

AGENTS ANTIRETROVIRALS CONTRA EL VIH

CRISTINA GIL I JOSÉ M. GATELL

Unitat de Recerca de la Sida, Servei de Microbiologia i Servei de Malalties Infeccioses, Hospital Clínic.

Adreça per a la correspondència: Cristina Gil. Unitat de Recerca de la Sida, Servei de Microbiologia i Servei de Malalties Infeccioses, Hospital Clínic. Villarroel, 170. 08036 Barcelona. Adreça electrònica: *cgil@clinic.ub.es*.

RESUM

La sida ha estat una de les malalties que va adquirir més embranzida a la darrerria del segle passat. La recerca en el tractament d'aquesta malaltia ha conduït a la consecució de dinou substàncies capaces de combatre-la. Aquestes substàncies es poden catalogar en tres grups principals: *a*) inhibidors de la transcriptasa inversa, *b*) inhibidors de la proteasa i *c*) inhibidors de l'entrada del virus.

Paraules clau: sida, antiretrovirals, resistència.

SUMMARY

AIDS has been one of the most important illnesses in the latest years of the last century. Research to find treatments has resulted in nineteen substances able to act against it. Those substances might be classified in three main categories: 1) inhibitors of reverse transcriptase, 2) inhibitors of protease and 3) inhibitors of virus-entrance.

Keywords: AIDS, antiretrovirals, resistance.

INTRODUCCIÓ

La síndrome d'immunodeficiència adquirida (sida) és causada pel virus de la immunodeficiència humana (VIH), aïllat per primera vegada el 1983. El VIH pertany a la família dels retrovirus i és el responsable d'una de les majors pandèmies del segle xx. La seva principal cèl·lula hoste és el limfòcit T CD4+, el qual és essencial per activar una resposta immunitària efectiva contra qualsevol infecció.

Actualment es disposa de dinou medicaments antiretrovirals contra el VIH, que poden classificar-se en tres famílies segons l'etapa del cicle vital del virus en què actuen: *a*) inhibidors de la transcriptasa inversa, *b*) inhibidors de la proteasa i *c*) inhibidors de l'entrada del virus (vegeu la taula 1). Les característiques bioquímiques i de biodisponibilitat han estat recentment revisades per Clercq (2004).

L'objectiu principal del tractament antire-

TAULA 1. Característiques dels antiretrovirals contra el VIH

Família	Nom genèric	Especialitat registrada	Activitat	Mecanisme d'acció
ITIAN ^a				Competeixen amb els dNTP naturals i causen la terminació de la cadena de DNA víric.
Timidina	Zidovudina (ZDV)	Retrovir	VIH (1 i 2)	
Adenosina	Didanosina (DDI)	Videx	VIH (1 i 2)	
Citosina	Zalcitabina (DDC)	Hivid	VIH (1 i 2)	
Timidina	Estavudina (D4T)	Zerit	VIH (1 i 2)	
Citosina	Lamivudina (3TC)	Epivir	VIH (1 i 2) i VHB	
Guanina	Abacavir (ABC)	Ziagen	VIH (1 i 2)	
Citosina	Emtricitabina (FTC)	Emtriva	VIH (1 i 2) i VHB	
Adenosina	Tenofovir (TNF)	Viread	VIH (1 i 2) i VHB	
ITINAN ^b				S'uneixen a l'enzim TI i bloquegen la síntesi de DNA víric.
	Nevirapina (NVP)	Viramune	VIH-1	
	Delavirdina (DLV)	Rescriptor	VIH-1	
	Efavirenz (EFV)	Sustiva	VIH-1	
IP ^c				S'uneixen a la proteasa vírica i impedeixen la proteòlisi de les poliproteïnes precursors de les proteïnes estructurals i funcionals del virus.
	Saquinavir (SQV)	Invirase/Fortavase	VIH (1 i 2)	
	Ritonavir (RTV)	Norvir	VIH (1 i 2)	
	Indinavir (IDV)	Crixivan	VIH (1 i 2)	
	Nelfinavir (NFV)	Viracept	VIH (1 i 2)	
	Amprenavir (APV)	Argenerase	VIH (1 i 2)	
	Lopinavir (LPV)	Kaletra	VIH (1 i 2)	
	Atazanavir (ATV)	Reyataz	VIH (1 i 2)	
I. Entrada ^d				Inhibeix l'entrada del virus unint-se a la regió HR1 de la GP41 i no permet la interacció entre HR1 i HR2.
	Emfurtide	T-20/Fucon	VIH-1	

^a Inhibidors de la transcriptasa inversa anàlegs als nucleòsids o nucleòtid (ITIAN).

^b Inhibidors de la transcriptasa inversa no anàlegs als nucleòsids (ITINAN).

^c Inhibidors de la proteasa (IP).

^d Inhibidors de l'entrada o fusió.

troviral contra el VIH és obtenir la màxima supressió de la replicació vírica i aconseguir el restabliment del sistema immunitari, per la qual cosa cal utilitzar tractaments altament agressius (HAART), consistents en la combinació d'almenys tres antiretrovirals

d'almenys dues famílies. Amb aquest tipus de tractaments s'ha aconseguit mantenir la virèmia controlada per sota del límit de detecció de la càrrega vírica amb tècniques de PCR ultrasensibles (actualment, vint còpies de RNA/ml) i obtenir la recuperació del nom-

bre de limfòcits T CD4+ cooperadors específics contra VIH en la majoria dels pacients tractats (Gulick *et al.*, 1997; Palella *et al.*, 1998; Yeni *et al.*, 2004). Tanmateix, tot i els avanços tècnics en el tractament antiretroviral, encara no s'ha aconseguit eradicar el virus. L'escassa penetració dels antiretrovirals en determinats santuaris com el sistema nerviós central o en limfòcits T CD4+ de memòria o cèl·lules seminals permet que la replicació del virus continuï a molt baix nivell (Wong *et al.*, 1997; Martínez-Picado *et al.*, 2000).

