ARTICULO DE REVISION

Biología del VIH y el desarrollo de resistencia a antirretrovirales.

Héctor R Rangel

Laboratorio de Virología Molecular
CMBC. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas,
Caracas-Venezuela

E-mail: hrangel@ivic.ve

RESUMEN

La infección por VIH y su enfermedad asociada el SIDA se han convertido en una de las principales causas de muerte a nivel mundial. Han sido muchos los esfuerzos para tratar de erradicar esta enfermedad mediante tratamientos terapéuticos sin haber sido posible alcanzar este objetivo. La selección de variantes resistentes así como el desarrollo de reservorios virales están entre las primeras causas de las fallas en las estrategias empleadas para el control de esta enfermedad. En este trabajo se presenta una visión general y resumida de la biología de este virus y como esta ha influenciado en el desarrollo de la resistencia a los fármacos antirretrovirales.

Palabras clave: VIH-1, terapia antirretroviral, falla terapéutica

ABSTRACT

Biology of HIV and development of antiretroviral resistance

The HIV infection and its disease associated, the AIDS, is in the top of the death causes around the world. Several efforts have been done to try to eradicate the AIDS disease, without a successful end. The selection of resistant viral variants and the viral reservoirs in the host are some of the first failure of the therapy regimens used against AIDS. In this work is presented a general and compact view of the biology of HIV and how it influence the resistance development to antirretroviral drugs.

Key words: VIH -1, antirretroviral therapy, therapy failure

INTRODUCCIÓN

Según el boletín del año 2008 del programa para el SIDA de las naciones unidas (UNAIDS), 33 millones de personas están infectadas con VIH-1, (1). La infección por VIH-1 y su enfermedad asociada, el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), es una de las principales causas de muerte a nivel mundial y la primera en el continente Africano. (2, 3)

En las Américas la epidemia se presenta con1,4 millones de personas infectadas en norte-América y 1,6 millones en América del Sur, con un 30% de estos viviendo en Brasil (4), en Venezuela los últimos datos manejados

por la OMS corresponden al año 2006, indicando alrededor de 110000 personas infectadas con el virus (5)
El VIH pertenece a la familia retroviridae genero lentiviridae. La partícula viral del VIH-1 es de forma esférica, con un diámetro aproximado de 100 nm, y posee una envoltura que está compuesta por una bicapa lipídica proveniente de la célula hospedera y que contiene principalmente la glicoproteína gp120/gp41 viral así como moléculas del complejo mayor de histo-compatibilidad, actina y ubiquitina provenientes de la célula. La gp120 es la proteína más externa y se encuentra unida en forma no covalente a la glicoproteína de transmembrana gp41. La gp120 tiene cinco regiones constantes (C1-C5) y cinco regiones variables (V1-V5). De estas últimas, la región variable V3 es la reconocida por el receptor primario CD4 en la superficie de la célula T hospedera (6).

La partícula viral también presenta una matriz formada por 2000 copias de la proteína p17 y un "core" o cápside formado por 2000 copias de la proteína p24, en donde se encuentra el genoma formado por dos cadenas de ARN separadas y no empalmadas. La cápside también contiene las enzimas virales esenciales: Proteasa (PR), Transcriptasa Reversa (TR) e Integrasa (IN), proteínas accesorias empaquetadas como Nef, Vif y Vpr y no empaquetadas como Rev, Tat y Vpu (7)

Organización del Genoma de HIV Cada hebra del ARN genómico viral tiene una longitud aproximada de 9,2 kilobases (kb), con la capacidad de expresar nueve genes: Tres que codifican para los precursores polipeptídicos de las proteínas virales estructurales y seis que codifican para una serie de proteínas adicionales, no estructurales, también conocidas como proteínas accesorias, que intervienen fundamentalmente en la regulación de la replicación y en la infectividad de la nueva progenie viral (8, 9,10)

Los genes virales que codifican para las proteínas estructurales son comunes a todos los retrovirus y se les denomina *gag, pol* y *env*. El producto de la transcripción del gen *gag* da origen a las proteínas de la matriz, cápside y nucleocápside, el producto del gen *pol* a las enzimas virales proteasa, transcriptasa reversa e integrasa y él correspondiente al gen *env* a las glicoproteínas de la envoltura viral. Las proteínas accesorias son producto de la transcripción de los genes *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpu* y *vpr* (8,11)

