Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Implicancias de la farmacogenética en la infección pediátrica por HIV-1

Bellusci, Carolina Paula

2011

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Bellusci, Carolina Paula. (2011). Implicancias de la farmacogenética en la infección pediátrica por HIV-1. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Bellusci, Carolina Paula. "Implicancias de la farmacogenética en la infección pediátrica por HIV-1". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

Implicancias de la farmacogenética en la infección pediátrica por HIV-1

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Biológica

Carolina Paula Bellusci

Directores de tesis: Dra. Andrea Mangano
Dra. Luisa Sen
Consejero de estudios: Dra. Laura Alché

Lugar de trabajo: Laboratorio de Biología Celular y Retrovirus, Hospital de Pediatría "Prof. Dr. Juan P. Garrahan"

Buenos Aires, 2011

Resumen

Implicancias de la farmacogenética en la infección pediátrica por HIV-1

El gen de resistencia a múltiples drogas (*MDR1*) codifica para la Glicoproteína P (P-gp), que bombea diversos sustratos hacia el exterior de la célula, entre ellos los antirretrovirales: inhibidores de proteasa (PI). Además, el nivel de expresión de *MDR1* está regulado por el receptor nuclear PXR. En el presente trabajo de Tesis Doctoral evaluamos la influencia de los polimorfismos de nucleótido simple (SNP) de *MDR1* (T-129C, C1236T y C3435T) y PXR (C63396T) en la infección pediátrica por HIV-1, la respuesta al tratamiento antirretroviral y la expresión de P-gp. Los SNPs C1236T y C3435T cumplirían un rol protector retrasando la progresión a SIDA pediátrico, pero no afectarían la transmisión vertical por HIV-1. Además, evaluamos el efecto de los SNPs en la respuesta antirretroviral al PI lopinavir, demostrando que el SNP C1236T se asocia con una menor concentración plasmática de la droga y una mayor carga viral. Por otra parte, analizamos si los niveles de expresión de P-gp en linfocitos $CD4^+$ se asocian con los SNPs de *MDR1* o PXR, sin hallar diferencias entre los distintos genotipos. Sin embargo, observamos que el nivel de expresión de P-gp en linfocitos $CD4^+$ aumenta con la edad y la infección pediátrica por HIV-1. En conjunto, nuestros resultados sugieren que P-gp es un factor clave tanto en la modulación de la infección por HIV-1, independientemente de su función en el transporte de drogas, como en la respuesta a la terapia antirretroviral.

Palabras claves: glicoproteína P, *MDR1*, PXR, polimorfismo de nucleótido simple, HIV-1, SIDA pediátrico, farmacogenética

Abstract

Implication of the pharmacogenetic in the HIV-1 pediatric infection

The multidrug resistant gene (*MDR1*) encodes for P-glycoprotein (P-gp), which pumps several substrates out of the cell, such as the antiretroviral protease inhibitors (PI). In addition, the *MDR1* expression level is regulated by the nuclear receptor PXR. In the present PhD Thesis we evaluated the influence of the single nucleotide polymorphisms (SNP) T-129C, C1236T y C3435T of *MDR1* and C63396T of PXR in HIV-1 pediatric infection, response to antiretroviral therapy and P-gp expression. The SNPs C1236T and C3435T may play a protective role delaying progression to pediatric AIDS, but we did not observe an effect HIV-1 vertical transmission. In addition, we evaluated the effect of SNPs on antiretroviral response to the PI lopinavir, demonstrating that the SNP C1236T is associated with a lower drug plasma concentration and a higher viral load. We analyzed whether P-gp expression levels in $CD4^+$ lymphocytes are associated with the SNPs of *MDR1* or PXR, but no differences between the genotypes were found. However, we observed that P-gp expression levels in $CD4^+$ lymphocytes increase with the age and the HIV-1 pediatric infection. Our results suggest that P-gp is a key factor either in the modulation of the HIV-1 infection, independently of its function in drug transport, or in the response to antiretroviral therapy.

Key words: P-glycoprotein, *MDR1*, PXR, single nucleotide polymorphism, HIV-1, pediatric AIDS, pharmacogenetic

AGRADECIMIENTOS:

A Fede, gracias por todo el amor que me das. Por estar a mi lado, por hacerme feliz y por ser mi cable a tierra.

A mi mamá, por tanta dulzura. Gracias por darme la libertad y alentarme siempre ante cada nuevo proyecto.

A mi papá, por creer en mí. Por estar siempre al pie del cañón y enseñarme a luchar por lo que siento.

A mi hermana Laura, por compartir los buenos y malos momentos de mi vida. Gracias por hacerme saber que puedo contar con vos.

A mi directora, Andrea Mangano por guiarme, brindándome su experiencia y dedicación durante todos estos años.

A la Dra. Sen, por darme la posibilidad de trabajar en su laboratorio.

A mis compañeros del laboratorio, Nati B., Cintia, Guille, Sily y Cármen, por compartir el día a día y hacer que todo sea más divertido. Gracias por el cariño, por escucharme y contenerme en los momentos difíciles.

A Carlitos, gracias por tantas horas de charlas y risas, pero también por tu compromiso y por siempre estar dispuesto a darme una mano.

A CONICET, por otorgarme las becas de postgrado tipo I y tipo II que hicieron posible la realización de este trabajo de tesis.

A mi querida Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, por el orgullo que siento de pertenecer a ella.

Nuevamente, a todos...

¡Gracias!

Parte de los resultados presentados en esta Tesis Doctoral han sido publicados en:

***MDR1* 3435T and 1236T alleles delay disease progression to pediatric AIDS but have no effect on HIV-1 vertical transmission**

Bellusci CP, Rocco CA, Aulicino P, Mecikovsky D, Bologna R, Sen L, Mangano A AIDS. 2010; 24(6):833-40.

El siguiente trabajo se encuentra actualmente en revisión:

Influence of *MDR1* C1236T polymorphism on lopinavir plasma concentration and virological response in HIV-1 infected children

Bellusci CP, Rocco CA, Aulicino PC, Mecikovsky D, Curras V, Hegoburu S, Bramuglia GF, Bologna R, Sen L, Mangano A

Esta Tesis Doctoral pudo llevarse a cabo gracias a los subsidios otorgados por:

- Fondo Nacional para Ciencia y Tecnología (FONCYT), PICT N° 25830
- Consejo Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICET), PIP N° 11220090100188

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....v

LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS.....viii

I. INTRODUCCIÓN.....1

I.1. Generalidades de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana.....1

I.2. La terapia antirretroviral.....6

I.3. Superfamilia *Cassette* de unión de ATP.....7

I.4. Glicoproteína P.....8

I.4.1. Funciones de P-gp.....10

I.4.2. Rol de P-gp en la quimioterapia contra el cáncer.....11

I.4.3. Influencia de P-gp en la concentración de drogas antirretrovirales.....12

I.5. Gen de resistencia a múltiples drogas 1.....13

I.5.1. Polimorfismos de nucleótido simple en *MDR1*.....14

I.5.1.1. Efecto de los SNPs de *MDR1* en el nivel de expresión y actividad de P-gp.....15

I.5.1.2. Influencia de los SNPs de *MDR1* en la respuesta a la terapia antirretroviral.....16

I.6. P-gp en la infección por HIV-1.....20

I.7. Receptor X de pregnano.....20

II. OBJETIVOS.....23

II.1. Objetivo general.....23

II.2. Objetivos específicos.....23

III. MATERIALES Y MÉTODOS.....24

III.1. Grupos de estudio.....24

III.1.1. Niños expuestos al HIV-1 por transmisión vertical.....24

III.1.1.1. Subgrupo utilizado para el estudio de transmisión vertical y progresión a SIDA (CAPÍTULO 1).....24

III.1.1.2. Subgrupo utilizado para el estudio de la determinación de la concentración de lopinavir en plasma y la respuesta a HAART (CAPÍTULO 2).....25

III.1.1.3. Subgrupo utilizado para el estudio de la expresión de P-gp en linfocitos $CD4^+$ (CAPÍTULO 3).....26

III.1.2. Población general argentina.....26

III.1.3. Consideraciones éticas.....27

III.2. Métodos.....28

III.2.1. Obtención y preparación de muestras clínicas.....28

III.2.1.1. Obtención de células mononucleares a partir de sangre periférica.....28

III.2.1.2. Preparación de lisados celulares a partir de PBMC.....28

III.2.1.3. Obtención de ADN genómico.....29

III.2.1.3.1. Extracción de ADN genómico a partir de PBMC.....29

III.2.1.3.2. Extracción de ADN genómico a partir de sangre periférica.....30

III.2.1.3.3. Cuantificación de ADN.....30

III.2.2. Genotipificación de las variantes polimórficas de *MDR1* y PXR.....31

III.2.2.1. Amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa.....31

III.2.2.2. Digestión de los productos de amplificación con enzimas de restricción.....35

