors that potently and specifically block human immunodeficiency virus type 1 replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 8806-8810.

Rosen CA, Sodroski JG y Haseltine WA. The localization of cis-acting regulatory sequences in the human T cell lymphotropic virus type III (HTLV-III/LAV) long terminal repeat. *Cell* 1985; 41: 813-823.

Roy S, Delling U, Chen C-H, Rosen CA y Sonenberg N. A bulge structure in HIV-1 TAR RNA is required for tat binding and tat-mediated trans-activation. *Genes Dev* 1990; 4: 1365-1373.

Rübsamen-Waigmann H, Schröder B, Biesert L, Bauermeister CD, von Briesen H, Suhartono H, Zimmermann F, Brede HD, Regeniter A, Gerte HD, Helm EB, Staszewski S, Knechten H y Dietrich U. Markers for HIV-disease progression in untreated patients and patients receiving AZT: evaluation of viral activity, AZT resistance, serum cholesterol, β 2-microglobuline, CD4+ cell counts and HIV antigen. *Infection* 1991; 19 (suppl. 2): S77-S82.

Saag MS, Emini E, Laskin OL, Douglas J, Lapidus WI, Schleif WA, Whitley RJ, Hildrebrand C, Byrnes W, Kappes JC y the L-697,661 working group. A short term clinical evaluation of L-697,661, a non-nucleoside inhibitor of HIV-1 reverse transcriptase. *N Engl J Med* 1993; 329: 1065-1072.

Saag MS, Hahn BH, Gibbons J, Li Y, Parks WP y Shaw GM. Extensive variation of human immunodeficiency virus type 1 in vivo. *Nature* 1988; 334: 440-444.

Sala M, Zambruno G, Vartanian JP, Marconi A, Bertazzoni U y Wain-Hobson S. Spatial discontinuities in human immunodeficiency virus type 1 quasispecies derived from epidermal langerhans cells of a patient with AIDS and evidence for double infection. *J Virol* 1994; 68: 5280-5283.

Salfeld J, Gottlinger HG, Sia RA, Park RE, Sodroski J y Haseltine WA. A tripartite HIV-1 tat-env-rev fusion protein. *EMBO J* 1990; 9: 965-970.

Sambrook J, Fritsch EF y Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual* 1989, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Sánchez-Palomino, Rojas JM, Martínez MA, Fenjö EM, Nájera R, Domingo E y López-Galíndez C. Dilute passage promotes expression of genetic and phenotypic variants of human immunodeficiency virus type 1 in cell culture. *J Virol* 1993; 67: 2938-2943.

Schinazi RF^a, Larder BA y Mellors J. Mutations in the HIV-1 reverse transcriptase and protease associated with drug resistance. *International antiviral news* 1994; 2: 72-75.

Schinazi RF^b, Lloyd RMJr, Ramanathan CS y Taylor EW. Antiviral drug-resistance mutations in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase occur in specific RNA structural regions. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 268-274.

Schuitemaker H, Kootstra NA, de Goede REY, de Wolf, Miedema F y Tersmette M. Monocytotropic human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) variants detectable in all stages of HIV-1 infection lack T-cell line tropism and syncytium-inducing ability in primary T-cell culture. *J Virol* 1991; 65: 356-363.

Sedivy JM, Capone JP, Raj Bhandary UL y Sharp PA. An inducible mammalian amber suppressor: propagation of a poliovirus mutant. *Cell* 1987; 50: 379-389.

Shaw GM, Hahn BH, Arya SK, Groopman JE, Gallo RC y Wong-Staal F. Molecular characterization of human T-cell leukemia (lymphotropic) virus type III in the acquired immune deficiency syndrome. *Science* 1984; 226: 1165-1171.

Shaw GM, Harper ME, Hahn BH, Epstein LG, Gajdusek DC, Price RW, Navia BA, Petit CK, O'Hara CJ, Groopman JE, Oleske JM, Wong-Staal F y Gallo RC. HTLV-III infection in brains of children and adults with AIDS encephalopathy. *Science* 1985; 227: 177-182.

Shaw GM, Wei X, Johnson V, Taylor M, Decker J, Kilby M, Lifson J, Hahn B y Saag M. Nucleotide sequence analysis of HIV-1 RNA and DNA from plasma and PBMCs of patients treated with ZDV, ddI, and nevirapine: rapid HIV-1 turnover and resistance development in vivo. Third International workshop on HIV drug resistance. Kauai, Hawaii 1994.

