

Desarrollo de Herramientas Moleculares e Informáticas para la Identificación de Mutaciones Asociadas a Farmacorresistencia en el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIV-1).

Título corto: Genómica de farmacorresistencia en HIV.

Pedro G. Hernández-Sánchez¹, Daniel E. Noyola-Cherpitel², Othir G. Galicia-Cruz³ J. Flavio Martínez-Morales³, Christian A. García-Sepúlveda¹

1- Laboratorio de Genómica Viral y Humana, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. San Luis Potosí, México.

2- Laboratorio de Virología, Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. San Luis Potosí, México.

3- Laboratorio y Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. San Luis Potosí, México.

Dirigir correspondencia a: Pedro G. Hernández-Sánchez
Laboratorio de Genómica Viral y Humana
Facultad de Medicina - UASLP
Avenida Venustiano Carranza #2405
Colonia Filtros las Lomas, CP 78210
San Luis Potosí, México
+52 (444) 826-2344 extensión 568
pghs26@gmail.com

Abstract

El Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo-1 (HIV-1) agente causal del SIDA, ha infectado a 33.4 millones de individuos a nivel mundial y causado la muerte a alrededor de 2 millones de personas hasta el 2008 de acuerdo a la OMS. En 2010 tan solo en México se habían registrado 225,000 personas infectadas. Para combatir la pandemia a mediados de los 90's surgieron los medicamentos anti-retrovirales (ARV) dirigidos contra las enzimas de la región pol del virus (proteasa, transcriptasa inversa e integrasa) en una modalidad efectiva denominada Tratamiento Anti-retroviral Altamente Activo (HAART). La aplicación de esta modalidad tuvo como consecuencia un incremento en la calidad y tiempo de vida de las personas infectadas. En respuesta a la presión selectiva ejercida por el tratamiento, el HIV-1 ha adquirido mutaciones de resistencia que le confieren la capacidad de replicarse a pesar del tratamiento. Esto ha traído como consecuencia una disminución en la eficacia de los ARV y la transmisión de estas mutaciones a individuos no tratados (naïve). En México los pocos estudios realizados en relación a la prevalencia de mutaciones de resistencia a ARV's en la población tratamiento-naïve son discrepantes. Cuatro fragmentos de PCR emplamados permitieron cubrir la totalidad de la región pol de los cinco aislados clínicos evaluados y generar contigs de 2986 bp en promedio para muestras con cargas virales superiores a los 70,900 cp/ml. La calidad de las secuencias nucleotídicas caracterizadas permitieron el análisis de mutaciones asociadas a ARV's, la subtipificación nucleotídica de los aislados, la identificación de eventos recombinatoriales regionales al igual que el mapeo tridimensional de las mutaciones proteicas. Este manuscrito resume el éxito obtenido al diseñar y optimizar herramientas moleculares y de bioinformática para la identificación de mutaciones asociadas a resistencia a ARV en pacientes infectados por HIV-1.

Introducción

El Virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIV) es el agente causal del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (AIDS) previamente conocido como Virus Asociado a Linfadenopatía (LAV); Virus Linfotrópico Humano Tipo III (HTLV-III); y Virus Relacionado al SIDA (ARV), (Barre-Sinoussi et al., 1983; Gallo and Montagnier, 2003; Levy, 1984; Montagnier, 1984; Popovic et al., 1984). El HIV pertenece a la familia *Retroviridae* y al género de Lentivirus que agrupa a otros virus linfocitotrópicos que ocasionan inmunodeficiencia en bovinos (BIV), felinos (FIV) y

simios (SIV). Miembros de este género ocasionan también la anemia infecciosa en equinos (EIA), artritis y encefalitis en caprinos y encefalitis con neumonitis crónica en ovinos (Visna/maedi) (Benavides et al., 2009; Viruses, 2010). El programa de HIV/SIDA de la ONU reportó a finales del 2008 la existencia de 33.4 millones de individuos infectados por HIV a nivel mundial, de los cuales 2.7 millones de ellos correspondieron a infecciones contraídas tan sólo ese año. La misma agencia reportó la muerte de 2 millones de individuos a causa de HIV durante ese mismo año (UNAIDS, 2009). En América Latina para el 2009 se habían detectado cerca de 2 millones de infectados por HIV, lo que corresponde al 4.2% de la casuística mundial (UNAIDS, 2009). En México hasta el mes de junio del 2010 se tenía un registro de aproximadamente 225,000 personas infectadas por HIV y una prevalencia cercana al 0.4% (CENSIDA, 2010).

Existen dos tipos de HIV con orígenes filogenéticos, distribución geográfica y características clínicas distintivas. El HIV-1 tiene una distribución global y ocasiona más del 90% de las infecciones a nivel mundial mientras que el HIV-2 se encuentra restringido geográficamente a la región Sub-Sahariana del continente africano con limitadas incursiones al continente europeo (Gallo and Montagnier, 2003; Marx, 2005). HIV-1 se subdivide en tres grupos principales en base a diferencias de secuencia nucleotídica: Main (M), Outlier (O), Non-M non O (N) y Pending (P) (Kandathil et al., 2005; Plantier et al., 2009). El grupo M causa más del 90% de las infecciones por HIV-1 y es el de distribución geográfica más extendida. En cambio los aislados del grupo N han causado tan sólo unas cuantas decenas de infecciones en Camerún mientras que las infecciones por virus del grupo O rara vez se identifican fuera del África centro-occidental (Marx, 2005). En el 2009, un nuevo virus emparentado al SIV de gorilas salvajes (SIVgor) fue identificado en una mujer francesa residente de Camerún. Dicho virus fue asignado a la categoría transitoria P por diferir del ancestro simiano más emparentado a HIV-1 correspondiente al SIV del chimpancé (SIVcpz) (Plantier et al., 2009). El grupo M se encuentra compuesto a su vez por nueve subtipos diferentes: A, B, C, D, F, G, H, J y K además de 48 Formas Recombinantes Circulantes (CRF). Las CRF's siendo el producto de la recombinación de dos o más subtipos diferentes (Los Alamos National Security, 2010; Peeters, Toure-Kane, and Nkengasong, 2003). Los diferentes subtipos que componen al grupo M también muestran diferencias en su distribución geográfica (Organization, 1994; Stebbing and Moyle, 2003). Los subtipos causan casi el 50% de las infecciones por HIV-1 (Buonaguro, Tornesello, and Buonaguro, 2007). El subtipo A se encuentra principalmente en el

centro y este de África (Kenia, Tanzania y Ruanda). El subtipo B principalmente en Europa, América y Australia. El subtipo C se encuentra principalmente en el sur de África, India y Nepal (Buonaguro, Tornesello, and Buonaguro, 2007). En Latinoamérica se ha demostrado la circulación de los subtipos B, C, G y F al igual que de múltiples CRF's (Candal et al., 1997; Revilla et al.; Tanuri et al., 1999; Veras et al.). En México se han aislado virus del subtipo B al igual que las CRF's BG y BF (Rivera-Morales et al., 2001; Vazquez-Valls et al.).

El HIV posee un genoma de 9,719 bp dividido en tres regiones genómicas (*gag*, *pol* y *env*) las cuales codifican para 15 proteínas diferentes empleando los 3 marcos de lectura disponibles. La región *gag* (group antigen coding region) abarca 2,291 bp y codifica para las proteínas de matriz (p17), cápside (p24) y nucleocápside (p7). La región *pol* (polimerase coding region) consta de 3,011 bp y codifica para la proteasa (p15 o PR), la transcriptasa inversa (p66 o RT) y la integrasa (p32 o IN). La región *env* (envelope coding region) abarca 2,570 bp y codifica para las glicoproteínas de adhesión (gp120) y de fusión (gp41) (Fanales-Belasio et al.; Kuiken, 2010). La integración del genoma viral es un paso clave en el ciclo replicativo del virus (Buchow et al., 1989). El genoma viral integrado se expresa en forma de dos transcritos de mRNA, el primero correspondiente a la región Gag-Pol y el segundo correspondiente a la región *env*. Cada uno de estos transcritos son traducidos en forma de un péptido policistrónico el cual posteriormente debe ser procesado por la PR viral para generar las proteínas funcionales correspondientes (Kilareski et al., 2009).

Las proteínas codificadas por la región *pol* son cruciales para la función del virus y el principal blanco terapéutico de las estrategias de tratamiento antirretroviral actualmente disponible (Fanales-Belasio et al.; Farmerie et al., 1987; Kohl et al., 1988). La PR es la responsable de cortar los péptidos policistrónicos virales en sus unidades funcionales, la RT es la encargada de retrotranscribir el RNA monocatenario viral hacia cDNA y la IN se encarga de transportar e insertar al DNA viral en una región transcripcionalmente activa del genoma hospedero (Schroder et al., 2002).

El primer medicamento anti-retroviral (ARV) empleado para el tratamiento de las infecciones por HIV fue el AZT (3'-azido-3'-deoxitimidina, también llamado zidovudina), desarrollado en 1987 para interferir con la actividad de la RT (Committee, 1994). Desde entonces, prácticamente todos

los pasos críticos del ciclo de vida del HIV han sido el blanco de estrategias terapéuticas. Un gran avance en el tratamiento ARV, fue el uso combinado de tres o más medicamentos con distinto mecanismo de acción en una estrategia denominada Tratamiento Anti-retroviral Altamente Activo (HAART, por sus siglas sajonas). La introducción de HAART ha incrementado dramáticamente la supervivencia de pacientes infectados por HIV (1996; Hammer et al., 1996). El HAART actualmente emplea una combinación de dos inhibidores de la RT tipo análogos de nucleósidos (NRTI) y un tercer componente que puede ser un inhibidor de la RT no nucleósido (NNRTI) o un inhibidor de PR (Ramirez, 2009). Desafortunadamente ningún acercamiento terapéutico desarrollado hasta la fecha erradica por completo al virus ni detiene su replicación. Todos se han visto obstaculizados por el surgimiento de mutaciones virales asociadas a resistencia a fármacos anti-retrovirales (ARVM) (Lalonde et al.; Lira et al.; Organization, 1994; UNAIDS, 2009). El surgimiento de virus con ARVM en pacientes sujetos a tratamiento es una ocurrencia común dada la presión selectiva que imprime el fármaco ARV. Cabe destacar que dichos virus mutados suelen tener un *fitness viral* (tasa de replicación, fidelidad de replicación, infectividad o transmisibilidad) inferior a los virus *wild-type* (Lauring and Andino). Por ello la verdadera prevalencia de ARVM en las cepas de HIV circulantes debe establecerse en pacientes no tratados (tratamiento *naïve*). La prevalencia de ARVM entre pacientes tratamiento *naïve* oscila entre 3-20% para Norteamérica y entre el 5 y 15% para Europa (Girardi, 2003). En Argentina se ha reportado una prevalencia del 2.4%, mientras que en Brasil es de un 6.3% (Brindeiro et al., 2003; Kijak et al., 2001). En México existen varios resultados contrastantes. Un estudio realizado en pacientes HIV+ tratamiento *naïve* residentes de la ciudad de Guadalajara reportó una prevalencia de ARVM del 16% (Escoto-Delgadillo et al., 2005). Estudios realizados en la ciudad de Monterrey en el mismo tipo de pacientes han reportado una prevalencia de tan sólo 2.8% para la región codificante para la RT (Valle-Bahena et al., 2006). En cambio, estudios realizados en pacientes de la ciudad de Tijuana reportan una prevalencia del 2.5% (Viani et al., 2007).