III.2.2.3. Electroforesis en gel de agarosa.....37

III.2.3. Genotipificación de las variantes polimórficas de CCR5 y SDF1.....39

III.2.4. Medición de la concentración plasmática de lopinavir.....39

III.2.5. Marcadores bioquímicos de seguimiento.....40

III.2.5.1. Marcadores virológicos.....40

III.2.5.2. Marcadores inmunológicos.....41

III.2.6. Marcadores clínicos de la infección.....41

III.2.7. Determinación de la expresión de P-gp en linfocitos $CD4^+$ por citometría de flujo.....41

III.2.8. Análisis estadístico.....42

IV. RESULTADOS.....45

CAPITULO 1 - Efecto de los polimorfismos de *MDR1* y PXR en la transmisión vertical del HIV-1 y en la progresión a SIDA pediátrico.....45

IV.1. Distribución de los SNPs de *MDR1* y PXR en la población general argentina.....45

IV.1.1. Desequilibrio de ligamiento entre los SNPs C1236T y C3435T de *MDR1*.....47

IV.2. Rol de los genotipos de *MDR1* y PXR en la transmisión vertical del HIV-1.....47

IV.3. Influencia de los genotipos de *MDR1* y PXR en la progresión a SIDA pediátrico.....50

IV.3.1. Efecto de los pares de haplotipos de *MDR1* en la evolución a SIDA infantil.....52

CAPITULO 2 - Influencia de los polimorfismos de *MDR1* y PXR en la concentración plasmática de lopinavir y en la respuesta virológica e inmunológica a HAART.....58

IV.4. Características de los pacientes.....58

IV.5. Influencia de los SNPs de *MDR1* y PXR en la concentración plasmática de lopinavir.....59

IV.6. Efecto de los SNPs de *MDR1* y PXR en la respuesta virológica e inmunológica a HAART.....61

CAPITULO 3 - Nivel de expresión de P-gp en linfocitos $CD4^+$.....65

IV.7. Puesta a punto del ensayo de citometría de flujo.....65

IV.8. Efecto de los SNPs de *MDR1* y PXR en el nivel de expresión de P-gp.....68

IV.9. Influencia de la edad en el nivel de expresión de P-gp.....71

IV.10. Impacto de la infección pediátrica por HIV-1 en el nivel de expresión de P-gp.....72

V. DISCUSIÓN.....75

VI. CONCLUSIONES.....89

VII. REFERENCIAS.....90

ANEXO.....111

ABREVIATURAS:

ABC: *Cassette* de unión de ATP (***A****TP* ***b****inding* ***c****assette*)

ADN: Ácido **d**esoxirribo**n**ucleico

ADP: Adenocina difosfato (***A****denosine* ***di******p****hosphate*)

ARN: Ácido **r**ibo**n**ucleico

ARNm: ARN mensajero

ATP: Adenocina trifosfato (***A****denosine* ***t****ri****p****hosphate*)

AZT: Zidovudina (***Az****ido****t****hymidine*)

BSA: Seroalbúmina bovina (***B****ovine* ***s****erum****a****lbumin*)

CAV-1: Caveolina-1 (***Cav****eoline****-1***)

CDC: Centros de control y prevención de enfermedades (***C****enters for* ***d****isease* ***c****ontrol and prevention*)

$C_{post\text{-}dosis}$: Concentración post-dosis de la droga

C_{valle}: Concentración valle de la droga

CYP3A4: Citocromo P450 3A4 (***Cy****tochrome* ***P 450 3A4***)

CYP450: Citocromo P450 (***Cy****tochrome* ***P 450***)

dNTP: Desoxinucleótidos trifosfato (***D****eoxyribo****n****ucleotide* ***t****ri****p****hosphate*)

DO: Densidad **ó**ptica

EDTA: Acido etilendiaminotetraacético (***e****thylene****d****iamine****t****etraacetic* ***a****cid*)

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (***E****nzyme* ***l****inked* ***i****mmuno****s****orbent* ***a****ssay*)

FITC: Isotiocianato de fluoresceína (***F****luorescein* ***i****so****t****hio****c****yanate*)

FSC: ***F****orward* ***sc****atter*

HAART: Terapia antirretroviral de alta eficacia (***H****ighly* ***a****ctive* ***a****ntiretroviral* ***t****herap*y)

HIV: Virus de la inmunodeficiencia humana (***H****uman* ***i****mmunodefiency* ***v****irus*)

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución (***H****igh* ***p****erformance* ***l****iquid* ***c****hromatography*)

IFM: Intensidad de **f**luorescencia **m**edia

LPV: Lo**p**ina**v**ir

LPV/ r: Lo**p**ina**v**ir en combinación con **r**itonavir

MDR1: Gen de resistencia a múltiples drogas 1 (***M****ulti****d****rug* ***r****esistant gene 1*)

NNRTI: Inhibidores de la transcriptasa reversa no nucleosídicos (***N****on* ***n****ucleoside* ***r****everse* ***t****ranscriptase* ***i****nhibitors*)

NRTI: Inhibidores de la transcriptasa reversa nucleosídicos (***N****ucleoside* ***r****everse* ***t****ranscriptase* ***i****nhibitors*)

PACTG: Grupo de Estudios Clínicos Pediátricos en SIDA *(****P****ediatric* ***A****IDS* ***c****linical* ***t****rials* ***g****roup*)

PBMC: Células mononucleares de sangre periférica (***P****eripheral* ***b****lood* ***m****ononuclear* ***c****ells*)

PBS: Buffer fosfato salino (***P****hosphate* ***b****uffer* ***s****aline*)

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (***P****olymerase* ***c****hain* ***r****eaction*)

PE: Ficoeritrina (***P****hyco****e****rythrin*)

P-gp: Glicoproteína P (***P****-****g****lyco****p****rotein*)

PI: Inhibidores de proteasa (***P****rotease* ***i****nhibitors*)

PXR: Receptor X de pregnano (***P****regnane* ***X*** ***r****eceptor*)

RFLP: Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (***R****estriction* ***l****ength* ***f****ragment* ***p****olymorphism*)

SIDA: Síndrome de **i**nmuno**d**eficiencia **a**dquirida

SLC: Transportadores de solutos (***S****o****l****utes* ***c****arriers*)

SNP: Polimorfismo de nucleótido simple (***S****ingle* ***n****ucleotide* ***p****olymorphism*)

SSC: ***S****ide* ***sc****atter*

TAE: **T**ris **a**cetato **E**DTA

WCLB: Buffer de lisis de glóbulos blancos (***W****hite* ***c****ell* ***l****ysis* ***b****uffer*)

LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS:

FIGURAS

Capítulo I

Figura I1. Esquema de la estructura de la Glicoproteína P

Figura I2. Modelo tridimensional de la Glicoproteína P y la interacción con sus sustratos

Figura I3. Esquema del gen *MDR1* y ubicación de los SNPs más estudiados

Figura I4. Hipótesis de la expresión diferencial de P-gp y su consecuencia en la concentración de sustratos

Capítulo III

Figura M1. Secuencia nucleotídica de la región genómica amplificada para cada polimorfismo

Figura M2. Perfiles de PCR-RFLP de los polimorfismos *MDR1* T-129C (**A**), *MDR1* C1236T (**B**), *MDR1* C3435T (**C**) y PXR C63396T (**D**)

Capítulo IV

Figura R1. Frecuencia de los pares de haplotipos de *MDR1* (C3435T, C1236T) en donantes de sangre con serología negativa para HIV-1 y en niños perinatalmente expuestos al HIV-1

Figura R2. Curvas de sobrevida para tiempo a SIDA en niños infectados por HIV-1

Figura R3. Efecto del SNP C1236T de *MDR1* en la concentración post-dosis de lopinavir y en el cambio de la carga viral

Figura R4. Muestra representativa del proceso de análisis

Figura R5. Curva de calibración para la determinación de la concentración de anticuerpo anti-P-gp a utilizar para los ensayos de citometría de flujo

Figura R6. Efecto de los SNPs de *MDR1* y PXR en el nivel de expresión de P-gp

Figura R7. Correlación entre el nivel de expresión de P-gp y la edad en individuos normales

Figura R8. Efecto de la infección pediátrica por HIV-1 en el nivel de expresión de P-gp

TABLAS

Capítulo III

Tabla M1. Enzimas de restricción y los sitios blanco correspondientes

Capítulo IV

Tabla R1. Frecuencias genotípicas y alélicas de los SNPs T-129C, C1236T y C3435T de *MDR1* y C63396T de PXR en donantes con serología negativa para HIV-1 y en niños perinatalmente expuestos al HIV-1