Sherry B, Mosser AG, Colonno RJ y Rueckert RR. Use of monoclonal antibodies to identify four neutralization immunogenes on a common cold picornavirus, human rhinovirus 14. *J Virol* 1986; 57: 246-257.

Simmonds P, Zhang LQ, McOmish F, Balfe P, Ludlam CA y Leigh-Brown AJ. Discontinuous sequence change of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 env sequences in plasma viral and lymphocyte-associated proviral populations in vivo: implications for models of HIV pathogenesis. *J Virol* 1991; 65: 6266-6276.

Skalka AM y Goff SP. *Reverse Transcriptase* 1993. Cold Spring Harbor, New York. Cold Spring Harbor Laboratory.

Smith MS, Koerber KL y Pagano JS. Zidovudine-resistant human immunodeficiency virus type 1 genomes detected in plasma distinct from viral genomes in peripheral blood mononuclear cells. *J Infect Dis* 1993; 167: 445-448.

Sodroski J, Goh WC, Rosen C, Dayton A, Terwilliger E y Haseltine WA. A second post-transcriptional trans-activator gene required for HTLV-III replication. *Nature* 1986; 321: 412-417.

Sodroski J, Patarca R, Rosen C, Wong-Staal F y Haseltine W. Location of the transactivating region of the genome of human T-cell lymphotropic virus type III. *Science* 1985; 229: 74-77.

Sonigo P, Alizon M, Staskus K, Klatzman D, Cole S y cols. 1985. *Cell*; 42: 369-382.

Spearman-Karber . *Arch der experimentellen pathologie und pharmakologie* 1931; 162: 480-483.

St Clair MH, Hartigan PM, Andrews JC, Vavro CL, Simberkoff MS, Hamilton JD y the VA Cooperative Study Group. Zidovudine resistance, syncytium-inducing phenotype, and HIV disease progression in a case-control study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1993; 6: 891-897.

St. Clair MH, Martin JL, Tudor-Williams G, Bach MC, Vavro CL, King DM, Kellam P, Kemp SD y Larder BA. Resistance to ddI and sensitivity to AZT induced by a mutation in HIV-1 reverse transcriptase. *Science* 1991; 253: 1557-1559.

Stec DS, Waddwill A, Schmaljon CS, Cole GA y Schmaljon AL. Antibody-selected variation and reversion in Sindbis virus neutralization epitopes. *J Virol* 1986; 57: 715-720.

Steinhauer DA y Holland JJ. Direct method for quantification of extreme polymerase error frequencies at selected single base sites in viral RNA. *J Virol* 1986; 57: 219-228.

Steinhauer DA, de la Torre JC y Holland JJ. High nucleotide substitution error frequencies in clonal pools of vesicular stomatitis virus. *J Virol* 1989; 63: 2063-2071.

Strebel K, Daugherty D, Clouse K, Cohen D, Folks T y Martin MA. The HIV "A" (sor) gene product is essential for virus infectivity. *Nature* 1987; 328: 728-730.

Strebel K, Klimkait T y Martin MA. A novel gene of HIV-1, *vpu*, and its 16-Kilodalton product. *Science* 1988; 241: 1220-1223.

Takeuchi Y, Akutsu M, Murayama K, Shimizu N y Hoshino H. Host range mutant of human immunodeficiency virus type 1: modification of cell tropism by a single point mutation at the neutralization epitope in the *env* gen. *J Virol* 1991; 65: 1710-1718.

Telenitsky A y Goff SP. Strong-stop strand transfer during reverse transcription. In: *Reverse transcriptase 1993*. (Skalka AM y Goff SP, eds). Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Temin HM y Mizutani S. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* 1970; 226: 1211-1213.

Temin HM. Origin and general nature of retroviruses. En: *The Retroviridae 1992*. (Levy J, ed). Plenum Press, New York & London.

Temin MH. Is HIV unique or merely different?. *J Acquir Immune Defic Syndrome* 1989; 2: 1-9.

Temin MH. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993.

Tersmette M y Miedema F. Interactions between HIV and the host immune system in the pathogenesis of AIDS. *AIDS* 1990; 4 (suppl 1): S57-S66.

Tersmette M, Goede de REY, Al BJM, Winkel IN, Coutinho RA, Cuypers HThM, Hisman JG y Miedema F. Differential syncytium-inducing capacity of HIV isolates: Frequent detection of syncytium-inducing isolates in patients with AIDS and ARC. *J Virol* 1988; 62: 2026-2032.