Els tractaments efectuats amb els antiretrovirals en règim de monoteràpia amb un sol inhibidor o de teràpia combinada durant períodes de temps prolongats poden traduir-se en fracàs víric en alguns pacients. Existeix una correlació molt important entre el fracàs víric i l'aparició de virus resistents als inhibidors, encara que no es pot descartar la influència d'altres factors, com per exemple factors cel·lulars o la no-adherència al tractament (Turriziani *et al.*, 2000; Turriziani *et al.*, 2002).

MECANISMES D'ACCIÓ DELS ANTIRETROVIRALS

Les diferents famílies d'antiretrovirals intervenen en diferents etapes del cicle vital del virus. El VIH infecta bàsicament les cèl·lules que contenen la molècula CD4, receptora principal, que permet l'entrada del virus. Una vegada les proteïnes de l'embolcall del virus (gp41 i gp120) es posen en contacte amb la molècula CD4 i una de les molècules coreceptores presents en la membrana cel·lular (principalment, CXCR4, CCR5 o DC-SIGN), es produeixen canvis conformacionals que permeten l'entrada del genoma víric a l'interior de la cèl·lula. En aquest punt del cicle actuen els inhibidors de l'entrada. El genoma del virus està constituït per dues cadenes idèntiques de RNA de 9,6 kb. A l'interior de la cèl·lula, l'enzim transcriptasa inversa del virus (TI) sintetitza una doble cadena de DNA a partir de la

transcripció inversa d'una de les cadenes de RNA víric amb la utilització com a substrat dels nucleòtids endògens de la cèl·lula (dNTP). En aquesta etapa actuen els diferents inhibidors de la TI mimetitzant els nucleòsids endògens. A continuació, la doble cadena de DNA s'integra al genoma cel·lular i s'inicia la transcripció i traducció del genoma víric en poliproteïnes precursors. Aquestes poliproteïnes contenen dianes peptídiques específiques que són reconegudes per l'enzim aspartilproteasa específic del virus. L'acció d'aquesta proteasa té com a resultat la formació de les proteïnes funcionals i estructurals que formaran els nous virions. En aquesta etapa del cicle actuen els inhibidors de la proteasa.

Inhibidors de la transcriptasa inversa

La TI és un enzim amb activitat polimerasa dependent de DNA i de RNA i amb activitat RNAasa. Aquestes funcions són essencials per polimeritzar una cadena doble de DNA amb la informació completa del virus. La TI està formada per dues subunitats heterodímeres: una subunitat (p66) formada per cinc-cents seixanta aminoàcids (aa) que contenen el centre actiu de l'enzim polimerasa i un domini amb activitat RNAasa H i una segona subunitat (p51) que comprèn els primers quatre-cents quaranta aa de la p66. La molècula està formada per nou dominis que es disposen formant una estructura conformacional semblant a una mà (Kohlstaedt *et al.*, 1992). Els inhibidors de la TI actuen durant la retrotranscripció de RNA a DNA i poden classificar-se en dos grups en funció de les seves característiques i mecanismes d'acció: *a)* als anàlegs als nucleòsids i nucleòtids i *b)* els no anàlegs als nucleòsids.

Inhibidors de la transcriptasa inversa anàlegs als nucleòsids o nucleòtid (ITIAN):

Els ITIAN foren els primers antiretrovirals que s'introduïren en el tractament de la infecció per VIH. Al principi s'utilitzaren com

a monoteràpia i més tard en combinació. Es tracta de nucleòsids sintètics anàlegs als nucleòsids naturals de les pirimidines i les purines però als quals els manquen el grup 3'OH de la desoxiribosa necessària per a la incorporació de nous nucleòtids. La seva eficàcia depèn de la incorporació de tres grups fosfat mitjançant la fosforilació seqüencial del nucleòsid sintètic a trifosfat que es realitza a l'interior de les cèl·lules (ITIAN, ITIAN-MP, ITIAN-DP, ITIAN-TP). Aquesta fosforilació es du a terme amb enzims cinases cel·lulars durant l'activació cel·lular amb cinètiques variables per als diferents anàlegs (Gao *et al.*, 1994b; Kewn *et al.*, 1997). Els ITIAN-TP són acceptats com a substrat per la TI vírica i inhibeixen la retrotranscripció de l'RNA víric a DNA mitjançant dos mecanismes: *a)* competint amb els NTP naturals pel lloc d'unió de la TI i incorporant-se a la cadena de DNA i *b)* actuant com a acabadors durant la síntesi de DNA províric. Quan la TI del virus introdueix l'ITIAN-TP al DNA no permet la incorporació de qualsevol altre nucleòtid i evita l'elongació de la cadena.

El grup d'ITIAN el componen la zidovudina (ZDV), la didanosina (DDI), l'estavudina (D4T), la zalzatabina (DDC), la lamivudina (3TC), l'abacavir (ABC) i l'emtricitabina (FTC), que actuen inhibint la TI del VIH-1 i el VIH-2. El tenofovir (TNF) és l'únic ITIAN anàleg als nucleòtids utilitzat en el tractament antiretroviral. Es tracta d'un nou inhibidor anàleg del d'ATP que només necessita dues fosforilacions que es duen a terme mitjançant enzims cel·lulars inespecífics per convertir-se en el metabòlit actiu. El TNF és administrat com a profàrmac (tenofovir disoproxil fumarat, o TDF), el qual necessita la hidròlisi del dièster abans de convertir-se en TNF. De la mateixa manera que els ITIAN, quan la TI del virus l'incorpora al DNA no permet la incorporació de qualsevol altre nucleòtid, i evita l'elongació d'aquesta cadena.