Tabla R2. Progresión a SIDA ajustada por la edad al inicio de HAART y la duración de HAART

Tabla R3. Características clínicas de los pacientes al momento de la determinación del nivel plasmático de lopinavir

Tabla R4. Nivel plasmático de lopinavir respecto de los genotipos de *MDR1* y PXR

Tabla R5. Respuesta virológica e inmunológica a HAART con lopinavir respecto de los genotipos de *MDR1* y PXR

I - INTRODUCCIÓN

I.1. *Generalidades de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana*

El virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) pertenece a la familia Retroviridae, género Lentivirus. Fue aislado por primera vez en el año 1983 y fue reconocido como el agente causal del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Los primeros casos fueron reportados en el año 1981 en jóvenes homosexuales de la cuidad de Los Ángeles y Nueva York (EEUU) que se caracterizaban por presentar infecciones oportunistas, principalmente neumonía por *Pneumocystis carinni* (*jirovesi*) o tumores sólidos como el sarcoma de Kaposi [CDC, 1981 a; CDC, 1981 b]. Poco después, también se verificaron casos de inmunodeficiencia en heterosexuales y en grupos particulares como usuarios de drogas intravenosas, hemofílicos, hemotransfundidos y finalmente en niños nacidos de madres portadoras del virus [CDC, 1982 a - d; CDC, 1983].

Actualmente, se reconocen dos tipos virales, HIV-1 y HIV-2, que difieren en un 30% de su secuencia genética. El primero de ellos es el responsable de la diseminación mundial del SIDA, mientras que el HIV-2 es endémico en el continente africano [Clavel F *et al*., 1986].

Desde su aparición, esta enfermedad ha constituido uno de los problemas de salud más preocupantes y la creación de una vacuna para prevenir la infección continúa siendo un desafío científico difícil de resolver. Hasta la fecha, más de 25 millones de personas han muerto por esta infección desde la aparición de la enfermedad [UNAIDS, 2010].

Según las últimas estimaciones del Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre HIV/SIDA, el número de personas viviendo con HIV-1 en el mundo llega a los 33,3 millones, de los cuales 2,5 millones son niños [UNAIDS, 2010]. Solo en el 2009 han contraído la infección 2,6 millones de individuos y 1,8 millones de personas fallecieron por causas asociadas a SIDA [UNAIDS, 2010]. Si bien el número anual de nuevas infecciones ha ido disminuyendo en forma sostenida desde finales de la década de los ´90, esto no se ve reflejado en una reducción del número total de infectados, ya que la cantidad de muertes por SIDA también disminuyó gracias al mayor número de pacientes recibiendo terapia antirretroviral.

Los primeros casos de SIDA en Argentina fueron notificados en 1982 y correspondían en su mayoría a individuos que habían adquirido la infección en Estados Unidos [Estevez ME *et al.*, 1983]. El número acumulado de notificaciones de SIDA en nuestro país durante el periodo 1982 - 2009 fue de aproximadamente 40.000 individuos [MSAL, 2010].

La transmisión del HIV-1 se produce principalmente por contacto sexual, uso de drogas inyectables y transmisión del virus de la madre infectada al hijo (transmisión vertical). La transmisión vertical es la principal causa de la infección pediátrica y puede ocurrir en tres momentos: durante la gestación, al momento del parto o a través de la leche materna. La transmisión intraútero ocurre por el pasaje del virus a través de placenta (vía transplacentaria), más frecuentemente a partir del segundo trimestre de embarazo. No obstante, la mayor parte de las infecciones ocurre durante el parto, por vía sanguínea [Gibb DM *et al.*, 1999] y/o secreciones cérvico-vaginales [The European Collaborative

Study, 1999]. Ciertos factores podrían aumentar el riesgo de transmisión vertical, como factores maternos, factores obstétricos, factores virales e inmunológicos y factores fetales. Entre los factores maternos se encuentran un bajo recuento de linfocitos $CD4^+$, una alta carga viral plasmática al momento del parto, un estadio de enfermedad clínica avanzado y la presencia de otras enfermedades de transmisión sexual, entre otros [Lynne M *et al*., 1999]. La tasa de transmisión perinatal presenta un rango muy amplio que va desde el 13 al 39% [European Collaborative Study, 1991]. Sin embargo, la implementación de la profilaxis antirretroviral con zidovudina (AZT) a partir de 1994 y de la cesárea programada [European Mode of Delivery Collaboration, 1999] ha logrado disminuir significativamente esta tasa de transmisión materno-infantil a valores cercanos al 1% [Cooper ER *et al*., 2002; European Collaborative Study, 2005]. La administración de AZT según el protocolo ACTG 076 se realiza en Argentina desde el año 1995 y consiste en tres partes: administración de AZT a la madre a partir del segundo trimestre de gestación, una dosis endovenosa durante el parto y al niño durante las primeras seis semanas de vida. Durante el año 2009, se estimó un número de 370.000 nuevas infecciones en niños en el mundo, lo cual significa una caída del 24% respecto a cinco años anteriores [UNAIDS, 2010]. El Ministerio de Salud [MSAL, 2010] informó que en nuestro país, la tasa de niños infectados por transmisión vertical también se ha reducido. De los 4.093 casos de transmisión vertical identificados en Argentina desde el comienzo de la epidemia, 230 casos fueron diagnosticados entre los años 2008 y 2009.

En el contexto pediátrico existen algunos aspectos particulares de la patogénesis de la infección por HIV-1 que son diferentes respecto de los

adultos, como la adquisición perinatal del virus, la exposición a los antirretrovirales desde la gestación, diferencias en los marcadores virológicos e inmunológicos, cambios en los parámetros farmacocinéticos con el desarrollo y la difícil adherencia a los tratamientos, entre otros. La edad de aparición de síntomas asociados a SIDA es muy variable y depende, en parte, del modo de adquisición de la infección, siendo de 17 meses en niños infectados por transmisión vertical y 24 meses en aquellos que adquirieron la infección a través de transfusiones [Auger I *et al.*, 1988]. La infección perinatal conduce usualmente a un desarrollo más rápido de la enfermedad que en los adultos, con un patrón bimodal [Blanche S *et al.*, 1989; Duliege AM *et al.*, 1992; Tovo PA *et al.*, 1992; Barnhart HX *et al.*, 1996]. Aproximadamente de un cuarto a un tercio de los niños infectados por transmisión vertical presentan manifestaciones sintomáticas asociadas a SIDA tempranamente (dentro de los 2 primeros años de vida) y una tasa de mortalidad que llega casi al 100% entre los 4 a 5 años de edad, en ausencia de tratamiento antirretroviral. El resto de los niños (70 a 75%) presentan una progresión clínica más lenta, pudiendo permanecer asintomáticos durante varios años [Wilfert CM *et al.*, 1994]. El momento en el que se produce la transmisión vertical podría determinar el curso de la infección pediátrica. Cuando la infección es intrauterina, el deterioro clínico sería más rápido, debido a la mayor inmadurez del sistema inmune fetal; mientras que cuando la infección se produce durante el parto o por la lactancia, la evolución clínica sería más lenta reflejando un mayor grado de madurez del sistema inmune. Aunque los motivos para estas diferencias no están aun del todo claros, las características genéticas tanto del virus como del hospedador también jugarían un rol clave [Mangano A *et al.*, 2001; Kopka J *et al.*, 2002]. La implementación de la terapia antirretroviral de alta eficacia (HAART) ha

mejorado significativamente la calidad de vida del paciente pediátrico, logrando permanecer algunos niños asintomáticos hasta por 5 años.

El recuento de linfocitos T $CD4^+$ y la medición de la carga viral plasmática, medida como copias de ARN viral/ml de plasma, son considerados los marcadores de laboratorio más confiables y utilizados en forma conjunta para el seguimiento de la evolución de la infección y para el inicio y control terapéutico específico. La reducción del recuento de linfocitos T $CD4^+$ refleja el grado de inmunodeficiencia del paciente infectado, mientras que el aumento de la carga viral plasmática el nivel de replicación del HIV-1. Sin embargo, en pediatría se debe tener en cuenta que los niveles de células $CD4^+$ varían con la edad, siendo considerablemente más elevados en los niños de pocos meses de vida y declinando lentamente hasta los seis años cuando se alcanzan los niveles observados en adultos [Wilfert CM *et al*., 1995; Comans-Bitter WM *et al*., 1997]. De acuerdo con el sistema de clasificación desarrollado por los Centros de control y prevención de enfermedades (CDC) en 1994 para caracterizar el grado de inmunosupresión del paciente, el número total de células $CD4^+$ que identifica una categoría inmunológica cambia con la edad, mientras que el porcentaje de células $CD4^+$ es constante. Por ello, el porcentaje de células $CD4^+$ es considerado un marcador más confiable de la progresión de la enfermedad que el número total de células $CD4^+$ [CDC, 1994]. Además, esta clasificación reconoce 4 categorías clínicas: N (sin síntomas), A (síntomas leves), B (síntomas moderados) y C (síntomas severos marcadores de SIDA).