El ARN genómico viral también está delimitado en ambos extremos por unas secuencias nucleotídicas, no codificantes, que constituyen elementos claves de regulación para algunos eventos del ciclo replicativo y de la expresión genética. Estas secuencias son: La región U5 en su extremo 5', la región R ("Repeated", repetida) que se observa en ambos extremos, y la región U3 en el extremo 3'. Cuando ocurre la retrotranscripción del genoma viral, estas regiones se convierten en los LTR ("Long Terminal Repeats") característicos del ADN proviral. En el extremo 5', el LTR contiene esencialmente las secuencias promotoras y de iniciación para la transcripción del genoma viral. En el caso del LTR del extremo 3' se halla la señal de poliadenilación (12, 13)

Origen. Mediante estudios de evolución molecular se ha encontrado que la mayor similitud de VIH con otros lentivirus, corresponde a aquellos que infectan a diversas especies de primates africanos y se ha encontrado que las únicas especies que presentan infecciones naturales con virus

relacionados con VIH-1 y 2 son los chimpancés (*Pan troglodytes*) y los sooty mangabey (*Cerocebus atys*) respectivamente. La diversidad actual de HIV-1 está representada por tres grupos principales de virus existentes subdivididos a su vez en subtipos, en el caso del grupo M este comprende 9 subtipos los cuales se distribuyen a nivel mundial en mayor o menor grado dependiendo de la región que se considere, asi por ejemplo tenemos en que en Venezuela existe una circulación casi exclusiva del subtipo B mientras que en Brasil y otros países del cono sur circulan, además del subtipo B subtipos como el F y el C (4), adicionalmente a la existencia de subtipos "puros" se encuentran las formas recombinantes circulantes, que resultan de fenómenos de infección múltiple y recombinación geonómica en un mismo individuo. (14, 15).

La distribución geográfica de *Pan troglodites* y *Cerocebus atys* concuerda con las regiones donde se encuentran la mayoría de los casos de VIH-2 y donde se cree que se origino la pandemia de VIH-1.(16). Los estudios filogenéticos de VIH-2 y SIV aislados de sooty mangabey sugieren que los eventos zoonóticos, responsables de la transmisión al humano de este virus, han ocurrido en diferentes ocasiones (17,18)

Estudios recientes han demostrado la existencia, en chimpancés libres del área del Congo, de infección natural por SIVcpz, indicando que el grupo M actual de VIH-1 está relacionado con el linaje viral existente en *Pan troglodites trogrolodites* del sureste de Camerún; el grupo N, localizado solo en un grupo reducido de pacientes de Camerún correspondería a una introducción derivada de un segundo linaje de SIVcpz ptt; mientras que la fuente del posible origen del grupo O permanece aun por identificarse (16).

A diferencia del VIH-1, los virus que infectan a estos primates, denominados virus de inmunodeficiencia simia, no producen la enfermedad, sugiriendo que los eventos de infección han ocurrido desde hace mucho tiempo (19), mientras que el fenómeno de infección de humanos por el VIH parece ser un evento reciente.

Mecanismos de Variabilidad. La infección de una célula por parte de VIH-1 se inicia con la interacción, de alta afinidad, de la glicoproteína gp120 del virus y el receptor CD4 celular, el cual se encuentra presente en la superficie de un subgrupo de linfocitos T, monocitos y macrófagos (10) la consecuencia de esta primera interacción es un cambio conformacional de la gp120 que promueve la unión de la misma a un segundo correceptor, el cual dependiendo del tropismo viral puede ser el receptor de citoquinas celulares CCR5, el CXCR4 o ambos, este evento permite la exposición de la gp41, anteriormente oculta, lo que iniciará la formación de un poro que conducirá a la fusión total de las membranas viral y celular, con la subsiguiente liberación del ARN viral (20). Entre las proteínas incluidas en el virión se encuentra la transcriptasa reversa, la cual es una DNA polimerasa dependiente de ARN; una de las características de esta enzima, es su falta de capacidad correctora ("prof reading") (21, 22), esto trae como consecuencia que el proceso de transcripción reversa esté sujeto a errores al azar, introducidos por esta enzima. En general los retrovirus poseen entre 10^{-3} y 10^{-5} errores por ciclo de replicación (23, 24) lo que se traduce, en un genoma como el de VIH-1 (aprox 10 kb), en al menos un error por cada genoma viral retro-transcrito.

Una vez concluido el evento de transcripción reverversa, y probablemente de manera simultánea a este, se ensambla un complejo núcleo-proteico denominando complejo de preintegración, en el cual el genoma viral se encuentra protegido por una serie de proteínas, incluida la transcriptasa reversa. El complejo de preintegración es importado al núcleo a través, presumiblemente, de los poros nucleares y es integrado, por la enzima viral correspondiente, al genoma celular, donde persistirá durante toda la vida de la célula (25).