Inhibidors de la transcriptasa inversa no anàlegs als nucleòsids (ITINAN):

Els ITINAN són molècules de naturalesa

molt diversa que tenen una alta afinitat pel centre actiu de la subunitat p66 de la TI (Hsiou *et al.*, 2001). La unió forma un canvi conformational al centre actiu de l'enzim i impedeix la polimerització del DNA (Kohlstaedt *et al.*, 1992; Spence *et al.*, 1995). A diferència dels ITIAN, no requereixen la fosforilació prèvia per ser actius. Actualment es disposa de tres ITINAN molt efectius per al tractament de la infecció per VIH-1: nevirapina (NVP), efavirenz (EFV) i delavirdina (DLV, no aprovat a Europa), que solen ser administrats en combinació amb ITIAN i amb inhibidors de la proteasa. L'eficàcia dels ITINAN és molt dependent de la conformació del centre actiu, i això fa que la variabilitat existent entre els virus VIH en els residus essencials que permeten la unió d'aquests inhibidors a la TI no permeti que siguin efectius contra els virus del grup O i el VIH-2 (Descamps *et al.*, 1997; Ren *et al.*, 2002).

Inhibidors de la proteasa (IP)

La proteasa del VIH és una proteasa aspàrtica que es compon de dos monòmers idèntics de noranta-nou aa associats no covalentment. La seva activitat proteolítica permet el correcte processament de les poliproteïnes precursors generades durant el cicle de replicació vírica en proteïnes funcionals i estructurals que formaran els virions madurs a l'interior de la cèl·lula hoste (Navia *et al.*, 1989). Entre aquestes poliproteïnes precursors destaca la poliproteïna Gag-Pol, en què l'escissió condueix a les proteïnes estructurals de la càpsida (p7, p9, p17 i p24) i les proteïnes funcionals, com la TI, la RNAasa H, la integrasa i la proteasa. Els inhibidors de la proteasa actuen inhibint el centre catalític de la proteasa i impedeixen la correcta maduració de les partícules víriques. Com a resultat, es formen virus immadurs incapaços d'iniciar el cicle d'infecció en noves cèl·lules hoste. Avui dia, es disposa de sis inhibidors de la proteasa:

saquinavir (SQV), ritonavir (RTV), nelfinavir (NFV), amprenavir (APV), lopinavir (LPV) i atazanavir (ATV). Aquests inhibidors són específics de la proteasa de VIH i no afecten les proteases cel·lulars, ja que s'han dissenyat a partir de pèptids que mimetitzen l'estructura del substrat natural d'aquesta proteïna (Erickson i Kempf, 1994; Flexner, 1998). L'aparició dels inhibidors de la proteasa constituï un progrés important en el tractament de la infecció en la dècada dels noranta. La seva administració en combinació amb inhibidors de la TI va permetre controlar la virèmia en plasma fins a nivells per sota del límit de detecció. Actualment, molts tractaments que inclouen IP estan basats en l'administració conjunta d'un IP amb baixes dosis de RTV. Les propietats farmacocinètiques de l'RTV permeten inhibir el metabolisme d'altres IP com l'LPV i, per tant, augmentar la vida mitjana i concentració en plasma d'aquests altres IP (Moyle, 2002).

Inhibidors de l'entrada o fusió del virus

Recentment s'ha incorporat al tractament un inhibidor de la fusió conegut com a *enfuvirtide* (T-20). En l'inici de la infecció la glicoproteïna gp120 situada a la càpsida del virus es posa en contacte amb les molècules receptores i coreceptores i es formen canvis conformacionals que permeten l'apropament de la glicoproteïna vírica gp41. Aquesta proteïna gp41 conté uns dominis anomenats *HR1* i *HR2*, en què la interacció és essencial perquè es formi la fusió de membranes entre el virus i la cèl·lula. El T-20 és un pèptid sintètic de trenta-sis aa que mimetitza el domini HR2 des del residu 127 al 162 de la gp41 i no permet la interacció entre HR1 i HR2 (Wild *et al.*, 1994). És un inhibidor molt efectiu contra VIH-1, amb independència de la molècula coreceptora que utilitzi en l'entrada (CXCR4 o CCR5), però no és efectiu contra el VIH-2.

MECANISMES DE RESISTÈNCIA ALS ANTIRETROVIRALS

En general, la resistència als antiretrovirals es deu a la introducció de mutacions en el genoma víric. Aquestes mutacions es formen essencialment com a conseqüència de fets dependents de la TI vírica: a) la seva elevada taxa d'error se situa al voltant de 10^{-4} - 10^{-5} substitucions per nucleòtid i ronda de còpia i b) la falta d'activitat exonucleasa 3' → 5' d'aquest enzim, que no permet la correcció dels errors deguts a substitucions, insercions o delecions durant el procés de retrotranscripció. L'elevada taxa de replicació i d'error dóna lloc a variacions moleculars en el genoma que formen un espectre de variants víriques que coexisteixen en un mateix entorn, anomenades *quasiespècies*. Algunes d'aquestes quasiespècies presenten mutacions que afavoreixen la supervivència del virus davant la pressió de determinats inhibidors, ja sigui de manera directa o indirecta (Coffin, 1995; Najera *et al.*, 1995; Havlir i Drichman, 1996).