Tersmette M, Gruters RA, de Wolf F, Goede de REY, Lange JMA, Schellekens PTA, Goudsmit J, Huisman JG y Miedema F. Evidence for a role of virulent human immunodeficiency virus (HIV) variants in the pathogenesis of acquired immunodeficiency syndrome: studies on sequential HIV isolates. *J Virol* 1989; 63: 2118-2125.

Tersmette M, Lange JMA, Goede de REY, de Wolf F, JKM Schattenkerk, Schellekens PTA, Coutinho RA, Huisman JG, Goudsmit J y Miedema F. Differences in risk for AIDS and AIDS mortality associated with biological properties of HIV variants. *Lancet* 1989 i: 983-985.

Terwilliger EF, Cohen EA, Lu YC, Sodroski JG y Haseltine WA. Functional role of human immunodeficiency virus type 1 vpu. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 5163-5167.

Tisdale M, Kemp SD, Parry NR y Larder BA. Rapid *in vitro* selection of human immunodeficiency virus type 1 resistant to 3'-thiacytidine inhibitors due to a mutation in the YMDD region of reverse transcriptase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 5653-5656.

Trainin N. Prospect of AIDS therapy by thymic humoral factor, a thymic hormone. *Natl Immun Cell Growth Regul* 1990; 9: 155-159.

Tramontano E y Cheng YC. HIV-1 reverse transcriptase inhibition by a dipyrindodiazepinone derivative. *Biochem Pharmacol* 1992; 43: 1371-1376.

Tudor-Williams G. Development of *in vitro* resistance to zidovudine is likely to be clinically significant. *Reviews in Medical Virol* 1992; 2: 123-129.

Vaishnav YN y Wong-Staal F. Biochemistry of AIDS. *Annu Rev Biochem* 1991; 60: 577-630.

Vandamme AM, Debyser Z, Pauwels R y cols. Rapid emergence of HIV-1 resistance to R82193 in only a minority of treated patients. Second International HIV-1 Drug Resistance Workshop, 1993, Noordwijk, The Netherlands.

Varela-Echavarría A, Garvey N, Preston BD y Dougherty JP. Comparison of Moloney murine leukemia virus mutation rate with the fidelity of its reverse transcriptase *in vitro*. *J Biol Chem* 1992; 267: 24681-24688.

Vartanian JP, Meyerhans A, Asjö B y Wain-Hobson S. Selection, recombination and G→A hypermutation of human immunodeficiency virus type 1 genomes. *J Virol* 1991; 65: 1779-1788.

Vartanian JP, Meyerhans A, Henry M y Wain-Hobson S. High-resolution structure of an HIV-1 quasispecies: identification of novel coding sequences. *AIDS* 1992; 6: 1095-1098.

Vartanian JP, Meyerhans A, Sala M y Wain-Hobson S. G→A hypermutation of the HIV-1 genome: evidence for dCTP pool imbalance during reverse transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 3092-3098.

Vasudevachari MB, Battista C, Lane HC, Psallidopoulos MC, Zhao B, Cook J, Palmer JR, Romero DL, Tarpley WG y Salzman NP. Prevention of the spread of HIV-1 infection with nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Virology* 1992; 190: 269-277.

Volberding PA, Lagakos SW, Koch MA, Pettinelli C, Myers MW, Booth DK, Balfour DH, Reichman RC, Bartlett JA, Hirsch MS, Murphy RL, Hardy WD, Soiero R, Fischl MA, Bartlett TC, Merigan TC, Hyslop NE, Richman DD, Valentine FT, Corey L y AIDS clinical trials group of the National Institute of Allergy and Infectious Diseases. Zidovudine in asymptomatic human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 1990; 322: 941-949.

Volberding PA. Strategies for antiretroviral therapy in adult HIV disease. En: *Textbook of AIDS medicine* 1994. (Broder S, Merigan TC y Bolognesi D eds). Williams & Wilkins, USA.

von Gegerfelt A, Albert J, Morfeldt-Manson L y cols. Isolate-specific neutralizing antibodies in patients with progressive HIV-1 related disease. *Virology* 1991; 185: 162-168.

von Schwedler U, Kornbluth RS y Trono D. The nuclear localization signal of the matrix protein of human immunodeficiency virus type 1 allows the establishment of infection in macrophages and quiescent T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 6992-6996.

von Schwedler U, Song J, Aiken C y Trono D. vif is crucial for human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA synthesis in infected cells. *J Virol* 1993; 67: 4945-4955.