Los errores fijados en el genoma viral, durante el evento de transcripción reversa contribuyen a la varibilidad genética, y son potenciados por la alta tasa de replicación del VIH. Se estima una producción de 10^{10} nuevos viriones por día en un paciente con SIDA (26), si adicionalmente a estas consideraciones añadimos los eventos de recombinación, obtendremos una amplia distribución de virus diferentes.
Este conjunto de variantes virales constituye lo que se conoce como cuasiespecie, la cual representa la población viral susceptible a evolucionar, es decir la unidad evolutiva no esta representada por viriones individuales sino por la cuasiespecie como un todo. ((27, 28).

La cuasiespecie representa entonces, toda la diversidad viral presente en un individuo y la potencialidad de cambio en su composición ante una presión selectiva natural, como la impuesta por el sistema inmune o un fármaco antirretroviral. El cambio en la distribución de frecuencia de los genomas que constituyen la cuasiespecie en el tiempo representa un evento evolutivo y su consecuencia es la selección de un grupo nuevo de genomas en esta población (29), es importante hacer notar que la diversidad de la cuasiespecie se mantiene en mayor o menor grado, dependiendo de las características de la presión selectiva; es así como en regimenes de terapia antirretroviral altamente activa o terapia combinada se logra una supresión de la carga viral en sangre hasta niveles por debajo de las 50 copias/ml, lo que se traduce en un cuasiespecie viral muy reducida con menor probabilidad de cambio, debido a un efecto de cuello de botella, donde la cuasiespecie tiene menos potencial para evolucionar, pero no tanto como para llegar a un evento de extinción que conduzca a la erradicación de la infección.

El evento de infección le permite al virus apoderarse de la maquinaria celular con el fin de generar nuevos viriones, sin embargo, la célula no es un ente pasivo ante esta infección y posee elementos proteicos que tienden a contrarrestar la infección viral, entre estos destaca una proteína conocida como APOBEC3G, esta pertenece a una familia de citidin-deaminasas que promueven cambios en el RNA de guanina a uracilo en el genoma, esta proteína al actuar sobre el RNA de VIH-1 promueve la acumulación de adeninas en el mismo que pueden conducir a la generación de codones de parada y/o hipermutación en el genoma viral, que puede conducir a viriones no infectivos, sin embargo, el virus codifica para una proteína que promueve la degradación de APOBEC3G a través de ubiquitinación, esta proteína viral se conoce como Vif (viral infector factor de sus siglas en inglés) o factor de infectividad viral (30).

Persistencia y latencia. Para algunos virus la persistencia por largos periodos de tiempo en el hospedador, implica un proceso de latencia. La latencia podría definirse como un evento reversible en el cual la capacidad de replicación viral queda limitada y puede reactivarse dependiendo de las

condiciones del ambiente que rodea la célula y del tipo celular involucrado, este es el caso del virus del Herpes simple (herpes zoster), el cual infecta células sensoriales del sistema nervioso, estableciendo una infección latente mediante una expresión limitada de genes (31), esta infección es de por vida; pudiendo reactivarse en diferentes oportunidades; pero la producción viral en los periodos no activos es baja o nula; en este caso la latencia conlleva a la persistencia del virus.

En el caso de VIH la persistencia y la latencia no son complementarias en todos los casos, por ejemplo, durante el periodo asintomático donde el virus mantiene una activa replicación, pero la respuesta inmune mantiene una alta presión selectiva, se establece una infección de los linfocitos T de memoria que pueden conducir a latencia, generándose un reservorio viral, sin embargo, esta no representa importancia para el mantenimiento de la infección en este momento, debido a que la persistencia se debe a la selección de mutantes de escape que pueden evadir la presión inmune. Por otro lado, la latencia resulta de interés mayormente en pacientes sometidos a terapia antirretroviral ya que el provirus presente en estas células puede representar variantes que presenten resistencia a uno o varios fármacos antirretrovirales y puede reactivarse en cualquier momento, dando lugar a una falla terapéutica (32). En este sentido los reservorios virales juegan un papel importante en el mantenimiento de la infección haciendo virtualmente incurable la enfermedad asociada. En pacientes sometidos a terapia antirretroviral altamente activa, con un buen nivel de supresión de la replicación viral, se ha observado que al detener la terapia se produce un rebote o aumento en los niveles de carga viral a valores elevados, sin embargo, la fuente de origen de estos virus no esta en los linfocitos de sangre periférica (33- 36) ni en lo nódulos linfáticos (37), sino más bien de algunos otros órganos (38), quizás esto esté relacionado a una penetración diferencial de los medicamentos antirretrovirales en los diferentes tejidos del organismo, lo que se podría traducir en un gradiente de concentración con efectos diferenciales sobre la replicación viral y por ende con un diferente grado de presión selectiva obteniéndose así variantes virales según el órgano que estas infecten

.