Els estudis moleculars basats en la seqüenciació dels gens implicats en la diana dels diferents inhibidors i els estudis de sensibilitat als mateixos, realitzats *in vitro* a partir de virus aïllats de pacients i de virus de laboratori, han permès establir la correlació entre la presència de determinades mutacions en el genoma del virus i la falta de sensibilitat als diferents inhibidors. A més, aquests estudis han provat que les vies d'escapament del virus a la pressió antivírica no són en absolut simples. Moltes d'aquestes mutacions, tot i proporcionar la supervivència del virus, tenen un efecte negatiu en la taxa de replicació (Menéndez-Arias *et al.*, 2003). En altres ocasions, les mutacions de resistència provocades per alguns ITIAN provoquen la hipersusceptibilitat als ITIAN o les mutacions de resistència als ITIAN resensibilitzen virus resistents a alguns ITIAN (Shulman *et al.*, 2001; Whitcomb *et al.*, 2002).

Les mutacions de resistència als antiretrovirals utilitzats en el tractament es troben re-

lativament ben caracteritzades, tot i que encara es necessiten més estudis per catalogar mutacions de resistència a inhibidors de més recent incorporació i comprendre el paper de la presència de certs polimorfismes (Hirsch *et al.*, 2003).

Resistències als anàlegs als nucleòsids i nucleòtid

La pèrdua de susceptibilitat als ITIAN s'associa fonamentalment a l'aparició de mutacions al gen de la TI, encara que hi ha factors intracel·lulars, com la disminució de l'expressió de timidina-cinases cel·lulars, que podrien influir en els nivells de fosforilació dels ITIAN i, per tant, en la disminució de sensibilitat (Hoever *et al.*, 2003). Les mutacions de resistència al gen TI poden alterar les propietats de l'enzim i reduir l'activitat dels inhibidors per dos mecanismes: *a*) eliminant l'anàleg incorporat a la cadena de DNA mitjançant un procés de pirofosfòlisi —durant aquest procés cal un donador de fosfats, que sol ser l'ATP o el pirofosfat (PP_i) (Meyer *et al.*, 1999; Boyer *et al.*, 2002)— i *b*) produint canvis conformacionals al centre catalític de la TI que no permetrien la incorporació de l'anàleg a la cadena (Huang *et al.*, 1998).

Les mutacions de resistència als ITIAN han estat les més estudiades. Les més comunes es troben en l'anomenat *complex de mutacions NAM*, constituït per les mutacions *M41L*, *E44D*, *D67N*, *K70R*, *V118I*, *L210W*, *T215YF* i *K219QE*, que apareixen de manera seqüencial. Encara que inicialment van ser associades a la resistència de la ZDV, posteriorment també s'han associat a la pèrdua de sensibilitat al D4T i als ITIAN en general, amb l'excepció del 3TC (de cinc a quatre vegades al D4T i a l'ABC i de dues a tres vegades al DDI i al DDC) (Larder *et al.*, 1989, 1991; Gao *et al.*, 1994a; Mouroux *et al.*, 2001; Ross *et al.*, 2001; Margot *et al.*, 2002; Becher *et al.*, 2003). L'acumulació d'aquestes mutacions eleva el nivell de resistèn-

cia. Aquest fenomen és anomenat *barrera genètica de resistència alta*. La seva presència podria afavorir el mecanisme d'eliminació de l'anàleg incorporat a la cadena (Naeger *et al.*, 2002). Altres mutacions com la *M184V*, la *L74V* i la *K65R* solen aparèixer durant els tractaments que contenen algun dels següents inhibidors: 3TC, DDI, ABC, TNF o FTC (Gao *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 2001; Tisdale *et al.*, 1997; Margot *et al.*, 2002; Schooley *et al.*, 2002). Aquestes mutacions es denominen *barrera genètica de resistència baixa* perquè la seva sola presència pot disminuir el nivell de sensibilitat, el qual varia en funció de l'inhibidor. Les mutacions de resistència específiques per al D4T són més difícils de catalogar, tot i que alguns estudis *in vitro* associen la presència de les mutacions *V75T* o *K65R* amb la disminució de la sensibilitat a aquest inhibidor (Lacey i Larder, 1994; Garcia Lerma *et al.*, 2003). El mecanisme d'acció utilitzat per aquestes mutacions seria evitar la incorporació de l'inhibidor a la cadena.

Finalment, en alguns virus aïllats de pacients tractats amb ITIAN s'ha detectat la presència de mutacions com la *Q151M*, i la inserció *T69S-S/ins*, catalogades com a mutacions de multiresistència a tots els ITIAN, encara que la prevalença d'aquestes mutacions de multiresistència és molt baixa (Shafer *et al.*, 1994; Shirasaka *et al.*, 1995; Jong *et al.*, 1999; Vaerenbergh *et al.*, 2000).

Resistències als no anàlegs dels nucleòsids

Tot i la seva elevada eficàcia, sorprèn la facilitat amb la qual el virus escapa de l'acció d'aquest tipus d'inhibidors mitjançant la generació de mutacions de resistència entre els codons 100-110, 180-190 i 225-236, que eviten la unió de l'inhibidor a la RT. La presència d'una sola mutació pot reduir l'eficàcia de l'inhibidor. Les mutacions de resistència als ITIAN més freqüents són *L100I*, *K103N*, *V106A*, *V108I*, *Y181C/I*, *Y188CL*, *G190A/E/S*, *p225H* i *P236L* (Bachelier *et al.*, 2000). Les mu-

tacions *K103N* i *Y188L* han estat descrites com a mutacions de multiresistència, ja que la seva presència redueix considerablement l'eficàcia dels ITINAN.