La caracterización de la presencia, tipo y prevalencia de ARVM entre las cepas circulantes de HIV en una población es de suma importancia dadas las implicaciones clínicas que suponen. La caracterización de dichas mutaciones permite determinar que medicamentos antirretrovirales son los más adecuados para tratar la infección en una población dada lo cual conlleva a canalizar y optimizar los recursos disponibles para el tratamiento y control de la diseminación de ésta

enfermedad. Este trabajo describe nuestro acercamiento para el desarrollo de herramientas moleculares y de bioinformática dirigidas a permitir el análisis de la relevancia clínica y funcional de las ARVM en pacientes infectados por HIV. Dichas herramientas han sido desarrolladas para permitir su traslación hacia aplicaciones tanto científicas como clínicas inmediatas. Estas herramientas sentarán las bases metodológicas para la caracterización de la prevalencia de ARVM en pacientes HIV+ en futuros estudios de epidemiología molecular y caracterización genómica. De manera paralela, dichas herramientas se pondrán a disposición de las instituciones de salud pública del estado de San Luis Potosí que colaboraron en su desarrollo para optimizar y guiar el manejo clínico de pacientes HIV infectados.

Materiales y Métodos

Población de estudio y muestras

Cinco muestras sanguíneas derivadas de pacientes HIV+ fueron referidas por el Laboratorio Estatal de Salud Pública (LESP) de Servicios en Salud del Estado de San Luis Potosí. Estas muestras nos fueron proporcionadas de manera anonimizada tras haber sido sometidas a estudios de carga viral por el LESP como parte del seguimiento virológico realizado para el Centro Ambulatorio de Prevención y Atención en SIDA e Infecciones de Transmisión Sexual (CAPASITS) de San Luis Potosí. Dichas muestras forman parte de la Colección Genómica Mexicana de Pacientes HIV infectados (MGDC-HIV) compiladas por nuestro laboratorio desde el 2009. El proyecto recibió la aprobación de parte de los comités de ética e investigación institucionales correspondientes (Facultad de Medicina, LESP y CAPASITS).

Extracción de RNA

El plasma sanguíneo fue obtenido a partir de las muestras de sangre entera por centrifugación a 3000 G por 5 minutos siendo almacenado a -80°C hasta su procesamiento ulterior. La extracción del RNA a partir de plasma sanguíneo se realizó con el kit High Pure Viral RNA de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). El RNA obtenido fue cuantificado empleando el espectrofotómetro microvolumétrico (Nanodrop, ND-1000, Nanodrop technologies) y posteriormente almacenado a -80°C.

Síntesis de cDNA (síntesis de primer cadena)

La síntesis del DNA complementario para la región codificante para la PR, RT e IN utilizó un paso separado de termociclaje previo a la amplificación por PCR de cuatro fragmentos individuales. El programa de termociclaje constó de someter 1.125 mM (concentración final) del oligonucleótido correspondiente a cada uno de los cuatro fragmentos por separado, 0.25 mM de dNTPs y 10 µl del RNA extraído a un ciclo de desnaturalización inicial a 95°C por dos minutos seguido de 4°C por dos minutos. Tras este paso se agregaron 2 µl de Buffer 10X y 100 IU de la enzima retrotranscriptora M-MuLV Reverse Transcriptase RNase H⁻ (Vivantis Technologies Sdn. Bhd. Selangor D. E., Malaysia) para un volumen final de 20 µl y se sometió la mezcla completa a un segundo programa de termociclaje que constó de un ciclo de 60 minutos a 42°C, un ciclo a 95°C por 10 minutos y un ciclo final a 4°C por cinco minutos. El cDNA obtenido se utilizó para PCR's o se almacenó a -80°C hasta su empleo.

Amplificación de fragmentos subgenómicos de la región pol por PCR

Para la amplificación de la región *pol* de HIV se siguió una estrategia anidada, dividiendo a su vez la región *pol* en 4 PCR's anidadas distintas y empleando termocicladores de gradiente (Maxygene Cycler, Axygene, California, USA). Una PCR que amplifica la región codificante para proteasa (Prot), dos para la región que codifica para transcriptasa inversa (RTa y RTb) y una para la región de la integrasa (Int). La longitud de los amplicones así generados fue de 514 bp para Prot, 1058 bp para RTa, 986 bp para RTb y 994 bp para Int los cuales al ser unidos brindan una cobertura final de contig de 2986 bp. Para cada una de las PCR's externas se utilizaron los oligonucleótidos correspondientes a cada fragmento externo por separado (Ver Tabla 1) a una concentración final de 400 nM, Buffer A 1X, MgCl₂ a 1.5 mM, dNTP's a 200 µM, 0.3 IU de Taq DNA polimerasa (Vivantis Technologies Sdn. Bhd. Selangor D. E., Malaysia) y 4 µl de cDNA, ajustando a un volumen final de 12.5 µl con agua bidestilada. Los programas de termociclaje para las PCR's externas constaron de un paso de desnaturalización inicial a 94°C por dos minutos seguidos de 25 (Prot), 35 (RTa y RTb) y 30 (Int) ciclos de desnaturalización (94° por 30 segundos), hibridización (ver abajo) y extensión (72° por 1 minuto) seguidos en todos los casos de un paso final de extensión a 72° por dos minutos. Las temperaturas y tiempos de hibridización para cada uno de los fragmentos fueron de 30 segundos a 50°C para Prot, 45 segundos a 55° para RTa, 45 segundos a 54° para RTb y 30 segundos a 60° para Int. Tras cada una de las cuatro PCR externas se utilizó 1 µl del producto de

PCR para realizar las PCR's internas (anidadas) utilizando oligonucleótidos a una concentración final de 400 nM, Buffer A 1X, MgCl₂ a 1.5 mM, dNTP's a 200 μM, 0.3 IU de Taq DNA Polymerase, ajustando a un volumen final de 12.5 μl con agua bidestilada. Los programas de termociclaje para las PCR's anidadas constaron de un paso de desnaturalización inicial a 94°C por dos minutos seguidos de 30 ciclos de desnaturalización (94° por 30 segundos), hibridización (ver abajo) y extensión (72° por 1 minuto) seguidos de un paso final de extensión a 72° por dos minutos. Las temperaturas y tiempos de hibridización para cada uno de los fragmentos fueron de 30 segundos a 60°C para Prot, 45 segundos a 51° para RTa, 45 segundos a 54° para RTb y 30 segundos a 50° para Int. Los productos internos de las PCR's fueron visualizados y documentados tras electroforesis a 4.7 V/cm en un gel de agarosa al 1.5% tras su tinción con bromuro de etidio y bajo iluminación ultravioleta (BioDoc-It, UltraViolet Products Limited, Cambridge, UK).

Clonación de fragmentos subgenómicos de la región pol

Los amplicones obtenidos tras la estrategia de PCR anidada fueron ligados al vector pGEM-T[®] Easy de acuerdo a las recomendaciones del fabricante (Promega Corporation, Wisconsin EUA). A las células competentes JM109 se les añadió 3 μl del producto de ligación colocándolas primero en hielo por 30 minutos y provocando el choque térmico en un baño de agua a 42°C por 30 segundos, seguido de una incubación en hielo durante dos minutos. Se incubaron a 37°C por 1 hora en 250 μl de medio LB, sembrando 100 μl por dispersión de placa en cajas Petri con medio LB sólido suplementado con bencilpenicilina (concentración final de 100 μg/ml), el inductor IPTG (concentración final de 0.5 mM) y X-Gal (concentración final 80 μg/ml). Posteriormente las células inducidas se incubaron durante 12 horas a 37°C seleccionando las clonas transfectadas por fenotipo (colonias blancas).

Extracción del DNA plásmido transfectado y secuenciación

La extracción del DNA plasmídico se realizó con el Kit Wizard Genomic DNA Purification de Promega utilizando el protocolo para el aislamiento de DNA genómico de bacterias Gram negativas (Promega Corporation, Wisconsin EUA). El DNA extraído fue empleado para reamplificar el amplicón de interés empleando la PCR anidada correspondiente para cada uno de los fragmentos subgenómicos de cada una de las 5 muestras clonadas. Se verificó el tamaño del amplicón por electroforesis en gel de agarosa de una alícuota de 5 μl del producto de PCR enviando el producto

restante a secuenciar en el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad del CINVESTAV Irapuato (Guanajuato, México). La secuenciación se realizó en dos direcciones para cada fragmento.