Mutantes y resistencia a drogas en VIH. Como se mencionó anteriormente, la acumulación de errores debidos a la falta de capacidad correctora de la transcriptasa reversa, la alta tasa replicativa y eventos de recombinación generan una población viral con una amplia variabilidad conocida como cuasiespecie. Las poblaciones encontradas en los diferentes compartimientos del organismo pueden ser distintas dado que se encuentran sometidas a presiones selectivas variables, es así como pueden encontrarse diferencias entre el virus circulante en el plasma del paciente y el que se encuentra en los linfocitos de sangre periférica (LSP) (39).

En un paciente “naive”, es decir, que no ha sido sometido a un tratamiento antirretroviral previo, la cuasiespecie se encuentra dominada por el virus silvestre, sin embargo, y con una baja frecuencia en la población viral, se pueden encontrar variables que presentan mutaciones que les permitan replicarse en presencia de las dosis terapéuticas de los antirretrovirales o incluso mas altas. De esta manera en un paciente sometido a terapia antirretroviral se produce, inicialmente, una disminución drástica de toda la población viral reduciéndose así la cuasiespecie viral, quedando esta constituida por aquellas variantes que muestren una baja sensibilidad al tratamiento al cual está sometido el individuo y una escasa representación

de las otras variables (Figura 1) la consecuencia de este fenómeno es la selección de variantes resistentes, a uno o varios fármacos, que aumentaran en frecuencia en la población viral lo que se traducirá en un aumento de la carga viral del paciente.

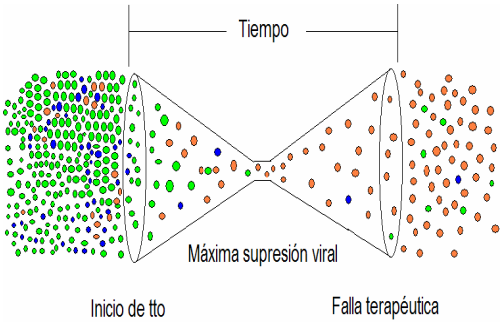

Figura 1. Esquema de una población viral constituida por tres variantes, verde virus silvestre, azul virus mutantes sensibles y naranja virus con mutaciones de resistencia. El doble cono representa el tratamiento antirretroviral y el largo del mismo representaría el tiempo de tratamiento. El tratamiento antirretroviral representa la fuerza selectiva que actúa sobre la población viral, la cual se acentúa en el tiempo hasta alcanzar una máxima supresión viral y en el tiempo el efecto inhibitorio del tratamiento se pierde debido a la selección de variantes resistentes.

Las mutaciones asociadas a resistencia a los fármacos antirretrovirales, en VIH-1, se dividen en mutaciones primarias y secundarias. Las mutaciones primarias son aquellas que confieren, de manera directa, el fenotipo de resistencia al virus que las posee, estas mutaciones a su vez suelen estar asociadas a disminuciones de la capacidad que tiene el virus para replicarse, comparados con el virus silvestre, por otro lado las mutaciones secundarias o compensatorias, no alteran el patrón de resistencia por si solas, pero al presentarse en combinación con algunas mutaciones primarias restauran la capacidad replicativa del virus a niveles comparables con el silvestre (40).

Mediante pruebas moleculares se puede realizar la amplificación de las regiones del genoma de VIH-1 que codifican para aquellas proteínas que son blancos terapéuticos y mediante análisis de secuencias de estas regiones genómicas se puede predecir el patrón de resistencia que posee el virus analizado, pudiendo de esta manera adaptar el tratamiento antirretroviral según la susceptibilidad del virus. En la Tabla 1 se muestra la relación entre la presencia de algunas mutaciones en diferentes blancos terapéuticos y el nivel de resistencia que estas generan.

Tabla 1. Correlación entre mutaciones en el genoma de VIH-1, los fármacos afectados y los niveles de resistencia que la presencia de dichas mutaciones generan ante la aplicación de dichos fármacos.