Resistències als inhibidors de les proteases

La resistència als inhibidors a la proteasa es deu fonamentalment a mutacions produïdes de l'enzim que no permeten la correcta unió a l'inhibidor i tenen com a conseqüència una pèrdua de l'eficiència de l'enzim, que se sol compensar amb l'aparició de mutacions acompanyants als residus 10, 20, 36, 71 i 77, en què la seva funció és paliar aquesta disminució d'activitat (Chen *et al.*, 1995; Muzammil *et al.*, 2003). Les mutacions de resistència més comunes són *V82A/I84V*, situades al centre actiu (IDV, RTV) i *D30N* (NFV), *M46I/I54V* a la regió d'encavalcament i en *L10I/L90M* a la regió de dimerització (SQV). Es diu que els IP tenen una barrera genètica de resistència alta, ja que per si sols tenen poc impacte en la resistència i necessiten l'acumulació de mutacions per elevar el nivell de resistència, que augmenta, ja que es produeix un efecte de cooperativitat entre mutacions (Wu *et al.*, 2003; Ohtaka *et al.*, 2003). En el cas de l'APV i l'LPV ens cal una acumulació de mutacions de resistència. Alguns estudis indiquen que la presència de mutacions a les dianes de tall situades a la poliproteïna precursora poden incrementar el nivell de resistència.

Resistències a l'inhibidor de l'entrada: T-20

Diversos estudis realitzats *in vitro* i *in vivo* localitzen la presència de mutacions de resistència al T-20 a la regió compresa entre els residus 36 i 45 del domini HR1. Les mutacions més comunes són *G36D/S*, *I37V*, *V38A/M*, *Q39R*, *N42T* i *N43D* (Rimsky *et al.*, 1998; Wei *et al.*, 2002).

LIMITACIONS DEL TRACTAMENT ANTIRETROVIRAL

La disponibilitat d'antiretrovirals d'ampli espectre d'acció ha suposat un clar avanç en el tractament de la infecció per VIH, i ha permès el control de la virèmia i la recuperació del sistema immunitari en la majoria dels pacients tractats i, com a conseqüència, la prolongació de l'esperança de vida. Tanmateix, tot i controlar la virèmia fins a nivells indetectables, no s'ha aconseguit eradicar el virus definitivament, i s'ha convertit en una infecció crònica, en què el control necessita tractament antiretroviral per sempre. En moltes ocasions, aquesta dependència del tractament per vida i la toxicitat que presenten els antiretrovirals, en general a mig i llarg termini, pot derivar en problemes d'adherència (no compliment del tractament), que pot ser total, la qual cosa deriva a una falta de resposta; o bé pot ser parcial, cosa que afavoreix l'aparició de mutacions de resistència i de resistència creuada a diversos inhibidors, amb l'augment de la complexitat relativa en l'elecció d'un tractament eficaç, sobretot en règims de rescat (Hirsch *et al.*, 2003; Yeni *et al.*, 2004).

BIBLIOGRAFIA

- BACHELER, L. T.; ANTON, E. D.; KUDISH, P.; BAKER, D.; BUNVILLE, J.; KRAKOWSKI, K.; BOLLING, L.; AUJAY, M.; WANG, X. V.; ELLIS, D.; BECKER, M. F.; LASUT, A. L.; GEORGE, H. J.; SPALDING, D. R.; HOLLIS, G.; ABREMSKI, K. (2000). «Human immunodeficiency virus type 1 mutations selected in patients failing efavirenz combination therapy». *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 44, pàg. 2475-2484.
- BECHER, F.; PRUVOST, A. G.; SCHLEMMER, D. D.; CREMINON, C. A.; GOUJARD, C. M.; DELFRAISSY, J. F.; BENECH, H. C.; GRASSI, J. J. (2003). «Significant levels of intracellular stavudine triphosphate are found in HIV-infected zidovudine-treated patients». *AIDS*, vol. 17, pàg. 555-561.
- BOYER, P. L.; SARAFIANOS, S. G.; ARNOLD, E.; HUGHES, S. H. (2002). «Nucleoside analog resistance caused by insertions in the fingers of human immunodeficiency virus