Procesamiento, edición y anotación de secuencias nucleotídicas

Los electroferogramas obtenidos posterior a la secuenciación fueron analizados y editados con el programa 4Peaks version 1.7.2 (A. Griekspoor & Tom Groothuis) en una plataforma Macintosh OSX 10.6.7. Las secuencias de ambas direcciones para cada fragmento subgenómico fueron combinadas para generar un solo archivo de texto en formato fasta empleando ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>). El ensamblaje del contig correspondiente a la región *pol* completa de cada muestra se realizó alimentando los archivos fasta de cada fragmento subgenómico a la aplicación *HIValign* de Los Alamos National Laboratory HIV Database empleando a HXB2 como secuencia de referencia (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HMM/HmmAlign.html>). Posteriormente se generaron alineamientos nucleotídicos de las cinco regiones *pol* completas empleando *ClustalW2* y reformateando para ilustrar unanimidad respecto a la referencia empleando la herramienta creada por James Robinson del Anthony Nolan Research Institute que se encuentra hospedada en nuestro servidor local (<https://www.genomica.uaslp.mx/Herramientas/reformat.html>). Los alineamientos nucleotídicos se realizaron utilizando la simbología que comúnmente se sigue para HLA, en donde el símbolo “*” significa que se desconoce la secuencia, “.” que no existe secuencia y “-” que la secuencia es homóloga a la secuencia de referencia empleada. Los alineamientos nucleotídicos fueron posteriormente traducidos al polipéptido de longitud completa (de la región *pol*) para cada muestra empleando esta última herramienta y ulteriormente alineados independientemente para cada proteína. Los alineamientos así generados (tanto nucleotídicos como proteicos) fueron editados empleando un procesador de textos para incluir numeración de bases, codones y residuos aminoacídicos así como las regiones codificantes para cada proteína y dominios/subdominios proteicos. Los contigs armados fueron alimentados a la herramienta *Quality Control*, de Los Alamos National Laboratory HIV Database (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/QC/index.html>), antes de ser incluidos en *GenBank* de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Los archivos fasta, alineamientos nucleotídicos y aminoacídicos generados se encuentran libremente disponibles

a través del portal web del Laboratorio de Genómica Viral y Humana (<https://www.genomica.uaslp.mx/Research/HIV.html>).

Subtipificación, análisis recombinatorial y mapeo genómico de secuencias nucleotídicas.

La subtipificación y el análisis recombinatorial de las secuencias nucleotídicas se basó en comparaciones filogenéticas y métodos de bootscanning de ventana deslizante empleando la herramienta *REGA HIV-1 subtyping tool* versión 2.0 (<http://dbpartners.stanford.edu/RegaSubtyping/>). La localización genómica de cada uno de los contigs secuenciados fue mapeada hacia un pictograma representativo del genoma de HIV-1 por la misma herramienta para denotar homología regional en colores y resaltar los eventos recombinatoriales (en base a los histogramas de soporte estadístico). Versiones a color de dichas imágenes se encuentran disponibles en <https://www.genomica.uaslp.mx/Research/HIV3.html>. Para generar los histogramas de soporte estadístico para cada uno de los eventos recombinatoriales se empleó una ventana de 400 bp con pasos de 50 bp. El umbral para la detección de eventos recombinatoriales se fijó en 70% de soporte estadístico (bootscan confidence).

Genotipificación de mutaciones asociadas a resistencia a fármacos ARV

La evaluación de la presencia de genotipos asociados a resistencia a ARV hizo uso de la aplicación en línea *HIVdb: Genotypic Resistance Interpretation Algorithm* de la base de datos de resistencia a fármacos administrada por la Universidad de Stanford (<http://sierra2.stanford.edu/sierra/servlet/JSierra>). Dicha herramienta permitió establecer la homología porcentual las secuencias codificantes para cada enzima con respecto a los diferentes subtipos de HIV-1 conocidos. Adicionalmente esta herramienta permitió evaluar la calidad de las secuencias generadas e informar sobre corrimientos del marco de lectura, inserciones/delecciones, y la presencia de codones inusuales. Esta misma herramienta nos permitió evaluar la presencia de mutaciones asociadas a resistencia a inhibidores de PR (atazanavir, darunavir, fosaprenavir, indinavir, lopinavir, nelvinavir, saquinavir, tipranavir), a inhibidores nucleosídicos de la RT (lamivudina, abacavir, zidovudina, stavudina, didanosina, emitricitabina, tenofovir, a inhibidores no-nucleosídicos de la RT (delavirina, efavirenz, etravirina, nevirapina) y a inhibidores de IN (elvitegravir y raltegravir).

Mapeo tridimensional de mutaciones hacia modelos cristalográficos

Los residuos aminoacídicos polimórficos fueron mapeados hacia estructuras tridimensionales compiladas de la base de datos *Protein Data Bank* (<http://www2.rcsb.org/pdb/home/home.do>) para PR (3OXC), RT (2WON) e IN (1K6Y). Las estructuras cristalográficas fueron manipuladas y procesadas empleando la aplicación *MacPyMOL* (DeLano Scientific LLC) en una plataforma Macintosh OS X 10.6.7. El modelaje molecular de las proteínas putativas codificadas en las secuencias nucleotídicas de los aislados clínicos se realizó empleando la aplicación *SWISS-MODEL* en modo automático albergada en el Servidor de Sistemas Expertos en Proteómica *ExpASy* (Arnold et al., 2006).

Resultados

Amplicones del tamaño esperado fueron obtenidos para cada uno de los fragmentos subgenómicos correspondientes a la región *pol* de los cinco aislados clínicos libres de productos inespecíficos o de dímeros de primers (ver figura 1). Dichos amplicones fueron obtenidos de muestras con cargas virales superiores a los 70,900 cp/ml (media 754,580 cp/mL rango 70,900 - 2'900,000 cp/ml). Los amplicones fueron clonados y secuenciados exitosamente de primer intento obteniendo electroferogramas de secuenciación de excelente calidad en ambas direcciones. Una excepción fue la de la reacción forward del fragmento RTb correspondiente a la muestra MX-HIV-401 la cual mostraba numerosas ambigüedades. La longitud promedio de las secuencias de alta calidad generadas para ambas direcciones de cada fragmento fue de 433.9 bp para Prot, 879.7 bp para RTa, 839.4 bp para RTb y de 874.1 bp para Int. La longitud del empalme de secuencias al sumar las dos reacciones correspondientes a cada fragmento subgenómico fue de 392 bp para Prot, 803 bp para RTa, 788 bp para RTb y de 853 bp para Int, para formar fragmentos subgenómicos promedio de 475, 954, 878 y 895 bp para Prot, RTa, RTb e Int, respectivamente. No se observó ninguna posición ambigua en los empalmes de secuencias correspondientes a las dos direcciones de secuenciación de los cuatro fragmentos subgenómicos. Los contigs de la región *pol* completa fueron armados a partir del empalme de cada uno de los cuatro fragmentos subgenómicos. Entre los fragmentos subgenómicos de Prot y RTa el empalme fue de 114 bp, entre los de RTa y RTb fue de 90 bp y entre RTb e Int el empalme fue de 48 bp. La longitud total de los contigs así armados fue de 2937 bp para MX-HIV-0086, 2954 bp para MX-HIV-0327, 2962 bp para MX-HIV-0395, 2958 bp para MX-HIV-0401 y 2940 bp para MX-HIV-0422. Cada una de las clonas generadas en el laboratorio

para las cinco muestras clínicas abarcaron el 100% de la porción codificante de la región *pol*. Los contigs completos fueron enviados para su inclusión a la base de datos GenBank (JN157829, JN157835, JN157836, JN157837 y JN157838). Los archivos correspondientes al procedimiento de armado de cada uno de los contigs al igual que las secuencias nucleotídicas completas en formato fasta se encuentran disponibles en <https://www.genomica.uaslp.mx/Research/HIV1.html>.

Los alineamientos nucleotídicos de la región *pol* completa de los cinco aislados clínicos secuenciados junto con la referencia de HIV-1 HXB2 se presentan en el suplemento A. Los alineamientos abarcan desde la posición 2,085 hasta la posición 5,114 e incluyen además de la región *pol* al extremo 3' de la región *gag* y el principio del extremo 5' de la región codificante para el factor de virulencia viral (*Vif*). Las secuencias de los aislados locales abarcan desde la posición $2,149 \pm 3$ hasta la posición $5,104 \pm 9$. Las secuencias clonadas incluyen 111 bp en el extremo 5' correspondientes al sitio de deslizamiento ribosomal que permite cambiar la fase del marco de lectura en la transición *gag-pol*. Dos de las secuencias locales (MX-HIV-0401 y MX-HIV-0395) demostraron tener inserciones de tripletes en la región de deslizamiento ribosomal entre las posiciones 2,198-2,199 y 2,240-2,241, respectivamente. Adicionalmente, tres de las secuencias locales presentaron una delección de cuatro tripletes abarcando desde la posición 2,220 a la 2,231. No se observaron más delecciones o inserciones en el resto de las secuencias generadas.

En total fueron detectadas 449 posiciones nucleotídicas polimórficas correspondiendo al 15.2% de las posiciones nucleotídicas evaluables. De éstas, 23 sitios polimórficos se encontraron en la región de deslizamiento ribosomal, 47 en la región de la PR, 262 en la de la RT y 117 en la de IN. Estos sitios polimórficos corresponden al 23.9% de las bases de la región de deslizamiento, 16% de las bases de la región codificante para la PR, 15.6% de las bases de la RT y a 13.5% de las bases de la IN. De los 99 codones evaluables que codifican para la PR, 43.4% (n=43) presentaron polimorfismos, un porcentaje similar al de la RT con 39.4% (221 codones polimórficos de los 560 disponibles) y de la IN con 35.9% (104 codones polimórficos de los 289 codificantes).

El 34% (n=16) de las bases polimórficas encontradas en la región de la PR se ubicaron en la primer posición codónica, 10.6% (n=5) en la segunda y 55.3% (n=26) en la tercera. En la región codificante para la RT 23.3% (n=61) de los polimorfismos cayeron en la primer posición, 12.2%

(n=32) en segunda posición y 64.5% (n=169) en la tercera. Finalmente, los polimorfismos de la región codificante para la IN presentaron la misma distribución de mutaciones con 21.4% (n=25) de los polimorfismos en la primer posición, 11.9% (n=14) en la segunda y 66.7% (n=78) en la tercera. El análisis de los alineamientos de las secuencias aminoacídicas reveló la existencia de 19 residuos polimórficos en la proteína de la PR, correspondientes al 19.2% de los residuos totales de la proteína y al 44.2% de los codones polimórficos evidenciados en la secuencia nucleotídica. El 52.6% (n=10) de dichas sustituciones no-sinónimas se concentraron en el dominio de coro de PR, 10.5% (n=2) en el dominio terminal y 36.8% (n=7) en el dominio del flap de la PR. Adicionalmente se detectó la presencia de un codón de paro prematuro en la región del flap para la muestra MX-HIV-0422 (residuo 43). En los alineamientos aminoacídicos de la RT se encontraron 72 residuos polimórficos y un codón de paro prematuro en la posición 383 de la muestra MX-HIV-0401. Esto corresponde a 12.8% de los codones totales que conforman a la proteína y al 32.6% de los codones polimórficos presentes en la secuencia nucleotídica. De éstos residuos, 29.2% se concentraron en el dominio de RNasa H (n=21), 26.4% en el dominio conector (n=19), 16.7% en el dominio de la palma (n=12), 15.3% en el dominio del pulgar (n=11) y 12.5% en el dominio de dedos de la RT (n=9). Los alineamientos proteicos de la IN revelaron la presencia de 36 residuos polimórficos (sustituciones no-sinónimas) los cuales corresponden al 12.4% de los codones totales de la proteína y al 34.6% de los codones polimórficos en la secuencia nucleotídica. Adicionalmente se detectó la presencia de dos codones de paro prematuros en la región del dominio carboxy-terminal en las posiciones 252 y 221 de las muestras MX-HIV-0327 y MX-HIV-0422 respectivamente. El 50% de los residuos polimórficos se ubicaron en el coro catalítico de la IN, mientras que el 27.8% y 22.2% se localizaron en los dominios Amino- y Carboxy-terminales, respectivamente.