Gen	Mutación	Fármaco afectado	Nivel de resistencia
PR	D 30 N	Nelfinavir	Alta
PR	V 32 I	Darunavir	Baja
PR	I 54 V/L	Darunavir, Nelfinavir, saquinavir, tripanavir, fosamprenavir	Baja a Intermedia
PR	I 84 V	Atazanavir, fosamprenavir, Indinavir, Nelfinavir, Saquinavir	Intermedia
PR	L 90 M	Nelfinavir, Atazanavir, Indinavir, Saquinavir	Alta a nelfinavir e intermedia al resto
TR(INTR)	M 41 L	Zidovudina, Estavudina	Baja
RT(INTR)	L 74 I	Didanosina	Alta
RT(INTR)	M 184 V	Lamivudina, Emtricitabina	Alta
RT(INTR)	T 215 F	Zidovudina, Estavudina	Intermedia
RT(INNTR)	A 98 G/S	Delavirina, Nevirapina	Potencial
RT(INNTR)	K103 N/S	Delavirina, Nevirapina, Efavirenz	Alta
RT(INNTR)	G 190 A	Efavirenz, Nevirapina	Intermedia a Alta
RT(INNTR)	P 225 H	Delavirina, Nevirapina, Efavirenz, Etravirina	Baja a Intermedia
Env	G 36 D/E	Fuzeon	Intermedia
Env	V 38 E/A	Fuzeon	Intermedia
Env	Q 40 H	Fuzeon	Intermedia
Int	T 66 I	Elvitegravir	Intermedia
Int	92 E Q	Reltegravir/Elvitegravir	Intermedia
Int	F 121 Y	Reltegravir/Elvitegravir	Intermedia
Int	Q 148 HRK	Reltegravir/Elvitegravir	Intermedia

PR: proteasa, **TR**: transcriptasa reversa, **INTR**: inhibidores tipo nucleósido de la transcriptasa reversa. I**NNTR**: inhibidores de tipo no nucleósido de la transcriptasa reversa, **Env:** envoltura, **Int:** integrasa

En la actualidad existen sistemas de secuenciación automatizados que permiten detectar la presencia de mutaciones asociadas a resistencia en los virus circulantes en el paciente. Estos sistemas resultan bastante eficientes, pero aun no cubren regiones diferentes a los genes de transcriptasa reversa y proteasa, quedando un vacío en la expansión del diagnóstico molecular de mutaciones asociadas a los nuevos tratamientos existentes. En Venezuela existen estos sistemas automatizados pero su implementación resulta sumamente costosa y se aplica en base a criterios de prioridad dependiendo del estado del paciente.

La principal barrera del éxito de la terapia antirretroviral combinada ha sido la selección de variantes resistentes a los fármacos empleados, las razones que contribuyen a este fenómeno están relacionadas a la propia biología del virus y a factores asociados al hospedador, los factores asociados al virus, que contribuyen a la variabilidad del mismo y por ende al selección de variantes resistentes ya han sido discutidos, por lo que describiremos aquellos asociados al hospedador, entre estos tenemos: a) respuesta inmune variable, b) expresión anormal de enzimas relacionadas con la activación de los fármacos antirretrovirales (41), c) presencia y activación de bombas de membrana que mantengan bajas concentraciones de los fármacos antirretrovirales dentro de la célula, de manera que el virus se encuentre en presencia de concentraciones suboptimas de los mismos y por ende el ciclo de replicación no se ve afectado (42), c) absorción variable a nivel intestinal de los fármacos antirretrovirales, d) catabolismo y excreción variable de los metabolitos activos (43), e) la combinación en mayor o menor grado de todos estos factores representa la principal causa de variaciones en las concentraciones plasmáticas de los fármacos antirretrovirales entre diversos pacientes (44).

La corrección de estos factores resulta complicada dado el escaso conocimiento que existe de su patofisiología y lo complicado de su diagnóstico, por lo que no resulta práctica su correlación con el desarrollo y selección de resistencia. Sin embargo, existe un factor asociado al hospedador que ha sido bien caracterizado y puede ser corregido, mediante educación y cambios de comportamiento por parte del paciente, este factor es conocido como adherencia y mide la toma correcta de las dosis de los fármacos antirretrovirales recomendadas por el médico tratante; se conoce que la adherencia afecta directamente la capacidad del virus para replicarse, determinando el éxito o falla del régimen de terapia (45). Rangel y col (46), encontraron que de una cohorte de pacientes venezolanos, el 50% de los mismos mostraron resistencia a los tres tipos de fármacos considerados, en un periodo tan corto como 5 años después de su diagnóstico; esta cohorte estuvo conformada principalmente de pacientes con adherencia no óptima.