Wahlberg J, Albert A, Lundeberg J, von Gegerfelt A, Broliden K, Utter G, Fenjo EM y Uhlen M. Analysis of the V3 loop in neutralization-resistant human immunodeficiency virus type 1 variants by solid-phase DNA sequencing. *AIDS Research Human Retroviruses* 1991; 7: 983-990.

Wain-Hobson S, Vartanian JP, Henry M, Chenciner N, Cheynier R, Delassus S, Martins LP, Sala M, Nugeyre MT, Guetard D, Klatzman D, Gluckman JC, Rozenbaum W, Barré-Sinoussi F y Montagnier L. LAV revisited: origins of the early HIV-1 isolates from Institute Pasteur. *Science* 1991; 252: 961-965.

Wain-Hobson S. Is antigenic variation of HIV important for AIDS and what might be expected in the future?. En: *The evolutionary biology of viruses* 1994. (Morse SS, ed). Raven Press.

Wain-Hobson S. Viral burden in AIDS. *Nature* 1993; 366: 22.

Ward CD y Flanagan JB. Determination of the poliovirus RNA polymerase error frequency at eight sites in the viral genome. *J Virol* 1992; 66: 3784-3793.

Weiss CD, Levy JA y White JM. Oligomeric organization of gp120 on infectious human immunodeficiency virus type 1 particles. *J Virol* 1990; 64: 5674-5677.

Weiss R, Teich N, Varmus H, Coffin J. *RNA tumor viruses* 1985, 2nd edition. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory.

Westendorp MO, Weber ML, Frank RW y Krammer PH. Human immunodeficiency virus type 1 tat upregulates interleukin-2 secretion in activated T cells. *J Virol* 1994; 68: 4177-4185.

White BT y McGeoch. Isolation and characterization of conditional lethal amber nonsense mutants of vesicular stomatitis virus. *J Gen Virol* 1987; 68: 3033-3044.

Willey R, Theodore TS y Martin MA. Amino acid substitutions in the human immunodeficiency virus type 1 gp120 V3 loop that change viral tropism also alter physical and functional properties of the virion envelope. *J Virol* 1994; 68: 4409-4419.

Winter E, Yamamoto F, Almoguera C y Perucho M. Detection of high incidence of K-ras oncogenes during human colon tumorigenesis. *Nature* 1985; 327: 298-303.

Wolfs TFW, de Jong JJ, van der Berg H, Tijnagel JMGH, Krone WJA y Goudsmit J. Evolution of sequences encoding the principal neutralization epitope of human immunodeficiency virus 1 is host dependent, rapid and continuous. *J Virol* 1990; 87: 9938-9942.

Wondrak EM, Lower J y Kurth R. Functional purification and enzymatic characterization of the RNA-dependent DNA polymerase of human immunodeficiency virus. *J Gen Virol* 1986; 67: 2791-2797.

Wong JK, Fitch NJS, Torriani F, Hadvlir D y Richman DD. Discordance of RT sequences conferring ZDV resistance in proviral DNA from brain and spleen. Third international workshop on HIV drug resistance August 1994, Kauai, Hawaii.

Wu JC, Warren TC, Adams J, Proudfoot J Skiles J, Raghavan P, Perry C, Potocki I, Farina PR y Grob PM. A novel dipyridodiazepinone inhibitor of HIV-1 reverse transcriptase acts through a nonsubstrate binding site. *Biochemistry* 1991; 30: 2022-2026.

Yarchoan R, 1988.

Yarchoan R, Mitsuya H, Myers C y Broder S. Clinical pharmacology of 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine (Zidovudine) and related dideoxynucleosides. *The N Engl J Med* 1989; 321: 726-738.

Yarchoan R, Pluda JM, Perno CF, Mitsuya H, Thomas RV, Wyvill KM y Broder S. Initial clinical experience with dideoxynucleosides as single agents and in combination therapy. *Ann NY Acad Sci* 1990; 616: 328-343.

Yu X, Xin Y, Matsuda Z, Lee TH y Essex M. The matrix protein of human immunodeficiency virus type 1 is required for incorporation of viral envelope protein into mature virions. *J Virol* 1992; 66: 4966-4971.

Zhang D, Caliendo AM, Eron JJ, De Vore KM, Kaplan JC, Hirsch MS y D'Aquila RT. Resistance to 2',3'-dideoxycytidine conferred by a mutation in codon 65 of the HIV-1 reverse transcriptase. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 282-287.