La subtipificación de los aislados clínicos bajo estudio se pudo realizar empleando tanto las secuencias nucleotídicas como las aminoacídicas. Las secuencias nucleotídicas pudieron ser analizadas a través de un acercamiento de bootscanning regional con ventana deslizante mientras que las secuencias proteicas fueron analizadas de manera global (homología porcentual de fragmentos completos). En ambos casos nuestras secuencias demostraron ser más similares a las de subtipos B. El análisis de homología proteica realizado para cada enzima por separado demostró una similaridad de 93.82% para las PR (desde 92.3 hasta 94.6%), de 94.38% para las RT (desde

93.3 hasta 95.2%) y de 95.44% (desde 94.7 hasta 95.9%) para las IN codificadas por los aislados locales con respecto al subtipo B.

El análisis recombinatorial o de homología regional empleando bootscanning de ventana deslizante demostró que la mayor parte de la secuencia de la región *pol* de los aislados locales mostraba mayor similitud con el subtipo B. No obstante, también se demostró la presencia de zonas de la región *pol* con menor homología con subtipos B y más parecidas a otros subtipos. La figura 2 ilustra la localización del contig MX-HIV-0422 en el pictograma del genoma de HIV al igual que su homología regional (en azul para indicar mayor parecido al subtipo B). Dicho pictograma hace evidente dos zonas de la región *pol* que aparecen en blanco y que según se demuestra en el plot de homología inferior abarcan las posiciones nucleotídicas aproximadas 750 a 1100 y 1700 a 2300. Estas dos zonas del aislado clínico en cuestión poseen menor homología con respecto al subtipo B y adquieren mayor homología con respecto al subtipo F (zona 750-1100) y subtipos D y A (zona 1700 a 2300). Cabe destacar que dicho hallazgo no representa un verdadero evento recombinatorial ya que el valor de soporte bootstrap (interpretable como porcentaje de confianza) no supera al 70% en ningún caso. Estas dos zonas de menor homología con respecto al subtipo B también se hicieron evidentes en los demás aislados clínicos al igual que otras distintas de menor tamaño. Las imágenes de alta resolución correspondientes al análisis recombinatorial de cada una de las muestras procesadas se encuentran disponibles libremente en nuestro portal web en <https://www.genomica.uaslp.mx/Research/HIV4.html>.

En los cinco aislados clínicos se detectaron 118 ARVM, 19 en las secuencias de la PR y 99 en las de la RT. De ellas, en PR se detectaron cuatro mutaciones menores asociadas a resistencia a ARV (L10I, G48R, A71T, I84T) y 15 mutaciones no asociadas a resistencia. En RT se encontraron 4 mutaciones asociadas a resistencia (M41L, K103N, T215D, T215A) y 95 no asociadas (ver tabla 2). A pesar del número de mutaciones encontradas en la región de PR, el análisis informático reveló que ninguna de ellas alteraba la susceptibilidad a los inhibidores de la proteasa de uso clínico. No obstante, el mapeo tridimensional permitió identificar mutaciones que por su proximidad al sitio activo de PR ($< 3.4 \text{ \AA}$) pudieran implicar cambios en la susceptibilidad a los inhibidores en las muestras MX-HIV-0327 y MX-HIV-0401 (ver figura 3).

De todas las mutaciones mencionadas para la región RT, únicamente dos aislados clínicos presentaron ARVM de relevancia clínica, la MX-HIV-0086 y la MX-HIV-0395. Las muestras restantes demostraron no poseer ARVM de relevancia clínica en esta región. La muestra MX-HIV-0086 presentó resistencia de bajo nivel a abacavir, didanosina y tenofovir al igual que resistencia de nivel intermedio a zidovudina y stavudina. La muestra MX-HIV-0395 presentó resistencia de alto nivel a delaviridina, efavirenz y nevirapina siendo susceptible para los demás inhibidores de la RT. En efecto la distribución tridimensional de ARVM presentadas en la figura 4 concuerda con este hallazgo donde las mutaciones de MX-HIV-0086 (M41L y T215D) mapean al dominio de dedos del modelo molecular de la RT (lugar de acción de los NRTI's) mientras que la mutación de MX-HIV-0395 (K103N) mapea hacia del dominio de la palma de la misma (lugar de acción de los NNRTI's). Ningún aislado clínico presentó ARVM de relevancia clínica con relación a inhibidores de IN.

Discusión

Se optó por utilizar RNA viral en vez de DNA proviral para nuestros experimentos ya que a pesar de que en DNA proviral existe una mayor diversidad de cuasiespecies, éstas reflejan la evolución de la infección y no necesariamente a las cuasiespecies de mayor relevancia clínica/funcional para el hospedero humano. A partir de RNA viral es posible identificar a las cuasiespecies con mayor tasa de replicación y aquellas que reflejan la presión selectiva impuesta por el ARV en uso del paciente. Adicionalmente se ha comprobado que en RNA viral se refleja con mayor rapidez la presencia de ARVM en comparación al DNA proviral, lo cual es más conveniente desde el punto de vista clínico (Bi et al., 2003; Devereux et al., 2000; Quan et al., 2008). En RNA se obtuvo una eficiencia del 100% para amplificar cargas virales iguales o superiores a las 70,900 cp/ml, mientras que para la secuenciación de estos amplicones la eficiencia fue del 98.75% (una reacción de secuenciación fallida de 40). Algunos autores consideran como falla terapéutica en un individuo con tratamiento ARV la presencia de cargas virales superiores a las 1,000 cp/ml, por lo que nuestras PCR's deben ser mejoradas para poder detectar cargas menores a las que presentaban las muestras empleadas (Dagnra et al.; Orrell et al.). No obstante, en la práctica la mayor parte de los pacientes con HIV sujetos a tratamiento ARV que presentan falla terapéutica suelen presentar cargas virales por encima de los 100,000 cp/ml (comunicado personal Dr. Martín Magaña y Dr. Gerardo Arteaga). Aun así, cabe destacar que la PCR desarrollada para amplificar la región de PR, nos permitió amplificar cargas virales inferiores a las 12,000 cp/ml (resultado no reportado). Una explicación a

las dificultades para amplificar muestras con cargas virales menores pudiera ser la calidad del RNA o el tiempo transcurrido entre la obtención de la muestra y su procesamiento, además del método utilizado en su transporte, por lo que deben cuidarse estos factores en futuras investigaciones.

Las herramientas moleculares desarrolladas nos permitieron amplificar la región codificante de *pol* de forma completa, incluyendo también parte de la región de deslizamiento ribosomal (localizada río arriba de PR) y de *Vif* (río abajo de IN). La presencia sólo de inserciones y deleciones en la región de deslizamiento ribosomal, nos indica que es una región sujeta a una presión selectiva menor, ya que no codifica para alguna enzima importante para la replicación del virus. En regiones como PR, RT o IN cambios de este tipo podrían afectar la actividad catalítica de las enzimas y por consiguiente afectar el *fitness* del virus (Bleiber et al., 2004; Ishima et al., 2001; Villena et al., 2007). El empleo de las herramientas de bioinformática nos permitió identificar distintas mutaciones (tanto sinónimas como no sinónimas) y sitios polimórficos en nuestras secuencias. Como era de esperarse, en los codones la base que sufrió más mutaciones fue la tercera, debido a que el código genético es más degenerado en la tercera posición, generando una mutación sinónima en la mayoría de los casos. Sin embargo, la base que menos presentó mutaciones fue la segunda, en vez de la primer base (la primer base conduce a una mutación no sinónima con más frecuencia que la segunda base), contrario a lo que se podría esperar. Una explicación a este resultado puede deberse a las mutaciones producidas por las enzimas de la familia APOBEC en el RNA viral. Estas enzimas producen la mutación de guanina a adenina durante la retrotranscripción del virus, teniendo como efecto que la base guanina sea la que más muta en las secuencias de HIV (Goff, 2003; Izumi, Shirakawa, and Takaori-Kondo, 2008). Se ha encontrado que en el V3 loop de la proteína gp120 gran parte de la variabilidad que presenta es debida a mutaciones no sinónimas en la base guanina localizada en la segunda posición codónica. La variabilidad en esta región podría conferirle una ventaja al virus para evadir al sistema inmune (Khrustalev, 2009). Este mismo fenómeno descrito para gp120 puede estar sucediendo en nuestras secuencias, pero debido a que codifican para proteínas claves de la replicación del virus, las mutaciones no sinónimas serían menos toleradas, teniendo como efecto que la segunda posición tenga menos mutaciones, tal como se observó.

Con respecto a las mutaciones encontradas, menos de la mitad fueron no sinónimas (44.2% para PR, 32.6% para RT y 34.6 para IN). Para PR e IN se identificaron más mutaciones no sinónimas en

los sitios activos de las enzimas y que a la vez están involucrados en la unión con los medicamentos ARV (en el dominio de coro en PR y en IN en el coro catalítico). En el caso de PR, esto se explica por una mayor presión selectiva producida por el tratamiento ARV (Boden and Markowitz, 1998). En RT el dominio de dedos, pulgar y palma (dedos y pulgar involucrados con la actividad catalítica de la enzima y palma con la unión de los NNRTI) se encontraron menos mutaciones no sinónimas, en comparación con el dominio RNAsa H, que fue en el que más mutaciones se observaron. Algunos estudios indican que el dominio RNAsa H está involucrado en la resistencia a los NRTI, por lo que esto podría explicar porque se identificaron tantas mutaciones no sinónimas en este dominio de RT (Nikolenko et al., 2005; Santos et al., 2008). También se identificaron codones de paro prematuros en algunas de las secuencias que analizamos. La presencia de codones de paro prematuros en la región *pol* ya ha sido identificada para HIV en DNA proviral y en RNA viral (Kieffer et al., 2005; Makinson et al., 2006; Paolucci et al., 2009). La presencia de estos codones de paro en la región *pol* produciría virus deficientes que no podrían transmitirse a otras células de forma eficiente. El hecho de que estos virus deficientes puedan ser aislados del suero sanguíneo, nos indica que siguen replicándose. Esto puede deberse a que estos virus podrían utilizar las enzimas virales de cuasiespecies competentes para replicarse e infectar otras células (Iwabu et al., 2006).