- type 1 reverse transcriptase involves ATP-mediated excision». *J. Virol.*, vol. 76, pàg. 9143-9151.
- CHEN, Z.; LI, Y.; SCHOCK, H. B.; HALL, D.; CHEN, E.; KUO, L. C. (1995). «Three-dimensional structure of a mutant HIV-1 protease displaying cross-resistance to all protease inhibitors in clinical trials». *J. Biol. Chem.*, vol. 270, pàg. 21433-21436.
- CLERCQ, E. DE (2004). «Antiviral drugs in current clinical use». *J. Clin. Virol.*, vol. 30, pàg. 115-133.
- COFFIN, J. M. (1995). «HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation; pathogenesis, and therapy». *Science*, vol. 267, pàg. 483-489.
- DESCAMPS, D.; COLLIN, G.; LETOURNEUR, F.; APETREI, C.; DAMOND, F.; LOUSSERT-AJAKA, I.; SIMON, F.; SARAGOSTI, S.; BRUN-VEZINET, F. (1997). «Susceptibility of human immunodeficiency virus type 1 group O isolates to antiretroviral agents: in vitro phenotypic and genotypic analyses». *J. Virol.*, vol. 71, pàg. 8893-8898.
- ERICKSON, J.; KEMPF, D. (1994). «Structure-based design of symmetric inhibitors of HIV-1 protease». *Arch. Virol. Suppl.*, vol. 9, pàg. 19-29.
- ESNOUF, R. M.; REN, J.; HOPKINS, A. L.; ROSS, C. K.; JONES, E. Y.; STAMMERS, D. K.; STUART, D. I. (1997). «Unique features in the structure of the complex between HIV-1 reverse transcriptase and the bis(heteroaryl)piperazine (BHAP) U-90152 explain resistance mutations for this nonnucleoside inhibitor.» *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, vol. 94, pàg. 3984-3989.
- FLEXNER, C. (1998). «HIV-protease inhibitors». *N. Engl. J. Med.*, vol. 338, pàg. 1281-1292.
- GAO, Q.; GU, Z.; PARNIAK, M. A.; CAMERON, J.; CAMMACK, N.; BOUCHER, C.; WAINBERG, M. A. (1993). «The same mutation that encodes low-level human immunodeficiency virus type 1 resistance to 2',3'-dideoxyinosine and 2',3'-dideoxycytidine confers high-level resistance to the (-) enantiomer of 2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine». *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 37, pàg. 1390-1392.
- GAO, Q.; GU, Z.; SALOMON, H.; NAGAI, K.; PARNIAK, M. A.; WAINBERG, M. A. (1994a). «Generation of multiple drug resistance by sequential in vitro passage of the human immunodeficiency virus type 1». *Arch. Virol.*, vol. 136, pàg. 111-122.
- GAO, W. Y.; AGBARIA, R.; DRISCOLL, J. S.; MITSUYA, H. (1994b). «Divergent anti-human immunodeficiency virus activity and anabolic phosphorylation of 2',3'-dideoxynucleoside analogs in resting and activated human cells». *J. Biol. Chem.*, vol. 269, pàg. 12633-12638.
- GARCÍA-LERMA, J. G.; MACINNES, H.; BENNETT, D.; REID, P.; NIDTHA, S.; WEINSTOCK, H.; KAPLAN, J. E.; HENEINE, W. (2003). «A novel genetic pathway of human immunodeficiency virus type 1 resistance to stavudine mediated by the K65R mutation». *J. Virol.*, vol. 77, pàg. 5685-5693.
- GULICK, R. M.; MELLORS, J. W.; HAVLIR, D.; ERON, J. J.; GONZALEZ, C.; MCMAHON, D.; RICHMAN, D. D.; VALENTINE, F. T.; JONAS, L.; MEIBOHM, A.; EMINI, E. A.; CHODAKEWITZ, J. A. (1997). «Treatment with indinavir, zidovudine, and lamivudine in adults with human immunodeficiency virus infection and prior antiretroviral therapy». *N. Engl. J. Med.*, vol. 337, pàg. 734-739.
- HAVLIR, D. V.; DRICHMAN, D. (1996). «Viral dynamics of HIV: implications for drug development and therapeutic strategies». *Ann. Intern. Med.*, vol. 124, pàg. 984-994.
- HIRSCH, M. S.; BRUN-VEZINET, F.; CLOTET, B.; CONWAY, B.; KURITZKES, D. R.; D'AQUILA, R. T.; DEMETER, L. M.; HAMMER, S. M.; JOHNSON, V. A.; LOVEDAY, C.; MELLORS, J. W.; JACOBSEN, D. M.; RICHMAN, D. D. (2003). «Antiretroviral drug resistance testing in adults infected with human immunodeficiency virus type 1: recommendations of an International AIDS Society-USA Panel». *Clin. Infect. Dis.*, vol. 37, pàg. 113-128.
- HOEVER, G.; GROESCHEL, B.; CHANDRA, P.; DOERR, H. W.; CINATL, J. (2003). «The mechanism of 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine resistance to human lymphoid cells». *Int. J. Mol. Med.*, vol. 11, pàg. 743-747.
- HSTIOU, Y.; DING, J.; DAS, K.; CLARK JR., A. D.; BOYER, P. L.; LEWI, P.; JANSSEN, P. A.; KLEIM, J. P.; ROSNER, M.; HUGHES, S. H.; ARNOLD, E. (2001). «The Lys103Asn mutation of HIV-1 RT: a novel mechanism of drug resistance». *J. Mol. Biol.*, vol. 309, pàg. 437-445.
- HUANG, H.; CHOPRA, R.; VERDINE, G. L.; HARRISON, S. C. (1998). «Structure of a covalently trapped catalytic complex of HIV-1 reverse transcriptase: implications for drug resistance». *Science*, vol. 282, pàg. 1669-1675.
- JONG, J. J. DE; GOUDSMIT, J.; LUKASHOV, V. V.; HILLEBRAND, M. E.; BAAN, E.; HUISMANS, R.; DANNER, S. A.; VEEN, J. H. TEN; WOLF, F. DE; JURRIAANS, S. (1999). «Insertion of two amino acids combined with changes in reverse transcriptase containing tyrosine-215 of HIV-1 resistant to multiple nucleoside analogs». *AIDS*, vol. 13, pàg. 75-80.
- KEWN, S.; VEAL, G. J.; HOGGARD, P. G.; BARRY, M. G.; BACK, D. J. (1997). «Lamivudine (3TC) phosphorylation and drug interactions in vitro». *Biochem. Pharmacol.*, vol. 54, pàg. 589-595.
- KOHLSTAEDT, L. A.; WANG, J.; FRIEDMAN, J. M.; RICE, P. A.; STEITZ, T. A. (1992). «Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor». *Science*, vol. 256, pàg. 1783-1790.
- LACEY, S. F.; LARDER, B. A. (1994). «Novel mutation (V75T) in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase confers resistance to 2'-didehydro-2',3'-dideoxythymidine in cell culture». *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 38, pàg. 1428-1432.
- LARDER, B. A.; COATES, K. E.; KEMP, S. D. (1991). «Zidovudine-resistant human immunodeficiency virus selected by passage in cell culture». *J. Virol.*, vol. 65, pàg. 5232-5236.
- LARDER, B. A.; KEMP, S. D. (1989). «Multiple mutations in HIV-1 reverse transcriptase confer high-level resistance to zidovudine (AZT)». *Science*, vol. 246, pàg. 1155-1158.
- LEE, K.; CHONG, Y.; CHU, C. K. (2001). «Understanding the mode of action of L-nucleosides as antiviral agents: a molecular modeling approach». *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, vol. 20, pàg. 385-388.