I.2. *La terapia antirretroviral*

En los últimos años, se han logrado avances importantes en el tratamiento de la infección por el HIV-1. A mediados de los años ´90, la introducción del HAART ha logrado reducir significativamente la carga viral y elevar el recuento de linfocitos $CD4^+$, pero principalmente disminuir la incidencia de SIDA y la mortalidad por HIV-1. Estos beneficios se producen tanto en niños como en adultos, en pacientes que no recibieron tratamiento (pacientes *naive*) como en aquellos con enfermedad avanzada [Dreimane D *et al*., 2001; Gortmaker SL *et al*., 2001]. Este tipo de terapia utiliza la combinación de al menos tres clases de drogas antirretrovirales, asociando el uso de inhibidores de la transcriptasa reversa nucleosídicos (NRTI) con inhibidores de la transcriptasa reversa no nucleosídicos (NNRTI) o con inhibidores de proteasa (PI). No obstante, hasta el presente, la adherencia al tratamiento, la falla virológica y los efectos adversos asociados a la terapia son todavía tres de los motivos más frecuentes del fracaso terapéutico.

En los niños menores de 1 año se recomienda iniciar el tratamiento independientemente del estadio clínico, inmunológico o virológico, debido a que la infección progresa más rápidamente en lactantes que en niños mayores o adultos [CDC, 2006]. En la actualidad, las drogas más utilizadas actúan sobre la transcriptasa reversa y la proteasa viral. Entre los PI, la combinación más fuertemente recomendada es la de lopinavir (LPV) con ritonavir.

La efectividad de la terapia depende del mantenimiento de una concentración de drogas en plasma óptima y constante para así evitar el surgimiento de

variantes virales con mutaciones de resistencia. La mayoría de las drogas antirretrovirales muestran una farmacocinética con alta variabilidad interindividual y un rango terapéutico estrecho, lo cual conduciría a concentraciones plasmáticas subóptimas o tóxicas. Una escasa potencia del régimen antirretroviral puede asociarse con limitaciones en la penetración a determinados órganos (por ejemplo cerebro, testículos, etc.), diferencias en el metabolismo celular, interacciones farmacológicas que interfieren con la absorción o incrementan la eliminación y efectos adversos, pero también con las características genéticas del paciente. La combinación e interacción de todos estos factores puede llevar a la modificación, interrupción o suspensión definitiva del tratamiento, lo cual ha alentado a los estudios farmacogenéticos a entender las fuentes de variabilidad de las drogas, principalmente con respecto a la relación dosis-respuesta, pero también en relación a las proteínas involucradas en la farmacodinamia de los antirretrovirales.

I.3. *Superfamilia Cassette de unión de ATP*

Los transportadores de drogas se clasifican en dos grupos de proteínas: *Cassette* de unión de ATP (ABC) y Transportadores de solutos (SLC). La superfamilia ABC se encuentra divida en subfamilias y cuatro de ellas están presentes en humanos (más de 40 miembros): ABC1, MDR/TAP, MRP/CFTR y ALD. El gen *MDR1* (ABCB1) codifica para el transportador Glicoproteína P y forma parte de la subfamilia MDR/TAP, involucrada, junto con algunos miembros de la subfamilia MRP/CFTR, en el transporte de drogas antirretrovirales [Owen A *et al*., 2005 a].

I.4. *Glicoproteína P*

La glicoproteína P (P-gp) es una proteína transportadora, integral de membrana, glicosilada y fosforilada de 170 kDa y 1280 aminoácidos. P-gp es miembro de la superfamilia de transportadores ABC. Consiste en dos dominios homólogos y cada uno de ellos contiene seis segmentos transmembrana y un sitio intracelular de unión a ATP [Owen A *et al*., 2005 a] (**figura I1**). Estos dos dominios se encuentran separados por un polipéptido flexible que actúa como *linker* e interactúan para cumplir la función de transportador. Los fragmentos que interaccionan con los sustratos residen en, o cerca, de los segmentos transmembrana 5, 6, 11 y 12. P-gp presenta una estructura tridimensional en forma de cilindro, con aproximadamente la mitad de la molécula inmersa en la membrana plasmática y una cámara hidrofílica abierta hacia la cara extracelular y cerrada hacia la cara citoplasmática (**figura I2**).

En 1976, Juliano RL *et al*. identificaron a P-gp en células de ovario de hámster chino resistentes a colchicina. Dos años más tarde, Inaba M *et al*. (1978) observaron una disminución significativa en la incorporación y retención de daunorrubicina y adriamicina (agentes anticancerígenos del tipo antraciclinas) en líneas celulares de leucemia de ratón resistentes a estas drogas. La expresión de esta proteína se creía exclusiva de líneas celulares que presentaban una alteración en la permeabilidad, confiriendo resistencia a ciertas drogas. Sin embargo, hoy se sabe que P-gp también se expresa constitutivamente en órganos claves como yeyuno, colon, hígado, riñón, páncreas y glándulas adrenales, donde contribuye a la eliminación de xenobióticos o limita la absorción de drogas desde el tracto gastrointestinal

[Siegsmund M *et al*., 2002; Albermann N *et al*., 2005; Owen A *et al*., 2005 b]. P-gp también se expresa en una variedad de células normales, incluyendo células endoteliales de cerebro, testículos y placenta, así como en células progenitoras hematopoyéticas, macrófagos, células *natural killer*, linfocitos B y linfocitos T. Entre los linfocitos T, P-gp particularmente se expresa en células $CD8^+$ y $CD4^+$ - el receptor primario de HIV - [Kim RB *et al*., 1998; Choo EF *et al*., 2000; Ford J *et al*., 2003; Marzolini C *et al*., 2004; Camus M *et al*., 2006].

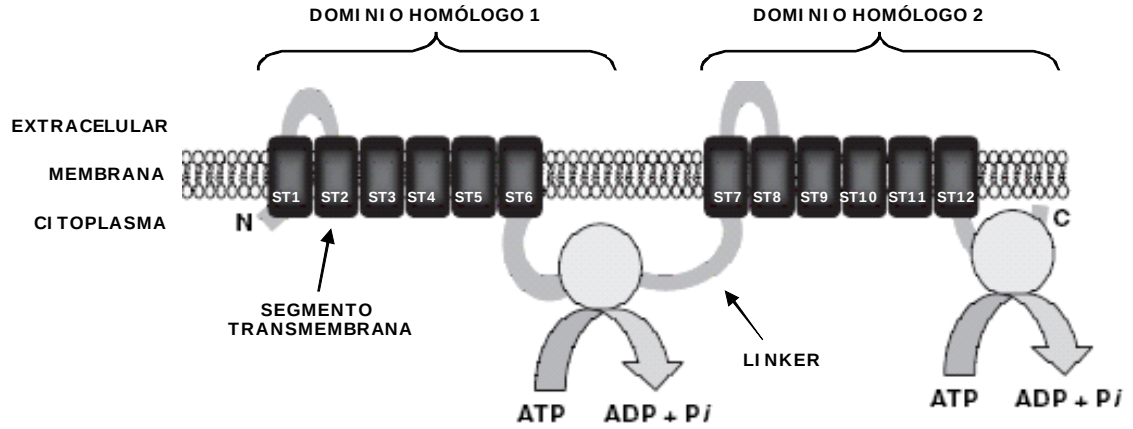


FIGURA I1. ***Esquema de la estructura de la Glicoproteína P*** (imagen adaptada de Owen A *et al*., 2005 a). SP: segmento transmembrana.