Todas las muestras en la región evaluada pertenecieron al subtipo B, con una similitud superior al 90%. Esto concuerda con publicaciones anteriores realizadas en poblaciones mexicanas (Rivera-Morales et al., 2001; Vazquez-Valls et al.). Los eventos de recombinación observados en nuestras secuencias no superaron en ninguno de los casos el valor de soporte bootstrap del 70%, por lo que no se pueden considerar como CRF's. Sin embargo las recombinaciones observadas pueden indicar antiguos eventos recombinatorios, que han acumulado mutaciones con el paso del tiempo. Nuestro trabajo está enfocado principalmente al desarrollo de las herramientas para amplificar, secuenciar y analizar la región *pol*, y aunque estos hallazgos pueden indicarnos que existe una mayor variabilidad en los subtipos circulantes en nuestro país, no pueden considerarse concluyentes, debido al limitado número de muestras analizadas. Referente a las ARVM encontradas, para PR la mutación L10I (MX-HIV-0327) se ha asociado con resistencia a la mayoría de los PI's, cuando se encuentra presente con otras mutaciones; G48R (MX-HIV-0327 y 0422) es una mutación inusual en esa posición, sin embargo la mutación G48V genera alto nivel de resistencia a saquinavir,

resistencia intermedia a atazanavir y nelfinavir, y una baja resistencia a indinavir y lopinavir; A71T (MX-HIV-0086, 0327 y 0422) se puede localizar en 2-3% de las personas sin tratamiento previo, pero incrementa su frecuencia en personas que han recibido inhibidores de proteasa (PI's), sin embargo es una mutación menor que puede conferir resistencia a atazanavir, ritonavir, indinavir, nelfinavir y saquinavir; I84T (MX-HIV-0401) es una mutación inusual en esa posición, sin embargo la mutación I84V puede causar resistencia intermedia a atazanavir, fosamprenavir, indinavir, nelfinavir y saquinavir; I13V (MX-HIV-0086, 0327, 422), I62V (todas las muestras) y L63P (todas, excepto MX-HIV-00395), son polimorfismos comunes que se presentan con mayor frecuencia en pacientes tratados en comparación de los no tratados, en el caso de I13V, en pacientes que poseen HIV-1 subtipo B; la mutación V77I (MX-HIV-0086, 00327 y 0422) es un polimorfismo común que se ha asociado con la terapia con nelfinavir.

En el caso de RT, la mutación M41L (MX-HIV-0086) usualmente se encuentra con T215Y, confiriendo juntas una resistencia de intermedia a alta a zidovudina y stavudina, y una baja resistencia a didanosina, abacavir y tenofovir; T215D (MX-HIV-0086) es una mutación transitoria entre el virus *wild type* y los mutantes Y y F; T215A (MX-HIV-0327 Y 0422) es una mutación inusual en esa posición; K103N (MX-HIV-0395) causa alto nivel de resistencia a nevirapina, delavirina y efavirenz; la mutación G333E es un polimorfismo que ocurre en mayor frecuencia en personas que reciben NRTIs, pudiendo facilitar la resistencia a zidovudina en aislados que además poseen la mutación M184V y otras mutaciones. Otras mutaciones como V60I, K277R, K390R, H483Y (MX-HIV-0327, 0401 y 0422) y I293V (en todas menos en MX-HIV-0086) a pesar de su alta frecuencia no han sido reportadas que confieran resistencia a algún medicamento ARV. La International AIDS Society-USA emite un reporte anual de ARVM (Johnson et al.). Comparando esta información con la obtenida en la base de datos de Stanford, encontramos algunas discrepancias. En el caso de la mutación de PR L63P, la International AIDS Society-USA en su reporte del 2010, la considera una mutación menor que confiere resistencia para lopinavir y ritonavir; I62V es considerada una mutación menor para atazanavir y ritonavir; L63P, para lopinavir y ritonavir; V77I para indinavir, ritonavir, nelfinavir y saquinavir; M36I para atazanavir, ritonavir, indinavir, nelfinavir, y tripanavir; D60E, L90M e I64V para atazanavir y ritonavir. Esto implica que existen algunas diferencias entre la base de datos de Stanford y el reporte de la International AIDS Society-USA, con respecto al impacto de algunas mutaciones en los ARVM. A pesar de que la base

de datos de Stanford nos permite conocer el impacto de una gran diversidad de mutaciones, es conveniente también consultar el reporte de la International AIDS Society-USA, para tener información adicional sobre algunas de las mutaciones que se pudieran presentar en los pacientes.

Comparando las muestras entre sí, MX-HIV-0395 para la región de PR y MX-HIV-0401 para RT son las muestras que presentan mayor cantidad de mutaciones adicionales. Estas mutaciones, a pesar de no ser mutaciones de resistencia reportadas, podrían tener cierto efecto en la resistencia a algún medicamento ARV. Estas herramientas tienen la ventaja de que nos permitirían identificar nuevas mutaciones que confieran resistencia a los ARVM que no han sido descritos con anterioridad, pudiendo ser características de las cuasiespecies circulantes en México. La interpretación de estas mutaciones en el contexto tridimensional de las proteínas virales, nos permitiría sugerir nuevas asociaciones con los ARVM y a la vez inferir hasta cierto grado si estas mutaciones pueden llegar a conferir resistencia a ciertos medicamentos. Estas herramientas tienen como finalidad ser un respaldo en la elección del tratamiento ARV más adecuado para el paciente, al identificar las mutaciones que presente que puedan conferir resistencia al tratamiento y por consiguiente disminuir su eficacia. La identificación de características genóticas de las cuasiespecies que presente el paciente (subtipo y presencia de recombinaciones) también es importante, ya que se ha relacionado con el progreso de la infección y la resistencia a ciertos medicamentos ARV (Taylor et al., 2008). De manera adicional, las herramientas moleculares y de informática desarrolladas durante estas investigaciones nos permitirán aplicarlas a estudios de epidemiología molecular y tamizaje de rutina de pacientes infectados por HIV. La disponibilidad de estas herramientas ya ha despertado interés entre la comunidad clínica del estado de San Luis Potosí, especialmente de aquellos involucrados en el manejo de pacientes con HIV. La disponibilidad de estas herramienta supone ahorros económicos y tiempos de respuesta más rápidos para el sector público. De particular relevancia para el Centro Ambulatorio Para la Atención del paciente con SIDA y otras Infecciones de Transmisión Sexual (CAPASITS) de San Luis Potosí es la posibilidad que esta herramienta implica para permitir el manejo integral del paciente con HIV con estándares de cuidado y seguimiento virológico primermundistas (Encuentre reportes de genotipificación como material suplementario).

Declaración de acceso abierto/fuente abierta

Los alineamientos, tablas y gráficas generadas, se encuentran disponibles en la página de nuestro laboratorio (<https://www.genomica.uaslp.mx/Research/HIV.html>), a su vez ponemos a disposición de los investigadores que lo requieran, las clonas generadas en nuestro trabajo de investigación.

Bibliografía

- (1996). Delta: a randomised double-blind controlled trial comparing combinations of zidovudine plus didanosine or zalcitabine with zidovudine alone in HIV-infected individuals. Delta Coordinating Committee. *Lancet* **348**(9023), 283-91.
- Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J., and Schwede, T. (2006). The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* **22**(2), 195-201.
- Barre-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., and Montagnier, L. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**(4599), 868-71.
- Benavides, J., Garcia-Pariente, C., Fuertes, M., Ferreras, M. C., Garcia-Marin, J. F., Juste, R. A., and Perez, V. (2009). Maedi-visna: the meningoencephalitis in naturally occurring cases. *J Comp Pathol* **140**(1), 1-11.
- Bi, X., Gatanaga, H., Ida, S., Tsuchiya, K., Matsuoka-Aizawa, S., Kimura, S., and Oka, S. (2003). Emergence of protease inhibitor resistance-associated mutations in plasma HIV-1 precedes that in proviruses of peripheral blood mononuclear cells by more than a year. *J Acquir Immune Defic Syndr* **34**(1), 1-6.
- Bleiber, G., Peters, S., Martinez, R., Cmarko, D., Meylan, P., and Telenti, A. (2004). The central region of human immunodeficiency virus type 1 p6 protein (Gag residues S14-I31) is dispensable for the virus in vitro. *J Gen Virol* **85**(Pt 4), 921-7.
- Boden, D., and Markowitz, M. (1998). Resistance to human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* **42**(11), 2775-83.
- Brindeiro, R. M., Diaz, R. S., Sabino, E. C., Morgado, M. G., Pires, I. L., Brigido, L., Dantas, M. C., Barreira, D., Teixeira, P. R., and Tanuri, A. (2003). Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance (HIV-BResNet): a survey of chronically infected individuals. *AIDS* **17**(7), 1063-9.
- Buchow, H. D., Tschachler, E., Gallo, R. C., and Reitz, M., Jr. (1989). HIV-I replication requires an intact integrase reading frame. *Haematol Blood Transfus* **32**, 402-5.
- Buonaguro, L., Tornesello, M. L., and Buonaguro, F. M. (2007). Human immunodeficiency virus type 1 subtype distribution in the worldwide epidemic: pathogenetic and therapeutic implications. *J Virol* **81**(19), 10209-19.
- Candal, D. H., Pau, C. P., Luo, C. C., Granade, T., Stetler, H., Amador, L., Meza, R., Nunez, C., Schochetman, G., and George, J. R. (1997). Genetic variability of HIV type 1 in Honduras. *AIDS Res Hum Retroviruses* **13**(15), 1349-50.
- CENSIDA (2010). Estadísticas, Vol. 2011. Secretaría de Salud, México, D.F.
- Committee, C. C. (1994). Concorde: MRC/ANRS randomised double-blind controlled trial of immediate and deferred zidovudine in symptom-free HIV infection. Concorde Coordinating Committee. *Lancet* **343**(8902), 871-81.
- Dagnra, A. Y., Vidal, N., Mensah, A., Patassi, A., Aho, K., Salou, M., Monleau, M., Prince-David, M., Singo, A., Pitche, P., Delaporte, E., and Peeters, M. High prevalence of HIV-1 drug resistance among patients on first-line antiretroviral treatment in Lome, Togo. *J Int AIDS Soc* **14**, 30.
- Devereux, H. L., Loveday, C., Youle, M., Sabin, C. A., Burke, A., and Johnson, M. (2000). Substantial correlation between HIV type 1 drug-associated resistance mutations in plasma and peripheral blood mononuclear cells in treatment-experienced patients. *AIDS Res Hum Retroviruses* **16**(11), 1025-30.
- Escoto-Delgadillo, M., Vazquez-Valls, E., Ramirez-Rodriguez, M., Corona-Nakamura, A., Amaya-Tapia, G., Quintero-Perez, N., Panduro-Cerda, A., and Torres-Mendoza, B. M. (2005). Drug-resistance mutations in antiretroviral-naive patients with established HIV-1 infection in Mexico. *HIV Med* **6**(6), 403-9.
- Fanales-Belasio, E., Raimondo, M., Suligo, B., and Butto, S. HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. *Ann Ist Super Sanita* **46**(1), 5-14.
- Farmerie, W. G., Loeb, D. D., Casavant, N. C., Hutchison, C. A., 3rd, Edgell, M. H., and Swanstrom, R. (1987). Expression and processing of the AIDS virus reverse transcriptase in Escherichia coli. *Science* **236**(4799), 305-8.
- Gallo, R. C., and Montagnier, L. (2003). The discovery of HIV as the cause of AIDS. *N Engl J Med* **349**(24), 2283-5.
- Girardi, E. (2003). Epidemiological aspects of transmitted HIV drug resistance. *Scand J Infect Dis Suppl* **106**, 17-20.
- Goff, S. P. (2003). Death by deamination: a novel host restriction system for HIV-1. *Cell* **114**(3), 281-3.
- Gonzalez, R., Masquelier, B., Fleury, H., Lacroix, B., Troesch, A., Vernet, G., and Telles, J. N. (2004). Detection of human immunodeficiency virus type 1 antiretroviral resistance mutations by high-density DNA probe arrays. *J Clin Microbiol* **42**(7), 2907-12.
- Hammer, S. M., Katzenstein, D. A., Hughes, M. D., Gundacker, H., Schooley, R. T., Haubrich, R. H., Henry, W. K., Lederman, M. M., Phair, J. P., Niu, M., Hirsch, M. S., and Merigan, T. C. (1996). A trial comparing nucleoside