¿Existe una cura para la infección por VIH-1?A la fecha, ninguno de los fármacos desarrollados ha sido capaz de erradicar completamente la infección por VIH. La introducción de la terapia antirretroviral altamente activa (HAART por sus siglas en ingles) o terapia combinada se ha traducido en una mejora sustancial para la calidad de vida del paciente que vive con VIH. Sin embargo, no es la cura de la enfermedad, quienes inician este tratamiento deben tomarlo de por vida y de manera constante y correcta (adherencia al tratamiento) para mantener una carga viral en niveles bajos, inclusive por debajo de los limites de detección de los métodos existentes

para detección rutinaria de la carga viral. La disponibilidad de los fármacos existentes es finita y es ampliamente superada por la capacidad de mutación del virus. Los fármacos de mas reciente introducción al mercado como lo son los inhibidores de fusión y de integración ya han generado patrones de resistencia en ensayos in vitro y es solo cuestión de tiempo observar patrones equivalentes in vivo, otros blancos posibles en desarrollo deben involucrar, además de proteínas virales, también proteínas celulares para tratar de aumentar la respuesta celular en contra del virus, en este sentido debe concretarse la unión entre los laboratorios académicos y los pertenecientes a las grandes compañías con el fin de aunar esfuerzos de investigación básica y aplicada para mejorar las estrategias terapéuticas.

El desarrollo de candidatos vacunales contra VIH-1 no ha rendido frutos, a la fecha todos los ensayos evaluados han fracasado y probablemente pasen muchos años antes de que se logre desarrollar una vacuna con capacidad de frenar la expansión de la enfermedad, debido a esto se deben dirigir los esfuerzos al desarrollo de nuevos fármacos sin dejar de un lado la educación de la población que resultará en la mejor prevención posible ante esta enfermedad.

Conclusiones. Desde la aparición del síndrome de inmunodeficiencia adquirida, a principios de los años 80 hasta la fecha han ocurrido más de 20 millones de muertes relacionadas con esta enfermedad. La introducción de la terapia antirretroviral altamente activa ha significado uno de los mejores logros en la lucha contra esta enfermedad, sin llegar a ser la cura definitiva, ha permitido una mejora en la calidad de vida del paciente que vive con VIH, en la actualidad hay pacientes que ya han entrado en su segunda década bajo tratamiento antirretroviral, gracias al mantenimiento de una buena adherencia.

La principal causa de la falla terapéutica esta relacionada con la selección de variantes resistentes y estas a su vez están con las características propias del virus como a factores del hospedador, siendo la adherencia uno de los que mejor se ha caracterizado y relacionado de manera directa con la falla terapéutica

El reto de los reservorios virales es la principal causa del fracaso en la erradicación definitiva de la infección y su manejo está lejos de poder ser controlado, en parte debido a los diversos tejidos que pueden en un momento dado servir como reservorios para el virus. En este sentido es claro que la cura definitiva de esta enfermedad esta lejos de ser alcanzada siendo la prevención la única herramienta efectiva contra la misma.

***Agradecimientos**: Parte de la investigación reseñada en este trabajo ha sido parcialmente financiado por fondos IVIC, proyecto 495 y Fonacit proyecto de grupo G-2005000304*

BIBLIOGRAFIA

1. UNAIDS/WHO (2008) www.unaids.org/en/KnowledgeCentre/HIVData/GlobalReport/2008/2008_Global_report.asp
2. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA y Kubi J. AIDS and Other immunodeficiencies. Cap 19. En: Immunology. 4ta edición. W. H. Freeman and Co. Massachusetts 2000. p 467-494.
3. Gayle, H. y Hill, G. Global impact of Human Immunodeficiency Virus and AIDS. Clin. Microbiol. Rev. 2001; 14(2): 327-335.

4. Rangel HR, Garzaro D, Pujol FH. Diversidad genética del virus de inmunodeficiencia humana en las ameritas, con énfasis en la epidemia venezolana. Interciencia. 2009a; 34(3): 163-169

5. UNAIDS/WHO. (2006). http://www.unaids.org/en/KnowledgeCentre/HIVData/GlobalReport/2006/default.asp

6. Arthur LO, Bess JW Jr, Sowder RC 2nd, Benveniste RE, Mann DL, Chermann JC, Henderson LE. Cellular proteins bound to immunodeficiency virus: Implications for pathogenesis and vaccines. Science 1992; 258: 1935-1938.

7. Turner BG y Summers M F. Structural virology of HIV. J. Mol. Biol. 1999; 285: 1-32.

8. Cullen BR. Human immunodeficiency virus as a prototypic complex Retrovirus. J. Virol. 1991; 65 (3): 1053-1056.

9. Emerman M. y Malim MH. HIV-1 regulatory/accesory genes: Keys to unraveling viral and host cell biology. Science. 1998; 280: 1880-1884.