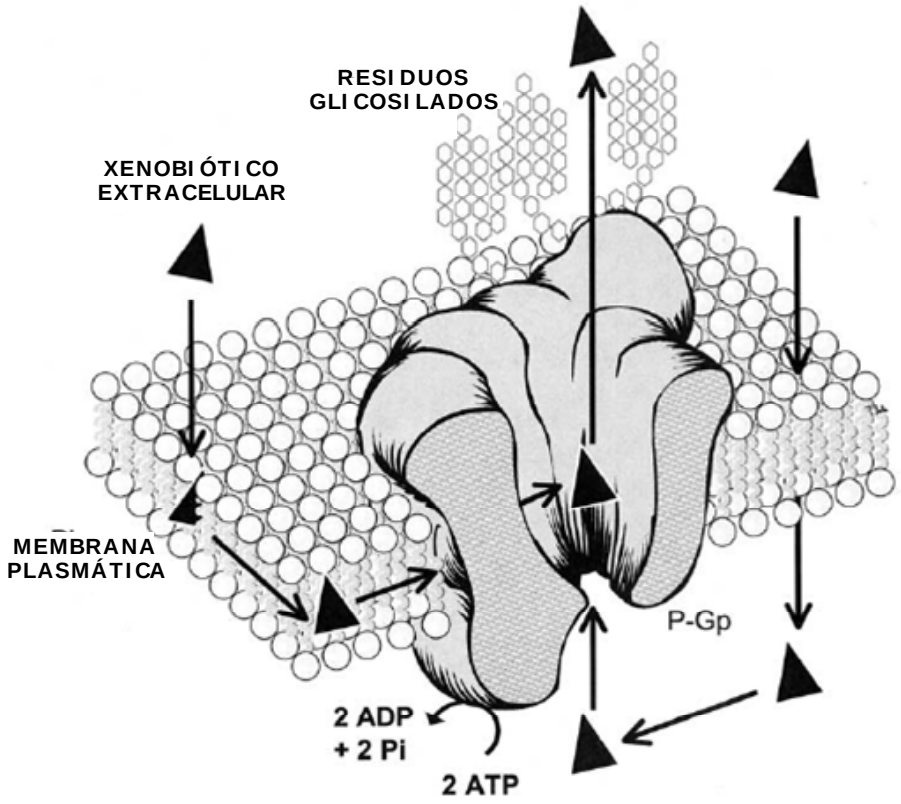


FIGURA I2. ***Modelo tridimensional de la Glicoproteína P y la interacción con sus sustratos*** (imagen adaptada de Marzolini C *et al*., 2004).El xenobiótico extracelular atraviesa la membrana plasmática, es reconocido por P-gp y bombeado hacia el exterior de la célula.

I.4.1. *Funciones de P-gp*

La expresión de P-gp cumple un rol muy importante, ya que colabora con la defensa natural del organismo. Esta proteína confiere una resistencia intrínseca en los tejidos donde se expresa, ya que bombea sustancias exógenas o metabolitos tóxicos (xenobióticos) fuera de la célula, así como también una amplia variedad de drogas. P-gp realiza la extrusión de sus sustratos en forma activa y por lo tanto la hidrólisis de ATP resulta indispensable para el proceso de bombeo.

Una gran diversidad de sustancias son sustratos de esta proteína, incluyendo moléculas hidrofóbicas con carga neutra o positiva como por ejemplo agentes anticancerígenos, agentes antihipertensivos, antiarrítmicos, esteroides, antibióticos, antimicóticos, antiácidos, inmunosupresores, antidepresivos, neurolépticos, antiepilépticos, opioides, antieméticos y drogas antirretrovirales [Marzolini C *et al*., 2004]. En el **anexo** se muestra una lista detallada de la mayoría de los compuestos que son sustratos, inductores y/o inhibidores de P-gp. Entre los antirretrovirales, el nuevo grupo de inhibidores de integrasa y los clásicos inhibidores de proteasa (ej. amprenavir, atazanavir, indinavir, lopinavir, nelfinavir, ritonavir y saquinavir) también son sustratos de P-gp [Lee CG *et al*., 1998; Cianfriglia M *et al*., 2007].

I.4.2. *Rol de P-gp en la quimioterapia contra el cáncer*

La quimioterapia es uno de los tratamientos más efectivos contra los tumores metastáticos. Sin embargo, la habilidad de las células cancerígenas de ser resistentes a diferentes drogas sigue siendo un gran impedimento en el éxito terapéutico. Se han investigado numerosos factores biológicos como posibles causantes de esta falla, incluyendo inhibición o estimulación de sistemas de eflujo (por ejemplo P-gp), inducción o inactivación de enzimas, alteración de los blancos enzimáticos, cambios en los procesos de reparación de ADN y alteración en las vías de señalización que llevan a apoptosis, entre otros. De estos, el nivel de expresión de P-gp es uno de los mecanismos mejor caracterizados. De hecho, algunos estudios han demostrado que la magnitud de la resistencia estaría fuertemente influenciada por la sobreexpresión de P-gp en la membrana de células cancerígenas, la cual es regulada positivamente por la

misma quimioterapia [Gottesman MM *et al*., 2002]. La idea de encontrar moduladores que inhiban la actividad del transportador ha crecido junto con el número de investigaciones bioquímicas y clínicas sobre el mecanismo molecular y la regulación de la expresión de P-gp [Ford JM, 1996; Sarkadi B *et al*., 1997; Bradshaw DM *et al*., 1998; Persidis A, 1999; Ramachandran C *et al*., 1999; Ueda I *et al*., 1999; Szabo D *et al.*, 2000].

I.4.3. *Influencia de P-gp en la concentración de drogas antirretrovirales*

P-gp localiza en la membrana apical de los enterocitos, donde bombea hacia el exterior de la célula las drogas, sustratos de la proteína, que fueron primeramente administrados en forma oral y absorbidos a nivel intestinal. Esto provoca una reducción de la concentración intracelular de la droga en células epiteliales intestinales y consecuentemente una baja concentración de la droga en plasma. El ingreso de las drogas hacia cerebro o testículos también esta limitada por P-gp, ya que se expresa en las células endoteliales de los capilares que irrigan estos órganos. Ensayos *in vivo* mostraron un aumento de la concentración de distintos PI (amprenavir, indinavir, nelfinavir, saquinavir) en cerebro y testículos de ratones a los cuales se les administró un potente inhibidor de P-gp (LY335979) [Choo EF *et al*., 2000]. Asimismo, ratones *knock out* para P-gp presentaron un aumento en los niveles de acumulación de indinavir, nelfinavir y saquinavir en cerebro en comparación con los ratones *wild type* [Kim RB *et al*., 1998; Washington CB *et al*., 2000]. La presencia de P-gp limitaría la penetración de los PI en cerebro o testículos, protegiendo a estos órganos contra los efectos citotóxicos que producen las altas concentraciones

de las drogas y a su vez favoreciendo la generación de los llamados "santuarios virales", fuente de la replicación residual del HIV-1.

Por otra parte, los PI utilizados en la terapia contra el HIV-1, una vez en sangre tienen como principal blanco a los linfocitos T $CD4^+$. La presencia de P-gp en estas células podría producir la expulsión de dichas drogas, disminuyendo la eficacia de la terapia antirretroviral. Owen A *et al.* (2004 a) han demostrado una correlación positiva entre la expresión de P-gp en linfocitos y la concentración inhibitoria 50 de saquinavir (PI) ensayada *in vitro*, sugiriendo que la variación de los niveles de P-gp podría tener impacto en el éxito terapéutico.

Respecto a los NRTI y los NNRTI, la escasa información disponible en la literatura indica que la afinidad de la proteína por este tipo de drogas es muy baja. Sin embargo, se ha observado que células CEM VBL100 que sobreexpresan P-gp presentan una disminución de la acumulación y acción antiviral del NRTI AZT [Antonelli G *et al*., 1992]. Por otra parte, un estudio hecho en células Caco-2 no mostró evidencias de un transporte diferencial (en la dirección basolateral-apical o apical-basolateral) de los NNRTI (nevirapina, efavirenz) a través de P-gp [Störmer E *et al*., 2002].

I.5. *Gen de resistencia a múltiples drogas 1*

P-gp es codificada por el gen de resistencia a múltiples drogas 1 (*MDR1*) que en humanos se localiza en el cromosoma 7 (7p21–21.1, NC_000007.13). Su tamaño es de 600 kb y menos del 5% del total representa la región codificante del gen, con un ARNm de aproximadamente 4,7 kDa. La estructura de *MDR1*

consiste en 28 exones y 28 intrones, 26 de los cuales interrumpen la secuencia aminoacídica (**figura I 3**) [Fojo A *et al*., 1986].

I.5.1. *Polimorfismos de nucleótido simple en MDR1*

Inicialmente, la variabilidad del gen *MDR1* fue estudiada por Hoffmeyer S *et al*. (2000). A partir de ADN genómico de individuos sanos de origen caucásico, se secuenciaron la región promotora (cubriendo los exones codificantes) y las regiones involucradas en la unión intrón-exón (importantes para el splicing del ARNm) y se identificaron quince polimorfismos de nucleótido simple (SNP), de los cuales, cinco localizaban en la región codificante y tres eran polimorfismos no sinónimos. Hasta el momento, fueron reportados en la base de datos NCBI más de 50 SNPs en la región codificante de *MDR1* y la lista se encuentra en expansión [Owen A *et al*., 2005 a; Fung KL *et al*., 2009]. La mayoría de ellos son polimorfismos de sentido erróneo (60%), seguidos de polimorfismos sinónimos (25%) y polimorfismos no codificantes (15%), mientras que no han sido encontradas mutaciones sin sentido hasta el momento.