- monotherapy with combination therapy in HIV-infected adults with CD4 cell counts from 200 to 500 per cubic millimeter. AIDS Clinical Trials Group Study 175 Study Team. *N Engl J Med* **335**(15), 1081-90.
- Ishima, R., Ghirlando, R., Tozser, J., Gronenborn, A. M., Torchia, D. A., and Louis, J. M. (2001). Folded monomer of HIV-1 protease. *J Biol Chem* **276**(52), 49110-6.
- Iwabu, Y., Goto, T., Tsuji, S., Warachit, J., Li, G. M., Shoji, S., Kameoka, M., and Ikuta, K. (2006). Superinfection of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) to cell clone persistently infected with defective virus induces production of highly cytopathogenic HIV-1. *Microbes Infect* **8**(7), 1773-82.
- Izumi, T., Shirakawa, K., and Takaori-Kondo, A. (2008). Cytidine deaminases as a weapon against retroviruses and a new target for antiviral therapy. *Mini Rev Med Chem* **8**(3), 231-8.
- Johnson, V. A., Brun-Vezinet, F., Clotet, B., Gunthard, H. F., Kuritzkes, D. R., Pillay, D., Schapiro, J. M., and Richman, D. D. Update of the drug resistance mutations in HIV-1: December 2010. *Top HIV Med* **18**(5), 156-63.
- Kandathil, A. J., Ramalingam, S., Kannangai, R., David, S., and Sridharan, G. (2005). Molecular epidemiology of HIV. *Indian J Med Res* **121**(4), 333-44.
- Khrustalev, V. V. (2009). HIV1 V3 loop hypermutability is enhanced by the guanine usage bias in the part of env gene coding for it. *In Silico Biol* **9**(4), 255-69.
- Kieffer, T. L., Kwon, P., Nettles, R. E., Han, Y., Ray, S. C., and Siliciano, R. F. (2005). G->A hypermutation in protease and reverse transcriptase regions of human immunodeficiency virus type 1 residing in resting CD4+ T cells in vivo. *J Virol* **79**(3), 1975-80.
- Kijak, G. H., Pampuro, S. E., Avila, M. M., Zala, C., Cahn, P., Wainberg, M. A., and Salomon, H. (2001). Resistance profiles to antiretroviral drugs in HIV-1 drug-naive patients in Argentina. *Antivir Ther* **6**(1), 71-7.
- Kilareski, E. M., Shah, S., Nonnemacher, M. R., and Wigdahl, B. (2009). Regulation of HIV-1 transcription in cells of the monocyte-macrophage lineage. *Retrovirology* **6**, 118.
- Kohl, N. E., Emini, E. A., Schleif, W. A., Davis, L. J., Heimbach, J. C., Dixon, R. A., Scolnick, E. M., and Sigal, I. S. (1988). Active human immunodeficiency virus protease is required for viral infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(13), 4686-90.
- Los Alamos National Laboratory (2010). HIV Sequence Compendium 2010. Kuiken, C. 2009.
- Lalonde, M. S., Lobritz, M. A., Ratcliff, A., Chamanian, M., Athanassiou, Z., Tyagi, M., Wong, J., Robinson, J. A., Karn, J., Varani, G., and Arts, E. J. Inhibition of Both HIV-1 Reverse Transcription and Gene Expression by a Cyclic Peptide that Binds the Tat-Transactivating Response Element (TAR) RNA. *PLoS Pathog* **7**(5), e1002038.
- Lauring, A. S., and Andino, R. Quasispecies theory and the behavior of RNA viruses. *PLoS Pathog* **6**(7), e1001005.
- Levy, J. A., A.D. Hoffman, S.M. Krammer, J.A. Landis, J.M. Shimabukuro, L.S. Oshiro (1984). Isolation of lymph cytopathic retroviruses from San Francisco patients with aids. *Science* **225**, 840-842.
- Lira, R., Valdez-Salazar, H., Vazquez-Rosales, G., Rojas-Montes, O., Ruiz-Tachiquin, M., Torres-Ibarra, R., Cano-Dominguez, C., Maldonado-Rodriguez, A., Gomez, A., Munoz, O., and Alvarez-Munoz, M. T. Genotypic testing for HIV-1 drug resistance using dried blood samples. *Arch Virol* **155**(7), 1117-25.
- Los Alamos National Security, L. (2010). <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html>, Vol. 2011.
- Makinson, A., Masquelier, B., Taieb, A., Peytavin, G., Waldner-Combernoux, A., Collin, G., Chene, G., Brun-Vezinet, F., Raffi, F., Le Moing, V., Lepout, C., and Descamps, D. (2006). Presence of numerous stop codons in HIV-1 reverse transcriptase proviral DNA sequences from patients with virological response to HAART. *AIDS* **20**(9), 1327-9.
- Marx, P. A. (2005). Unsolved Questions over the Origin of HIV and AIDS. *ASM News* **71**(1), 15-20.
- Montagnier, L. (1984). A new human t-lymphotropic retrovirus: characterization and possible role in lymphadenopathy and acquired immune deficiency syndromes. *Human T-cell Leukemia/Lymphoma Virus*, 363-369.
- Nikolenko, G. N., Palmer, S., Maldarelli, F., Mellors, J. W., Coffin, J. M., and Pathak, V. K. (2005). Mechanism for nucleoside analog-mediated abrogation of HIV-1 replication: balance between RNase H activity and nucleotide excision. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(6), 2093-8.
- Organization, W. H. (1994). HIV type 1 variation in World Health Organization-sponsored vaccine evaluation sites: genetic screening, sequence analysis, and preliminary biological characterization of selected viral strains. WHO Network for HIV Isolation and Characterization. *AIDS Res Hum Retroviruses* **10**(11), 1327-43.
- Orrell, C., Kaplan, R., Wood, R., and Bekker, L. G. Virological breakthrough: a risk factor for loss to followup in a large community-based cohort on antiretroviral therapy. *AIDS Res Treat* **2011**, 469127.
- Paolucci, S., Folli, A., Gulminetti, R., Calarota, S. A., Maserati, R., Baldanti, F., and Gerna, G. (2009). HIV-1 plasma variants encoding truncated reverse transcriptase (RT) in a patient with high RT-specific CD8+ memory T-cell response. *Curr HIV Res* **7**(3), 302-10.