10. Wang WK, Chen MY, Chuang CY. y Jeang KT, Huang LM. Molecular biology of human immunodeficiency virus type 1. J. Microbiol. Immunol. Infect. 2000; 33: 131-140

11. Goff, S.P. Retroviridae: The Retroviruses and their replication. En: Knipe, D.M. y Howley, P.M. (Ed.). Fields Virology Cap 57. 4ta edición. Vol 2. Lippincot Williams & Wilkins. Philadelphia 2001. p: 1871-1939.

12. Joshi S and Joshi R L. Molecular biology of human immunodeficiency virus type 1. Tranfus. Sci. 1996; 17(3): 351-378.

13. Starcich B, Ratner L, Josephs SF. y col. Characterization of long terminal repeat sequences of HTLV-III. Science.1985; 227(4686): 538-540.

14. Freed, E. O. and Martin, M. A. (2002). En: Fields, B.N. *et al*. (Ed.) *Fields Virology*. Sección 2: Specific Virus Familias. Cap 59: HIV and their replication. 4ta edición. Lippincot-Raven. Philadelphia. Versión digital.

15. Kanki PJ, Hamel DJ, Sankale JL y col. Human immunodeficiency virus type 1 subtypes differ in disease progression. J. Infect. Dis. 1999; 179: 68-73.

16. Keele BF, Van Heuverswyn F, Li Y, Bailes E, Takehisa J, Santiago ML, Bibollet-Ruche F, Chen Y, Wain LV, Liegeois F, Loul S, Ngole EM, Bienvenue Y, Delaporte E, Brookfield JF, Sharp PM, Shaw GM, Peeters M, Hahn BH. Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. Science. 2006; 313(5786):523-6.

17. Gao F, Yue L, White AT, Pappas PG, Barchue J, Hanson AP, Greene BM, Sharp PM, Shaw GM, Hahn BH. Human infection by genetically diverse SIVSM-related HIV-2 in west Africa. Nature. 1992; 358(6386):495-9.

18. Chen Z., A. Luckay, D. L. Sodora, P. Telfer, P. Reed, A. Gettie, J. M. Kanu, R. F. Shadek, J. A. Yee, D. D. Ho, L. Zhang & P. A. Marx: Human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) seroprevalence and characterization of a distinct HIV-2 genetic subtype from the natural range of simian immunodeficiency virus-infected sooty mangabeys. J. Virol. 1997; 71, 3953-3960

19. Hahn BH, Shaw GM, De Cock KM, Sharp PM. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. Science. 2000; 287(5453):607-14

20. Weis CD. HIV-1 gp41: mediator of fusion and target for inhibition. AIDS Rev. 2003; 5: 214-212

21. Preston BD, Poiesz BJ., Loeb LA. Fidelity of HIV-l Reverse Transcriptase. Science 1988; 242: 1168-1171

22. O'Neil PK, Sun G, Yu H, Ron Y, Dougherty JP, Preston BD. Mutational analysis of HIV-1 long terminal repeats to explore the relative contribution of reverse transcriptase and RNA polymerase II to viral mutagenesis. J. Biol Chem 2002; 277(41):38953-38061

23. Batschelet E, Domingo E, y Weissmann 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.

24. Domingo, E., and J. J. Holland. Mutation rates and rapid evolution of RNA viruses, *In* S. S. Morse (ed.), Evolutionary biology of viruses. Raven Press, New York, N.Y. 1994. p 161-184

25. Ferguson MR, Rojo DR, von Lindern JJ, O'Brien WA. HIV-1 replication cycle. Clin Lab Med. 2002; 22(3):611-35.

26. Taylor MS, Sobieszczyk ME, McCutchan FE, Hammer SM. The challenge of HIV-1 subtype diversity. N Eng J Med 2008; 358:1590-1602.

27. Domingo E, Holland J. RNA virus mutations and fitness for survival. Annu Rev Microbiol 1997; 51:151-78.

28. Eigen M. Viral quasispecies. Sci Am 1993; 269:42-49.

29. Holmes EC and Moya A. Is the quasispecie concept relevant to RNA viruses? J Virol. 2002; 76: 460-462

30. Schrofelbauer B, Yu Q, and Landau NR. New Insights into the role of Vif in HIV replication. AIDS reviews 2004; 6: 34-39

31. Daheshia M, Feldman LT, Rouse BT. Herpes simplex virus latency and the immune response. Curr. Opin. Microbiol. 1998; 1(4):430-5.