- MARGOT, N. A.; ISAACSON, E.; MCGOWAN, I.; CHENG, A. K.; SCHOOLEY, R. T.; MILLER, M. D. (2002). «Genotypic and phenotypic analyses of HIV-1 in antiretroviral-experienced patients treated with tenofovir DF». *AIDS*, vol. 16, pàg. 1227-1235.
- MARTÍNEZ-PICADO, J.; DEPASQUALE, M. P.; KARTSONIS, N.; HANNA, G. J.; WONG, J.; FINZI, D.; ROSENBERG, E.; GUNTARD, H. F.; SUTTON, L.; SAVARA, A.; PETROPOULOS, C. J.; HELLMANN, N.; WALKER, B. D.; RICHMAN, D. D.; SILICIANO, R.; D'AQUILA, R. T. (2000). «Antiretroviral resistance during successful therapy of HIV type 1 infection». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 97, pàg. 10948-10953.
- MENÉNDEZ-ARIAS, L.; MARTÍNEZ, M. A.; QUINONES-MATEU, M. E.; MARTÍNEZ-PICADO, J. (2003). «Fitness variations and their impact on the evolution of antiretroviral drug resistance». *Curr. Drug. Targets. Infect. Disord.*, vol. 3, pàg. 35-43.
- MEYER, P. R.; MATSUURA, S. E.; MIAN, A. M.; SO, A. G.; SCOTT, W. A. (1999). «A mechanism of AZT resistance: an increase in nucleotide-dependent primer unblocking by mutant HIV-1 reverse transcriptase». *Mol. Cell.*, vol. 4, pàg. 35-43.
- MOURoux, M.; DESCAMPS, D.; IZOPET, J.; YVON, A.; DELAUGERRE, C.; MATHERON, S.; COUTELLIER, A.; VALANTIN, M. A.; BONMARCHAND, M.; AGUT, H.; MASSIP, P.; COSTAGLIOLA, D.; KATLAMA, C.; BRUN-VEZINET, F.; CALVEZ, V. (2001). «Low-rate emergence of thymidine analogue mutations and multi-drug resistance mutations in the HIV-1 reverse transcriptase gene in therapy-naive patients receiving stavudine plus lamivudine combination therapy». *Antivir. Ther.*, vol. 6, pàg. 179-183.
- MOYLE, G. (2002). «Overcoming obstacles to the success of protease inhibitors in highly active antiretroviral therapy regimens». *AIDS Patient Care STDS*, vol. 16, pàg. 585-597.
- MUZAMMIL, S.; ROSS, P.; FREIRE, E. (2003). «A major role for a set of non-active site mutations in the development of HIV-1 protease drug resistance». *Biochemistry*, vol. 42, pàg. 631-638.
- NAEGER, L. K.; MARGOT, N. A.; MILLER, M. D. (2002). «ATP-dependent removal of nucleoside reverse transcriptase inhibitors by human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase». *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 46, pàg. 2179-2184.
- NAJERA, I.; HOLGUIN, A.; QUINONES-MATEU, M. E.; MUÑOZ-FERNANDEZ, M. A.; NAJERA, R.; LOPEZ-GALINDEZ, C.; DOMINGO, E. (1995). «Pol gene quasispecies of human immunodeficiency virus: mutations associated with drug resistance in virus from patients undergoing no drug therapy». *J. Virol.*, vol. 69, pàg. 23-31.
- NAVIA, M. A.; FITZGERALD, P. M.; MCKEEVER, B. M.; LEU, C. T.; HEIMBACH, J. C.; HERBER, W. K.; SIGAL, I. S.; DARKE, P. L.; SPRINGER, J. P. (1989). «Three-dimensional structure of aspartyl protease from human immunodeficiency virus HIV-1». *Nature*, vol. 337, pàg. 615-620.
- OHTAKA, H.; SCHON, A.; FREIRE, E. (2003). «Multidrug resistance to HIV-1 protease inhibition requires cooperative coupling between distal mutations». *Biochemistry*, vol. 42, pàg. 13659-13666.
- PALELLA JR., F. J.; DELANEY, K. M.; MOORMAN, A. C.; LOVELESS, M. O.; FUHRER, J.; SATTEN, G. A.; ASCHMAN, D. J.; HOLMBERG, S. D. (1998). «Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators». *N. Engl. J. Med.*, vol. 338, pàg. 853-860.
- REN, J.; BIRD, L. E.; CHAMBERLAIN, P. P.; STEWART-JONES, G. B.; STUART, D. I.; STAMMERS, D. K. (2002). «Structure of HIV-2 reverse transcriptase at 2.35-Å resolution and the mechanism of resistance to non-nucleoside inhibitors». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 99, pàg. 14410-14415.
- RIMSKY, L. T.; SHUGARS, D. C.; MATTHEWS, T. J. (1998). «Determinants of human immunodeficiency virus type 1 resistance to gp41-derived inhibitory peptides». *J. Virol.*, vol. 72, pàg. 986-993.
- ROSS, L.; HENRY, K.; PAAR, D.; SALVATO, P.; SHAEFER, M.; FISHER, R.; LIAO, Q.; ST CLAIR, M. (2001). «Thymidine-analog and multi-nucleoside resistance mutations are observed in both zidovudine-naive and zidovudine-experienced subjects with viremia after treatment with stavudine-containing regimens». *J. Hum. Virol.*, vol. 4, pàg. 217-222.
- SCHOOLEY, R. T.; RUANE, P.; MYERS, R. A.; BEALL, G.; LAMPİRIS, H.; BERGER, D.; CHEN, S. S.; MILLER, M. D.; ISAACSON, E.; CHENG, A. K.; STUDY 902 TEAM (2002). «Tenofovir DF in antiretroviral-experienced patients: results from a 48-week, randomized, double-blind study». *AIDS*, vol. 16, pàg. 1257-1263.
- SHAFER, R. W.; KOZAL, M. J.; WINTERS, M. A.; IVERSEN, A. K.; KATZENSTEIN, D. A.; RAGNI, M. V.; MEYER 3RD, W. A.; GUPTA, P.; RASHEED, S.; COOMBS, R. (1994). «Combination therapy with zidovudine and didanosine selects for drug-resistant human immunodeficiency virus type 1 strains with unique patterns of pol gene mutations». *J. Infect. Dis.*, vol. 169, pàg. 722-729.
- SHIRASAKA, T.; KAVLICK, M. F.; UENO, T.; YGAO, W.; KOJIMA, E.; ALCAIDE, M. L.; CHOKEKIJCHAI, S.; ROY, B. M.; ARNOLD, E.; YARCHOAN, R. (1995). «Emergence of human immunodeficiency virus type 1 variants with resistance to multiple dideoxynucleosides in patients receiving therapy with dideoxynucleosides». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 92, pàg. 2398-2402.
- SHULMAN, N.; ZOLOPA, A. R.; PASSARO, D.; SHAFER, R. W.; HUANG, W.; KATZENSTEIN, D.; ISRAELSKI, D. M.; HELLMANN, N.; PETROPOULOS, C.; WHITCOMB, J. (2001). «Phenotypic hypersusceptibility to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors in treatment-experienced HIV-infected patients: impact on virological response to efavirenz-based therapy». *AIDS*, vol. 15, pàg. 1125-1132.
- SPENCE, R. A.; KATI, W. M.; ANDERSON, K. S.; JOHNSON, K. A. (1995). «Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by nonnucleoside inhibitors». *Science*, vol. 267, pàg. 988-993.
- TISDALE, M.; ALNADAF, T.; COUSENS, D. (1997). «Combi-