- Peeters, M., Toure-Kane, C., and Nkengasong, J. N. (2003). Genetic diversity of HIV in Africa: impact on diagnosis, treatment, vaccine development and trials. *AIDS* **17**(18), 2547-60.
- Plantier, J. C., Leoz, M., Dickerson, J. E., De Oliveira, F., Cordonnier, F., Lemeé, V., Damond, F., Robertson, D. L., and Simon, F. (2009). A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat Med* **15**(8), 871-2.
- Popovic, M., Sarngadharan, M. G., Read, E., and Gallo, R. C. (1984). Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* **224**(4648), 497-500.
- Quan, Y., Brenner, B. G., Dascal, A., and Wainberg, M. A. (2008). Highly diversified multiply drug-resistant HIV-1 quasispecies in PBMCs: a case report. *Retrovirology* **5**, 43.
- Ramirez, D. E. S. (2009). Guía de manejo antirretroviral de las personas con VIH. 1ra ed ed (CENSIDA, Ed.). Secretaría de Salud, México, D.F.
- Revilla, A., Delgado, E., Christian, E. C., Dalrymple, J., Vega, Y., Carrera, C., Gonzalez-Galeano, M., Ocampo, A., de Castro, R. O., Lezaun, M. J., Rodriguez, R., Marino, A., Ordonez, P., Cilla, G., Cisterna, R., Santamaria, J. M., Prieto, S., Rakhmanova, A., Vinogradova, A., Rios, M., Perez-Alvarez, L., Najera, R., Montefiori, D. C., Seaman, M. S., and Thomson, M. M. Construction and Phenotypic Characterization of HIV Type 1 Functional Envelope Clones of Subtypes G and F. *AIDS Res Hum Retroviruses*.
- Rivera-Morales, L. G., Novitsky, V. A., Trujillo, J. R., Lavalle-Montalvo, C., Cano-Dominguez, C., Ramos-Jimenez, J., Jimenez-Rios, E., Flores-Flores, L., Lopez-Guillen, P., Gilbert, P., Vannberg, F., Tamez-Guerra, R., Rodriguez-Padilla, C., and Essex, M. (2001). The molecular epidemiology of HIV type 1 of men in Mexico. *AIDS Res Hum Retroviruses* **17**(1), 87-92.
- Santos, A. F., Lengrubler, R. B., Soares, E. A., Jere, A., Sprinz, E., Martinez, A. M., Silveira, J., Sion, F. S., Pathak, V. K., and Soares, M. A. (2008). Conservation patterns of HIV-1 RT connection and RNase H domains: identification of new mutations in NRTI-treated patients. *PLoS One* **3**(3), e1781.
- Schroder, A. R., Shinn, P., Chen, H., Berry, C., Ecker, J. R., and Bushman, F. (2002). HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* **110**(4), 521-9.
- Stebbing, J., and Moyle, G. (2003). The clades of HIV: their origins and clinical significance. *AIDS Rev* **5**(4), 205-13.
- Swanson, P., Devare, S. G., and Hackett, J., Jr. (2003). Molecular characterization of 39 HIV isolates representing group M (subtypes A-G) and group O: sequence analysis of gag p24, pol integrase, and env gp41. *AIDS Res Hum Retroviruses* **19**(7), 625-9.
- Tanuri, A., Swanson, P., Devare, S., Berro, O. J., Savedra, A., Costa, L. J., Telles, J. G., Brindeiro, R., Schable, C., Pieniazek, D., and Rayfield, M. (1999). HIV-1 subtypes among blood donors from Rio de Janeiro, Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* **20**(1), 60-6.
- Taylor, B. S., Sobieszczyk, M. E., McCutchan, F. E., and Hammer, S. M. (2008). The challenge of HIV-1 subtype diversity. *N Engl J Med* **358**(15), 1590-602.
- World Mundial Organization (2009). AIDS epidemic update December 2009. UNAIDS. 978 92 9173 832 8.
- Valle-Bahena, O. M., Ramos-Jimenez, J., Ortiz-Lopez, R., Revol, A., Lugo-Trampe, A., Barrera-Saldana, H. A., and Rojas-Martinez, A. (2006). Frequency of protease and reverse transcriptase drug resistance mutations in naive HIV-infected patients. *Arch Med Res* **37**(8), 1022-7.
- Vazquez-Valls, E., Escoto-Delgadillo, M., Lopez-Marquez, F. C., Castellero-Manzano, M., Echegaray-Guerrero, E., Bitzer-Quintero, O. K., Kobayashi-Gutierrez, A., and Torres-Mendoza, B. M. Molecular epidemiology of HIV type 1 in Mexico: emergence of BG and BF intersubtype recombinants. *AIDS Res Hum Retroviruses* **26**(7), 777-81.
- Veras, N. M., Gray, R. R., de Macedo Brigido, L. F., Rodrigues, R., and Salemi, M. High-resolution phylogenetics and phylogeography of human immunodeficiency virus type 1 subtype C epidemic in South America. *J Gen Virol* **92**(Pt 7), 1698-709.
- Viani, R. M., Hsia, K., Hubbard, P., Ruiz-Calderon, J., Lozada, R., Alvelais, J., Gallardo, M., and Spector, S. A. (2007). Prevalence of primary HIV-1 drug resistance in pregnant women and in newly diagnosed adults at Tijuana General Hospital, Baja California, Mexico. *Int J STD AIDS* **18**(4), 235-8.
- Villena, C., Prado, J. G., Puertas, M. C., Martinez, M. A., Clotet, B., Ruiz, L., Parkin, N. T., Menendez-Arias, L., and Martinez-Picado, J. (2007). Relative fitness and replication capacity of a multinucleoside analogue-resistant clinical human immunodeficiency virus type 1 isolate with a deletion of codon 69 in the reverse transcriptase coding region. *J Virol* **81**(9), 4713-21.
- Viruses, I. C. o. T. o. (2010). International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), Vol. 2011.

Tablas

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados para la región *pol* por PCR anidada. La tabla indica las secuencias y posiciones de hibridación de los oligonucleótidos empleados para la amplificación de la región *pol* de HIV. Se indica además el tamaño del amplicón generado y el autor responsable del diseño del oligonucleótido.

Nombre ^a	Secuencia (5' → 3')	Posición	Amplicón (bp)	Ref
Prot-FO	5'-TAATTTTTAGGGAAGATCTGGCCTTCC-3'	2082-2108	652	1
Prot-FI	5'-TCAGAGCAGACCAGAGCCAACAGCCCC-3'	2136-2163		
Prot-RI	5'-AATGCTTTTATTTTYTCTTCTGTYAATGGC-3'	2621-2650	514	
Prot-RO	5'-GCAAATACTGGAGTATTGTATGGATTTTCWGG-3'	2703-2734		
RT-FO2	5'-GGAAACCAAAAATGATAGGRGGAA-3'	2377-2400	1416	2
RT-FI2	5'-AGGTACAGTATTAGTAGGACCTAC-3'	2468-2491		
RT-RI3	5'-AYYAAGTCTTTTGATGGGTC-3'	3507-3526	1058	
RT-RO3	5'-TCCAYTCAGGAATCCAGGT-3'	3774-3793		
RT-FO3	5'-CTGGACTGTCAATGAYATACARA-3'	3302-3324	1102	
RT-FI3	5'-GTCAATGAYATACARAARTTAGTRGG-3'	3309-3334		
RT-RI2	5'-CATTGCTCTCCAATTRCTGTG-3'	4275-4295	986	
RT-RO2	5'-CCT GGA CTA CAG TCT ACT TGT CC-3'	4382-4404		
Int-FO	5'-CACACAARGGRATTGGRGGRAATG-3'	4177-4200	1046	3
Int-FI	5'-AACAAGTAGATAARTTAGTMAGT-3'	4201-4223		
Int-RI	5'-ATACATATGRTRYTTTACTARRCT-3'	5122-5195	994	
Int-RO	5'-TARYGGGATGTGTACTTCTGAAC-3'	5210-5223		

^a Las secuencias de los oligonucleótidos reversa mostradas en esta tabla representan el complemento reversa de la secuencia presente en los alineamientos.

Gonzalez et al., 2004¹, Autoría propia², Swanson, Devare, and Hackett, 2003³.

Tabla 2. ARVM identificadas en este estudio. Descripción de las mutaciones encontradas en cada muestra para PR y RT. Se indican las mutaciones menores (para PR) y las mutaciones NRTI y NNRTI (para RT) identificadas y mutaciones adicionales que no han sido identificadas con resistencia a algún medicamento ARV (otras).

		MXHIV00086	MXHIV00327	MXHIV00395	MXHIV00401	MXHIV00422
Totales		6	7	9	5	7
Menores		1	2	1	1	2

		MXHIV00086	MXHIV00327	MXHIV00395	MXHIV00401	MXHIV00422
Totales		23	25	27	29	26
Primarias		2	1	1	0	1

		MXHIV00086	MXHIV00327	MXHIV00395	MXHIV00401	MXHIV00422
Totales		23	25	27	29	26
Primarias		2	1	1	0	1

PR		Menores					
		MXHIV00086	MXHIV00327	MXHIV00395	MXHIV00401	MXHIV00422	Otras
	L10I						
	G48R						
	A71T						
	I84T						
	I13V						
	I15T						
	M36V						
	P39L						
	K43X						
	D60E						
	Q61E						
	I62V						
	L63P						
	L63S						
	I64V						
	E65D						
	I72V						
	V77I						
	I93IL						

RT		NRTI						NNRTI						Otras						
		MXHIV00086	MXHIV00327	MXHIV00395	MXHIV00401	MXHIV00422	Otras	MXHIV00086	MXHIV00327	MXHIV00395	MXHIV00401	MXHIV00422	Otras	MXHIV00086	MXHIV00327	MXHIV00395	MXHIV00401	MXHIV00422	Otras	
	M41L																			
	T215D																			
	T215A																			
	K103N																			
	M16MV																			
	C38R																			
	K49G																			
	V60I																			
	A98S																			
	K104R																			
	K122P																			
	K122E																			
	D123G																			
	I135R																			
	I135T																			
	I142V																			
	R172G																			
	Q174E																			
	Q174R																			
	N175Y																			
	T200E																			
	E203D																			
	Q207E																			
	R211K																			
	D237E																			
	V245M																			
	V245E																			
	S251G																			
	A272S																			
	K275Q																			
	K277R																			
	T286AS																			
	T286A																			
	T286S																			
	V292I																			
	V292IV																			
	I293V																			
	E297A																			
	E297K																			
	E297EK																			
	E312N																			
	E312Q																			
	I329V																			
	G333E																			
	Q334H																			
	Q334Y																			
	Q334L																			
	G335D																			
	F346L																			
	A355S																			

RT		Otras (continua)					
		MXHIV00086	MXHIV00327	MXHIV00395	MXHIV00401	MXHIV00422	Otras
	R356K						
	G359S						
	M357I						
	A360T						
	V365A						
	A371T						
	I375T						
	A376S						
	T377I						
	T377L						
	S379A						
	W383X						
	T386V						
	K390R						
	T397A						
	A400T						
	T403S						
	T403M						
	I411V						
	K431T						
	E432D						
	E449D						
	L452S						
	D460N						
	R461K						
	K465E						
	S468P						
	T470A						
	N474S						
	H483Y						
	H483N						
	L491S						
	L491P						
	Q500R						
	Q507H						
	I506L						
	E514D						
	E516D						
	L517M						
	L517I						
	L517V						
	S519N						
	E529D						
	V531I						
	A534T						
	Q547R						
	A554T						
	A554KN						
	A554S						

Figuras

Figura 1. Comparación entre RNA y producto de clonación. Muestra MX-HIV-0395 que ejemplifica las diferencias entre la amplificación a partir de RNA viral y el producto clonado. En el carril de la izquierda se observa el marcador de peso seguido de los amplicones correspondientes a la PR, RTa, RTb e INT generados a partir de RNA (pozos 2 a 5) seguidos de los mismos amplicones generados a partir de plásmido (pozos 6 a 9).