32. Persaud D, Zhou Y, Siliciano JM, Siliciano RF. Latency in Human immunodeficency virus type 1 Infection: No easy answer. 2003; J. Virol 77: 1659-1665

33. Chun TW, Davey RT Jr, Ostrowski M, Shawn Justement J, Engel D, Mullins JI, Fauci AS. Relationship between pre-existing viral reservoirs and the re-emergence of plasma viremia after discontinuation of highly active anti-retroviral therapy. Nat Med. 2000; 6:757-761.

34. Dybul M, Daucher M, Jensen MA, Hallahan CW, Chun TW, Belson M, Hidalgo B, Nickle DC, Yoder C, Metcalf JA, Davey RT, Ehler L, Kress-Rock D, Nies-Kraske E, Liu S, Mullins JI, Fauci AS. Genetic characterization of rebounding human immunodeficiency virus type 1 in plasma during multiple interruptions of highly active antiretroviral therapy. J. Virol. 2003; 77:3229-3237.

35. Pierson T, McArthur J, Siliciano RF. Reservoirs for HIV-1: mechanisms for viral persistence in the presence of antiviral immune responses and antiretroviral therapy. Annu Rev Immunol. 2000; 18:665-708

36. Kijak GH, Simon V, Balfe P, Vanderhoeven J, Pampuro SE, Zala C, Ochoa C, Cahn P, Markowitz M, Salomon H: Origin of human immunodeficiency virus type 1 quasispecies emerging after antiretroviral treatment interruption in patients with therapeutic failure. J. Virol. 2002; 76:7000-7009.

37. Malaspina A, Moir S, Nickle DC, Donoghue ET, Ogwaro KM, Ehler LA, Liu S, Mican JA, Dybul M, Chun TW et al.: Human immunodeficiency virus type 1 bound to B Cells: Relationship to virus replicating in CD4(R) T cells and circulating in plasma. J. Virol. 2002; 76:8855-8863.

38. Nickle DC, Shriner D, Mittler JE, Frenkel LM and Mullins JI. Importance and detection of virus reservoirs and compartments of HIV infection Cur. Opinion in Microbiol. 2003; 6:410-416

39. Rangel HR, Garzaro D, Fabro R, Fernández D, Gutiérrez CR, Martínez N, and Pujol FH. Comparative analysis of polymorphisms in the HIV-1 Pol gene in the proviral DNA and viral RNA in the peripheral compartment. Aids Res. Human Retroviruses 2009b; (en prensa)

40. Weber J, Rangel HR, Chakraborty B, Marotta ML, Valdez H, Fransen K, Florence E, Connick E, Smith KY, Colebunders RL, Landay A, Kuritzkes D, Lederman M, Vanham G y Quiñones-Mateu ME. Role of baseline *pol* genotype in human immunodeficiency virus type 1 fitness evolution. J of AIDS 2003; 33 (4):448-460

41. Antonelli G, Turriziani O, Verri A, Narciso P, Ferri F, D'Offizi G, Dianzani F. Long-term exposure to zidovudine affects in vitro and in vivo the efficiency of phosphorylation of thymidine kinase. AIDS Res. Hum. Retroviruses 1996; 12: 223–228.

42. Schuetz JD, Connelly MC, Sun D, et al. MRP4: a previously unidentified factor in resistance to nucleoside-based antiviral drugs. Nat Med 1999; 5: 1048–51.

43. Back D, Gatti G, Fletcher C, Garaffo R, Haubrich R, Hoetelmans R, Kurowski M, Luber A, Merry C, Perno CF. Therapeutic drug monitoring in HIV infection: current status and future directions. AIDS 2002; 16:S5–S37.

44. Khoo SH, Gibbons SE, Back DJ. Therapeutic drug monitoring as a tool in treating HIV infection. AIDS 2001; 15:171–81.

45. Descamps D, Flandre P, Calvez V, Peytavin G, Meiffredy V, Collin G, Delaugerre C, Robert-Delmas S, Bazin B, Aboulker JP, Pialoux G, Raffi F, Brun-Vézinet F. Mechanisms of virologic failure in previously untreated HIV-infected patients from a trial of induction-maintenance therapy. Trilege (Agence Nationale de Recherches sur le SIDA 072). JAMA 2000; 283:205–11.

46. Rangel HR, Garzaro D, Torres JR, Castro J, Suarez JA, Naranjo L, Ossenkopp J, Martinez N, Resistance Committee Group, Gutierrez CR, y Pujol FH. Antiretroviral drug resistance prevalence in Venezuela. Mem. Instituto Oswaldo Cruz 2009c; 104(3): 522-525