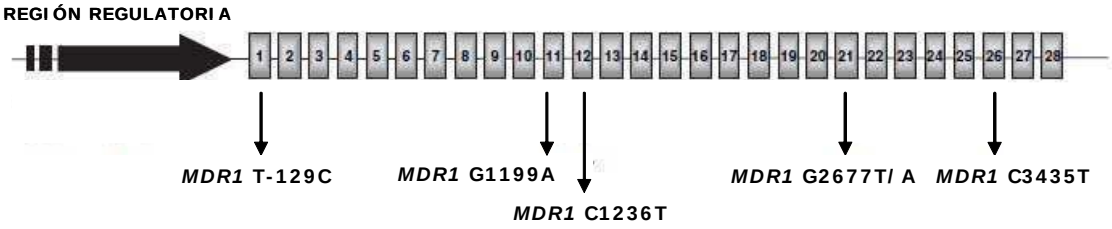


FIGURA I 3. ***Esquema del gen MDR1 y ubicación de los SNPs más estudiados*** (imagen adaptada de Owen A *et al*., 2005 a). Se muestran los 28 exones y la región regulatoria del gen.

I.5.1.1. *Efecto de los SNPs de MDR1 en el nivel de expresión y actividad de P-gp*

Entre los polimorfismos sinónimos, el SNP *MDR1* C3435T (rs1045642) en el exón 26 es el más extensamente estudiado y ha sido asociado con una menor expresión de P-gp en enterocitos [Hoffmeyer S *et al*., 2000] y en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) [Owen A *et al*., 2004 a]. Los portadores del genotipo homocigota *MDR1* 3435TT mostraron niveles de expresión de P-gp en duodeno [Hoffmeyer S *et al*., 2000] y PBMC [Owen A *et al*., 2004 a] significativamente menores y una mayor concentración plasmática de digoxina respecto a los homocigotas *MDR1* 3435CC [Hoffmeyer S *et al*., 2000]. Estos resultados fueron apoyados por el estudio de Hitzl M *et al*. (2001), en el cual, individuos homocigotas *MDR1* 3435TT de origen caucásico presentaron menores niveles de expresión de ARNm de *MDR1* en leucocitos en comparación con los individuos con genotipo *MDR1* 3435CC. Por otra parte, existen estudios que se contraponen a estos resultados, como lo encontrado en una población japonesa, en donde los individuos con genotipo *MDR1* 3435TT mostraron los mayores niveles de ARNm de *MDR1* en biopsias de duodeno [Nakamura T *et al*., 2002]. Cabe destacar que las discrepancias entre los reportes podrían explicarse por diferencias interétnicas (caucásicos vs japoneses) o diferencias del tipo celular analizado (leucocitos vs duodeno).

I.5.1.2. *Influencia de los SNPs de MDR1 en la respuesta a la terapia antirretroviral*

Algunos polimorfismos en *MDR1* podrían afectar la expresión y/o actividad de P-gp y han sido asociados con una variabilidad en la concentración plasmática de las drogas antirretrovirales y la respuesta a la terapia en pacientes infectados por HIV-1. Una de las hipótesis propuestas por Saitoh A *et al*. (2005) plantea que los pacientes homocigotas *MDR1* 3435CC presentarían un mayor nivel de expresión de P-gp en enterocitos, lo cual limitaría la absorción de la droga y consecuentemente reduciría la concentración de la misma en linfocitos T $CD4^+$, desfavoreciendo la respuesta virológica (reducción de la carga viral) e inmunológica (incremento del recuento de células T $CD4^+$) (**figura I4, situación A**). Por el contrario, los pacientes heterocigotas *MDR1* 3435CT u homocigotas *MDR1* 3435TT presentarían un menor nivel de expresión de P-gp en células epiteliales de intestino y por lo tanto una menor eliminación de la droga a través de este transportador. Esto permitiría alcanzar una mayor concentración de la droga en plasma y en linfocitos T $CD4^+$ acompañado de un mayor éxito terapéutico (**figura I4, situación B**).

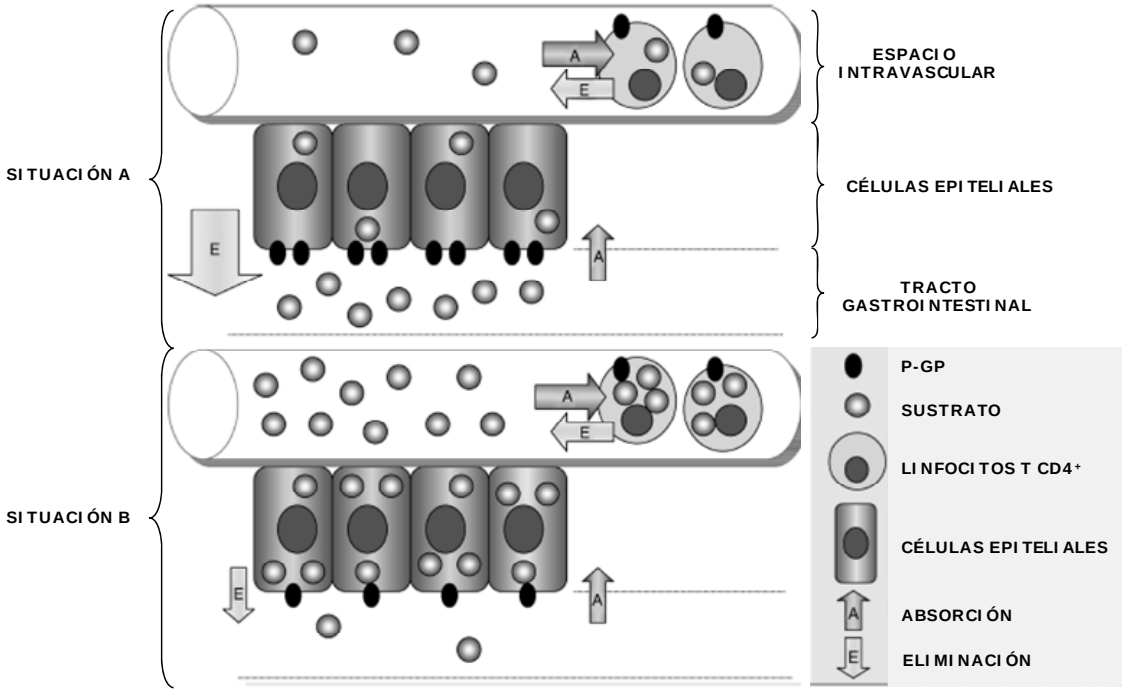


FIGURA I4. ***Hipótesis de la expresión diferencial de P-gp y su consecuencia en la concentración de sustratos*** (imagen adaptada de Saitoh A *et al*., 2005).

SITUACIÓN A. El sustrato es absorbido (A) a través de las células epiteliales intestinales y una gran proporción del mismo es eliminada (E) por P-gp. La proporción restante llega a plasma y de allí a linfocitos T $CD4^+$, donde P-gp elimina una pequeña parte.

SITUACIÓN B. Un menor nivel de expresión de P-gp en enterocitos permite que se alcancen mayores concentraciones de sustrato en plasma y en linfocitos T $CD4^+$.

En los últimos años, muchos estudios han evaluado la influencia del polimorfismo *MDR1* C3435T en respuesta al tratamiento con drogas antirretrovirales de pacientes infectados por el HIV-1, hallando resultados discordantes [Fellay J *et al*., 2002; Winzer R *et al*., 2003; Saitoh A *et al*., 2005; Ma Q *et al*., 2007; Curras V *et al*., 2009; Estrela R de C *et al*., 2009; Rakhmanina NY *et al*., 2011]. Algunos resultados sugieren que el SNP *MDR1* C3435T juega un rol importante en la respuesta inmunológica [Fellay J *et al*.,

2002] o virológica [Saitoh A *et al*., 2005] a HAART. Fellay J *et al*. (2002), estudiando adultos infectados por HIV-1, encontraron una asociación significativa entre el genotipo *MDR1* 3435TT y una alta recuperación de células T $CD4^+$, junto con menores niveles de nelfinavir (PI) y efavirenz (NNRTI) en plasma luego de un periodo de 24 semanas post inicio de HAART. Los autores sugieren que los bajos niveles de P-gp asociados al genotipo *MDR1* 3435TT podrían estar compensados por la sobreexpresión de metabolizadores (como el citocromo P450, CYP450) con afinidad por drogas antirretrovirales, lo cual produciría una reducción en las concentraciones de droga en plasma. Por otra parte, Saitoh A *et al*. (2005) hallaron mayores niveles plasmáticos de nelfinavir y efavirenz y una mayor respuesta virológica en niños heterocigotas *MDR1* 3435CT infectados por HIV-1 a las 8 semanas del inicio de HAART. Sin embargo, estos hallazgos no pudieron ser corroborados por otros estudios [Haas DW *et al*., 2003; Nasi M *et al*., 2003; Winzer R *et al*., 2005]. Numerosos reportes en la literatura han mostrado resultados conflictivos y es evidente que existen muchos factores, como diferencias en la etnia, la edad, los regimenes de HAART y el criterio aplicado para el análisis de la respuesta virológica e inmunológica a la terapia (ej. tiempos evaluados antes y después del tratamiento), que dificultan la adecuada comparación entre estudios de farmacogenética.