- nation of mutations in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase required for resistance to the carbocyclic nucleoside 1592U89». *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 41, pàg. 1094-1098.
- TURRIZIANI, O.; ANTONELLI, G.; DIANZANI, F. (2000). «Cellular factors involved in the induction of resistance of HIV to antiretroviral agents». *Int. J. Antimicrob. Agents.*, vol. 16, pàg. 353-356.
- TURRIZIANI, O.; SCOGNOLARI, C.; BAMBACIONI, F.; BELLOMI, F.; FOCHER, F.; GENTILE, M.; ANTONELLI, G. (2002). «Selection of a T-cell line resistant to stavudine and zidovudine by prolonged treatment with stavudine». *Antivir. Ther.*, vol. 7, pàg. 105-111.
- VAERENBERGH, K. VAN; LAETHEM, K. VAN; ALBERT, J.; BOUCHER, C. A. [et al.] (2000). «Prevalence and characteristics of multinucleoside-resistant human immunodeficiency virus type 1 among European patients receiving combinations of nucleoside analogues». *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 44, pàg. 2109-2117.
- WEI, X.; DECKER, J. M.; LIU, H.; ZHANG, Z.; ARANI, R. B.; KILBY, J. M.; SAAG, M. S.; WU, X.; SHAW, G. M.; KAPPES, J. C. (2002). «Emergence of resistant human immunodeficiency virus type 1 in patients receiving fusion inhibitor (T-20) monotherapy». *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 46, pàg. 1896-1905.
- WHITCOMB, J. M.; HUANG, W.; LIMOLI, K.; PAXINOS, E.; WRIN, T.; SKOWRON, G.; DEEKS, S. G.; BATES, M.; HELLMANN, N. S.; PETROPOULOS, C. J. (2002). «Hypersusceptibility to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors in HIV-1: clinical, phenotypic and genotypic correlates». *AIDS*, vol. 16, pàg. F41-F47.
- WILD, C. T.; SHUGARS, D. C.; GREENWELL, T. K.; MCDANAL, C. B.; MATTHEWS, T. J. (1994). «Peptides corresponding to a predictive alpha-helical domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 are potent inhibitors of virus infection». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 91, pàg. 9770-9774.
- WONG, J. K.; HEZAREH, M.; GUNTARD, H. F.; HAVLIR, D. V.; IGNACIO, C. C.; SPINA, C. A.; RICHMAN, D. D. (1997). «Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia». *Science*, vol. 278, pàg. 1291-1295.
- WU, T. D.; SCHIFFER, C. A.; GONZALES, M. J.; TAYLOR, J.; KANTOR, R.; CHOU, S.; ISRAELSKI, D.; ZOLOPA, A. R.; FESSEL, W. J.; SHAFER, R. W. (2003). «Mutation patterns and structural correlates in human immunodeficiency virus type 1 protease following different protease inhibitor treatments». *J. Virol.*, vol. 77, pàg. 4836-4847.
- YENI, P. G.; HAMMER, S. M.; HIRSCH, M. S.; SAAG, M. S.; SCHECHTER, M.; CARPENTER, C. C.; FISCHL, M. A.; GATELL, J. M.; GAZZARD, B. G.; JACOBSEN, D. M.; KATZENSTEIN, D. A.; MONTANER, J. S.; RICHMAN, D. D.; SCHOOLEY, R. T.; THOMPSON, M. A.; VELLA, S.; VOLBERDING, P. A. (2004). «Treatment for adult HIV infection: 2004 recommendations of the International AIDS Society-USA Panel». *JAMA*, vol. 292, pàg. 251-265.