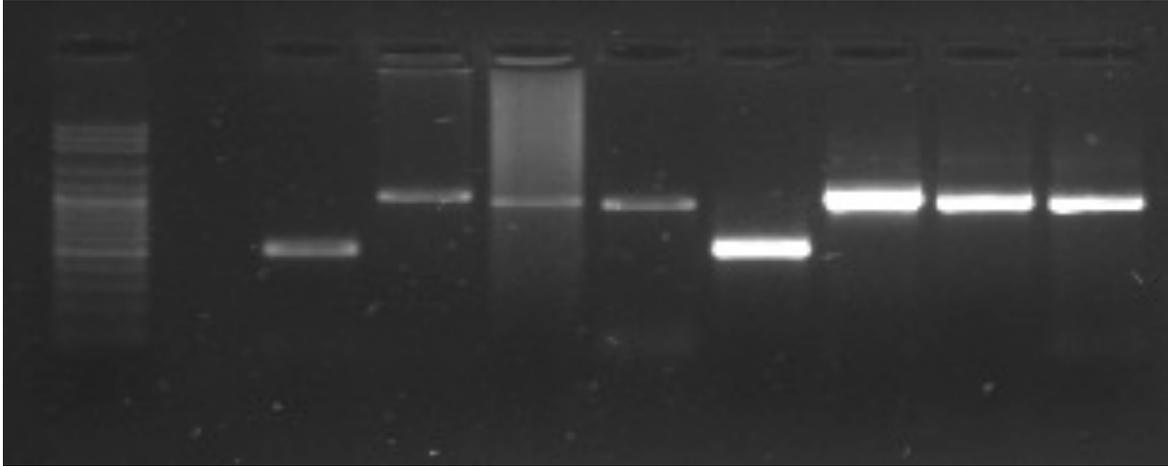


Figura 2. Homología regional de la región pol. Bootscan de la muestra MX-HIV-0422 que muestra un mapa de la secuencia amplificada en relación al genoma de HIV, la subtificación de la muestra y las regiones recombinantes con soporte estadístico mayor al 70% y menor al 70%. Se pueden identificar 4 eventos recombinatorios, con un soporte menor al 70%, los cuales son observados en la gráfica inferior. En azul se identifica las regiones que corresponden al subtipo B. En verde se observa la contribución del subtipo F (entre las 500 y 1000 bp), en rosa la del subtipo D (entre las 1000 y 2000 bp), y en rojo la del subtipo A (entre las 1500 y 2000 bp).

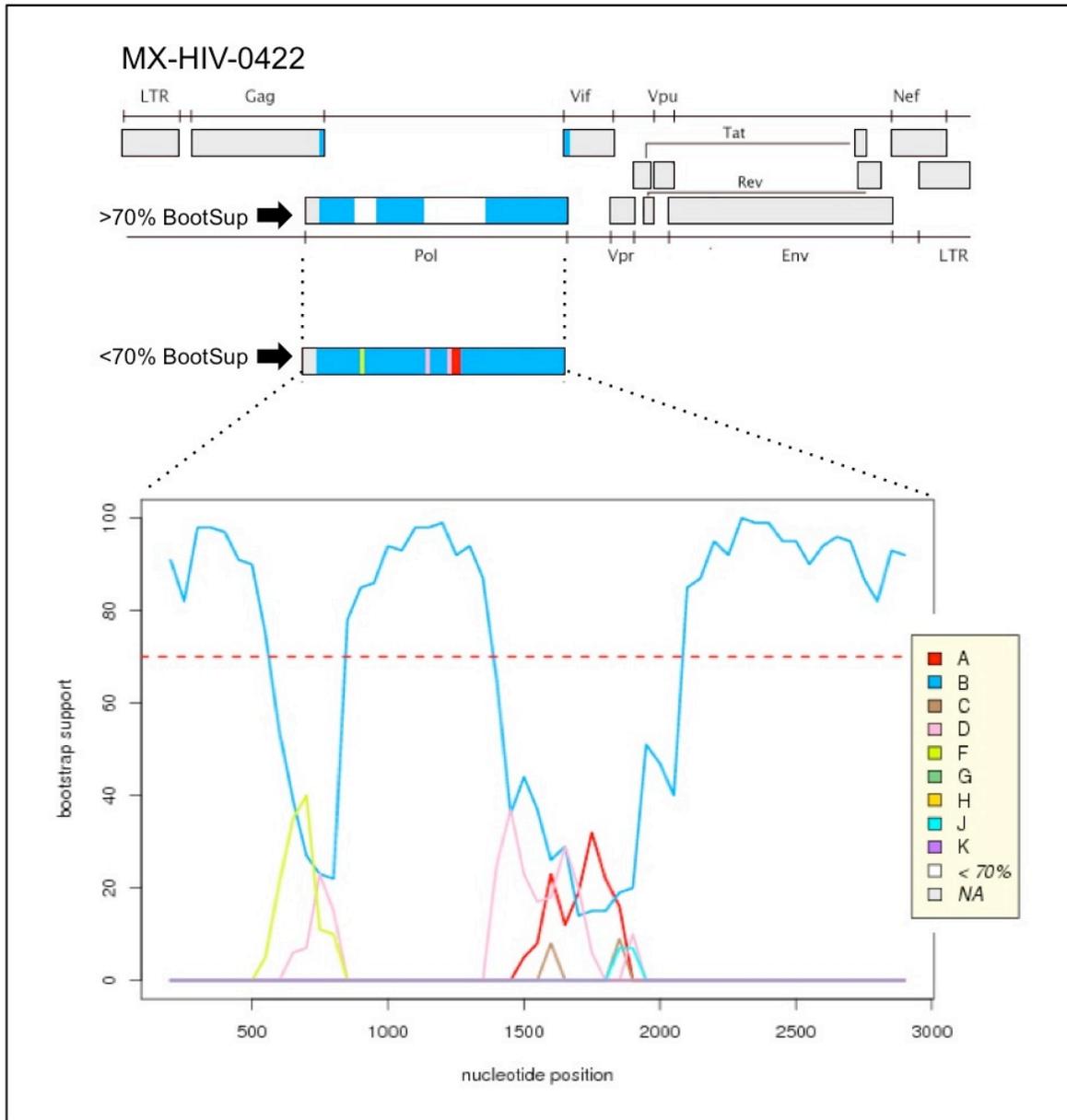


Figura 3. Estructura cristalográfica de la PR. La enzima PR (PDB: 3OXC) empleada para mapear las mutaciones menores G48R, A71T de MX-HIV-0327 y la mutación I84T de MX-HIV-0401 (en naranja). En amarillo se muestran las mutaciones adicionales mapeadas para ambas muestras. En las figuras inferiores se observan un detalle de mayor resolución de las interacciones y distancia en angstroms entre los residuos de G48 e I84 con respecto al inhibidor saquinavir (verde).

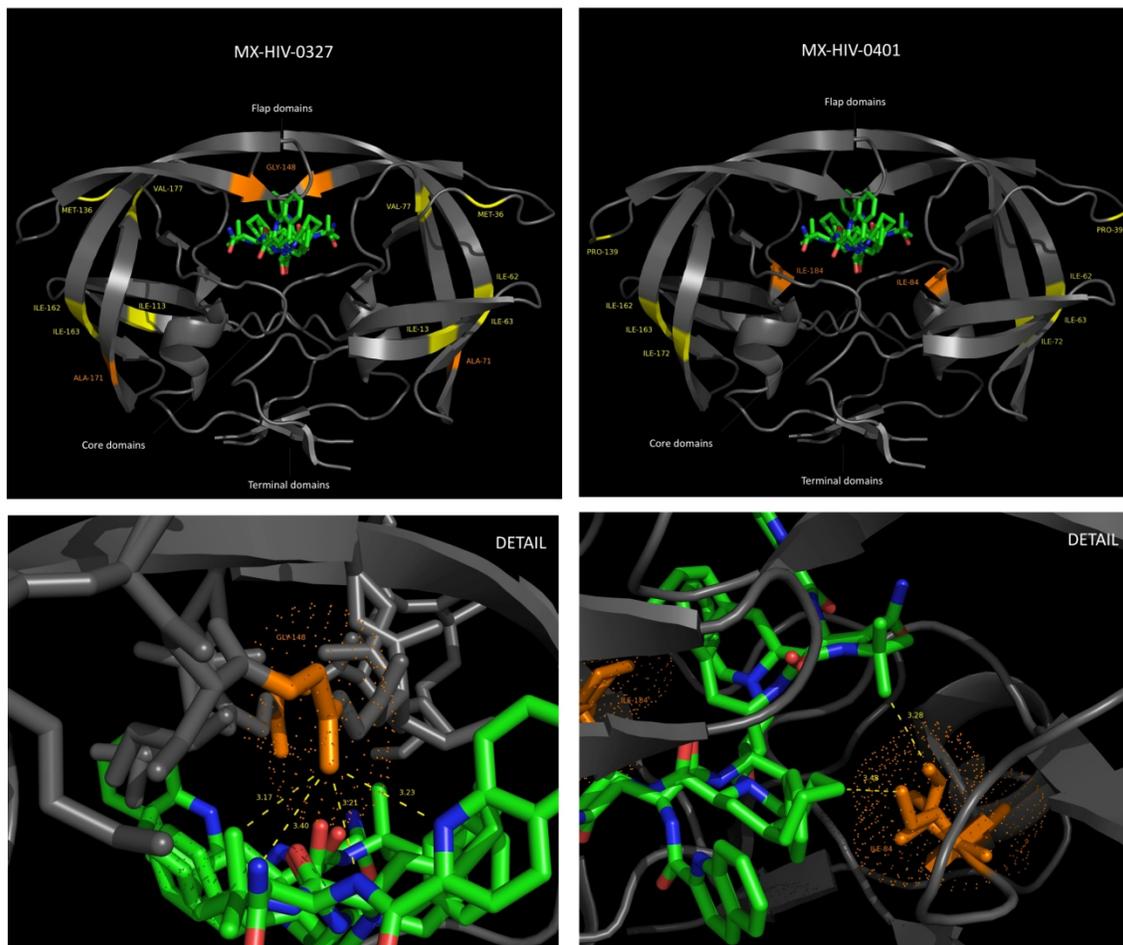


Figura 4. Estructura cristalográfica de la RT. Región p66 de la enzima RT (PDB: 2WON) donde se mapearon las mutaciones NRTI M41L y T215A de la muestra MX-HIV-0086 y la mutación NNRTI K103N de MX-HIV-0395 (en rojo). En amarillo se observan las mutaciones adicionales que fueron identificadas. El texto indica los subdominios de p66 (finger, palm, thumb, connection y RNase H). En verde se observa el NNRTI lervisirina (en el subdominio palm).