Por otra parte, la presencia de otros SNPs en *MDR1* con diferente desequilibrio de ligamiento podrían explicar, en parte, las diferencias halladas. El polimorfismo *MDR1* C3435T en el exón 26 presenta un fuerte desequilibrio de ligamiento con el SNP sinónimo *MDR1* C1236T (rs1128503) en el exón 12 [Kim RB *et al*., 2001]. En adultos infectados por HIV-1, el alelo *MDR1* 1236T fue

asociado con un mayor aumento del recuento de células T $CD4^+$ post inicio de HAART con PI, sin hallarse diferencias en la tasa de supresión virológica [Zhu D *et al*., 2004]. No ha sido todavía reportado si el polimorfismo *MDR1* C1236T podría afectar el nivel de expresión y/o actividad de P-gp.

Lopinavir/ritonavir (LPV/r) es una coformulación ampliamente usada como PI de primera línea para el tratamiento de pacientes pediátricos. Los polimorfismos de *MDR1* no parecen modificar la concentración plasmática valle en pacientes adultos [Winzer R *et al*., 2003; Ma Q *et al*., 2007; de Cassia Estrela R de C *et al*., 2009]. Sin embargo, en pacientes pediátricos, el efecto del SNP *MDR1* C3435T es todavía controversial; Saitoh A *et al*. (2005) y Curras V *et al*. (2009) reportaron un efecto en la respuesta a nelfinavir y ritonavir (PI), respectivamente. Por otra parte, un estudio reciente mostró que las variantes de *MDR1*, C3435T y G2677T, no afectarían ni la farmacocinética de LPV/r ni la respuesta virológica en niños infectados por HIV-1 [Rakhmanina NY *et al*., 2011].

Por otra parte, el SNP *MDR1* T-129C (rs3213619) fue identificado en la región 5´ regulatoria de *MDR1*, particularmente en el exón 1b (no traducido). Tanabe M *et al*. (2001) reportaron que las mujeres japonesas heterocigotas -129TC expresan niveles de P-gp significativamente menores en placenta respecto de las mujeres con genotipo *MDR1* -129TT. Este polimorfismo esta presente en poblaciones de origen italiana [Furuno T *et al*., 2002], japonesa [Tanabe M *et al*., 2001] y africana [Parathyras J *et al*., 2009] con frecuencias que no superan el 25% y son muy pocos los estudios que evaluaron su efecto en la respuesta a la terapia antirretroviral. Sin embargo, Parathyras J *et al*. (2009) estudiaron la

implicancia de este SNP en la recuperación inmunológica a los 6 meses del inicio de la terapia antirretroviral en individuos infectados por HIV-1 de origen sudafricano, hallando una asociación significativa entre el genotipo *MDR1* -129CC y un mayor aumento del recuento de células T $CD4^+$.

I.6. *P-gp en la infección por HIV-1*

La replicación de virus envueltos como el HIV-1 podría verse afectada por la presencia de P-gp en membrana. Ensayos *in vitro* han sugerido una disminución de la infectividad de HIV-1 en células que sobreexpresan P-gp al afectar la fusión viral y posiblemente la liberación de las partículas virales [Lee CG *et al*., 2000; Speck RR *et al*., 2002; Hulgan T *et al*., 2003]. Sin embargo, no se observó una asociación entre el nivel de expresión transcripcional de *MDR1* y la permisividad a la infección por HIV-1 en células T $CD4^+$ [Bleiber G *et al*., 2004]. Los estudios clínicos también mostraron resultados contradictorios [Ifergan I *et al*. 2002; Kedmi M *et al*., 2007]. Kedmi M *et al*. (2007) encontraron que el alelo *MDR1* 3435T es menos frecuente en adultos infectados por HIV-1 que en donantes de sangre sanos. Sin embargo, Ifergan I *et al*. (2002) no observaron una correlación con el riesgo de infección por HIV-1. Es poco claro por el momento el efecto de la proteína sobre la replicación o infectividad viral.

I.7. *Receptor X de pregnano*

La expresión de *MDR1* esta regulada por el factor de transcripción nuclear receptor X de pregnano (PXR, también llamado SXR, PAR, PRR), codificado por

el gen *NR1I2*, en respuesta a endobióticos y xenobióticos [Geick A *et al*., 2001; Synold TW *et al*., 2001]. Owen A *et al*. (2004 b) mostraron una correlación positiva entre los niveles de ARNm de PXR y los niveles de ARNm *MDR1* en PBMC de donantes sanos. Asimismo, PXR también regula la expresión del citocromo P450 3A4 (CYP3A4) y ha sido descripta una asociación entre los niveles transcripcionales de ambos factores en hígado de humanos [Goodwin B *et al*., 2002].

Hasta el momento, han sido identificados 89 polimorfismos en la región promotora y el intrón 1 de *NR1I2* [Lamba J *et al*., 2008]. Entre ellos, los SNPs T44477C (73%), C63396T (62%) y A69789G (36%) están presentes con alta frecuencia en población caucásica y han sido asociados con alteraciones tanto en la actividad de CYP3A4 en hepatocitos primarios como en el nivel transcripcional de PXR, CYP3A4 y *MDR1* en hígado. El SNP C63396T (rs2472677) se encuentra en el intrón 1b de *NR1I2* e incrementa la unión de factores de transcripción como HNF3β que regula la actividad del promotor de PXR. El alelo PXR 63396T tiene una frecuencia de más del 50% en poblaciones caucásicas (España e Italia) [Siccardi M *et al*., 2008; Schipani A *et al*., 2010] y de aproximadamente el 40% en poblaciones de origen africano (Gana y Kenia) [Schipani A *et al*., 2010]. Este alelo ha sido asociado con una mayor actividad de CYP3A4 en hepatocitos primarios y un mayor nivel de ARNm PXR en hígado de donantes adultos [Lamba J *et al*., 2008]. Además, pacientes infectados por HIV-1 homocigotas PXR 63396TT presentaron una concentración valle del PI atazanavir en plasma significativamente menor que la concentración mínima efectiva (150 ng/ml), sugiriendo que PXR podría ser un factor importante en la

regulación de la disposición de las drogas antirretrovirales [Siccardi M *et al.*, 2008].

II - OBJETIVOS

II.1. *Objetivo general*

El objetivo general es evaluar la influencia de polimorfismos en los genes *MDR1* y PXR en la infección pediátrica por HIV-1, la respuesta al tratamiento antirretroviral y la expresión de P-gp.

II.2. *Objetivos específicos*

- Estimar la frecuencia de los polimorfismos T-129C, C1236T y C3435T de *MDR1* y C63396T de PXR en población general argentina y en niños infectados por transmisión vertical.

- Analizar el efecto de los polimorfismos T-129C, C1236T y C3435T de *MDR1* y C63396T de PXR en:

  i) la transmisión vertical del HIV-1

  ii) la progresión a SIDA pediátrico

  iii) la concentración plasmática de drogas antirretrovirales

  iv) la respuesta virológica a HAART

  v) la respuesta inmunológica a HAART

  vi) la expresión de P-gp en linfocitos $CD4^+$

- Estudiar el nivel de expresión de P-gp en linfocitos $CD4^+$ en relación con la edad y el estatus de infección por HIV-1.

III - MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. *Grupos de estudio*

III.1.1. *Niños expuestos al HIV-1 por transmisión vertical*

Se estudiaron niños nacidos de madres con serología positiva para HIV-1 entre 1986 y 2006 que asistieron al Hospital de Pediatría "Juan P. Garrahan" para el diagnóstico y seguimiento clínico de la infección.

III.1.1.1. *Subgrupo utilizado para el estudio de transmisión vertical y progresión a SIDA (CAPÍTULO 1)*

La cohorte pediátrica incluyó 128 niños expuestos no infectados (64 niñas y 64 niños) y 219 niños infectados por HIV-1 (114 niños y 105 niñas). La mayor proporción de niños infectados respecto a los niños expuestos no infectados no es indicativa de la tasa de transmisión, ya que esta diferencia se debe a que el Hospital Garrahan no cuenta con servicio de maternidad y los pacientes son referidos al mismo, en algunos casos, ya con sintomatología asociada a SIDA. Del total de pacientes, 53 pares madre-hijo (39 expuestos no infectados y 14 infectados por HIV-1) recibieron las tres partes (prenatal, intraparto y postnatal en el neonato) del régimen de zidovudina del Protocolo 076 del Grupo de Estudios Clínicos Pediátricos en SIDA (PACTG) [Connor EM *et al*., 1994], mientras que a 34 pares (6 expuestos no infectados y 28 infectados por HIV-1) se les administró AZT a la madre durante el parto y al recién nacido. Un total de 221 niños (55 expuestos no infectados y 166 infectados por HIV-1) no recibieron profilaxis con AZT y en 39 niños (28 expuestos no infectados y 11 infectados por HIV-1) la información no estaba disponible. Para el análisis

estadístico, se seleccionaron los pares madre-hijo que no recibieron profilaxis antirretroviral. La mediana de tiempo de seguimiento de la cohorte fue de 108 meses (4 - 232 meses), 65% de los niños infectados por HIV-1 progresaron a SIDA y solo 6 murieron durante el periodo de estudio, el cual finalizó en mayo del 2006. Todos del niños recibieron terapia HAART durante el periodo de estudio, que incluyó una combinación de: 1 a 4 NRTI más 1 o 2 NNRTI (16 y 1 pacientes, respectivamente) o 1 a 4 NRTI más 1 o 2 PI (152 y 4 pacientes, respectivamente). De ellos, 84 niños progresaron a SIDA antes de iniciar el tratamiento HAART. El análisis de tiempo libre de evento (SIDA) fue realizado en 171 pacientes de los cuales se disponía de datos clínicos.

III.1.1.2. *Subgrupo utilizado para el estudio de la determinación de la concentración de lopinavir en plasma y la respuesta a HAART (CAPÍTULO 2)*

De la cohorte pediátrica descripta en el punto III.1.1.1 de esta sección, 38 niños (21 niños y 17 niñas) fueron incluidos en el estudio farmacogenético y se les realizó el monitoreo de LPV. Al momento de la determinación de LPV, todos los niños recibían un régimen de HAART con LPV en combinación con ritonavir como únicos PI, excepto por 2 pacientes quienes recibieron además amprenavir. La dosis oral de LPV fue 230 y 300 mg/m^2/12hs para niños mayores y menores de 6 meses, respectivamente. El recuento de células T CD4$^+$ y la carga viral fueron analizados antes y después del inicio de tratamiento con LPV/r.

III.1.1.3. *Subgrupo utilizado para el estudio del nivel de expresión de P-gp en linfocitos CD4$^+$ (CAPÍTULO 3)*

A partir del año 2010 se estudió un grupo de 7 niños verticalmente infectados por HIV-1 (2 niños y 5 niñas) con reciente diagnóstico realizado en el Hospital Garrahan. A cada uno de estos pacientes se le realizó una primera determinación de la expresión de P-gp en linfocitos CD4$^+$ por citometría de flujo en el periodo comprendido entre la confirmación del diagnóstico y el inicio del tratamiento HAART.

III.1.2. *Población general argentina*

Para el estudio de la distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas de los SNPs, se incluyeron 231 donantes de sangre con serología negativa para HIV-1, que concurrieron al Banco de Sangre del Hospital Garrahan. Las muestras de sangre se obtuvieron al azar y fueron reclutadas, a razón de tres tubos, una vez por semana, en forma anónima no rastreable (muestra disociada). Esta metodología consiste en la enumeración de los tubos, con la indicación de la edad, sexo y fecha de extracción. En el Servicio de Hemoterapia se realiza diariamente la determinación de la serología para el HIV-1 mediante el test de tamizaje de ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas). Si en ese día todas las muestras testeadas en el Servicio presentaban serología negativa para HIV-1, se procedió a procesar las mismas. En caso contrario, se descartaron las muestras. Esta metodología fue aprobada por el Comité de Ética del Hospital Garrahan.

Por otra parte, para el estudio de la expresión de P-gp en linfocitos $CD4^+$ se obtuvieron muestras de sangre de 20 individuos (grupo de normales pediátricos) con un rango de edad de 10 meses a 18 años, que concurren al Hospital Garrahan para la realización de intervenciones quirúrgicas (ejemplo: labio leporino, hernia umbilical, pie equinovaro, mamelones, cálculos vesiculares, entre otros). Los criterios de inclusión de estos normales pediátricos en el estudio fueron la ausencia de infecciones durante el último año y la no ingesta de medicación durante la semana previa a la toma de la muestra. Estos criterios fueron evaluados mediante un cuestionario específicamente diseñado para este estudio.

III.1.3. *Consideraciones éticas*

El Comité de Ética y el Comité de Revisión de Proyectos de Investigación del Hospital Garrahan aprobaron el estudio, el cual se encuentra registrado bajo el número 640. Se obtuvieron los consentimientos informados de los donantes de sangre adultos y de los padres o tutores de los niños.

III.2. *Métodos*

III.2.1. *Obtención y preparación de muestras clínicas*

III.2.1.1. *Obtención de células mononucleares a partir de sangre periférica*

A partir de sangre periférica (aproximadamente 5 ml) anticoagulada con EDTA (acido etilendiaminotetraacético) 10% se realizó una dilución al medio con solución fisiológica y se aislaron PBMC mediante gradiente de Ficoll-Triyosom (*GE Healthcare*, 50 M, amidotrizoato sódico 50%, densidad= 1,077 gr/ml, medida a 4ºC) luego de una centrifugación a 1500 rpm, durante 30 minutos a 4ºC. Posteriormente, se descartó el plasma y se realizaron dos lavados de las células con solución fisiológica (centrifugación a 1800 rpm, durante 10 minutos). En caso de ser necesario, se realizó una lisis de glóbulos rojos con agua destilada estéril durante un minuto, ya que la presencia de hemoglobina puede inhibir la posterior reacción de amplificación de ADN. Finalmente, se realizó el recuento de las PBMC obtenidas mediante contador hematológico o cámara de Neubauer y se les realizó un lavado con solución fisiológica.

III.2.1.2. *Preparación de lisados celulares a partir de PBMC*

A partir de las PBMC conservadas a una temperatura de –20ºC en alícuotas de $2x10^6$ células, se prepararon los lisados con solución C (200 µl, Tris-Cl 5 mM pH= 8,3, Tween 20 0,5%, Tritón X100 0,5%) y proteinasa K en una concentración final de 20 µg/ml. El tiempo y la temperatura de actividad de la

enzima fueron de 60 minutos y 56°C, respectivamente. Posteriormente, la enzima se inactivó durante 15 minutos a 95°C y los lisados celulares se conservaron a –20°C.

III.2.1.3. *Obtención de ADN genómico*

Se extrajo el ADN genómico a partir de PBMC o sangre periférica utilizando precipitación salina o un método comercial, respectivamente; de acuerdo con la disponibilidad en la institución a lo largo del tiempo.

III.2.1.3.1. *Extracción de ADN genómico a partir de PBMC*

A partir de las PBMC conservadas a –20°C, se procedió a realizar la lisis de glóbulos blancos con buffer de WCLB (Tris-Cl 2 M, EDTA 0,5 M pH= 8, NaCl 5 M, SDS 10%) y proteinasa K (20,85 mg/ml). Se realizó una incubación durante toda la noche a 55°C y posteriormente se efectuó un lavado con NaCl 5 M y centrifugación a 13000 rpm, durante 30 minutos. Se descartó el sobrenadante y se precipitó el ADN con etanol 100%. Posteriormente, se realizaron dos lavados con dos volúmenes de etanol 70% y se dejó secar en estufa a 37°C. Finalmente, se resuspendió el ADN en buffer TE (Tris 1 M pH= 8, EDTA 0,5 M) y se conservó a una temperatura de –20°C.

III.2.1.3.2. *Extracción de ADN genómico a partir de sangre periférica*

Se utilizó el kit comercial *QIAmp DNA Mini Kit* (*QIAGEN*) para la extracción de ADN genómico a partir de 200 µl sangre periférica conservada a –80ºC o 200 µl de una suspensión de PBMC conservada a –20ºC siguiendo las indicaciones del fabricante. El ADN obtenido se conservó a una temperatura de –20ºC.

III.2.1.3.3. *Cuantificación de ADN*

El ADN extraído se cuantificó por espectrofotometría, midiendo la absorbancia a 260 nm (longitud de onda de absorción de ADN) y 280 nm (longitud de onda de absorción de proteínas). Se obtuvo la concentración de ADN considerando que un valor de absorbancia a 260 nm de una densidad óptica (DO) corresponde aproximadamente a 50 µg/ml, para el caso de ADN doble hebra y usando la fórmula:

Concentración = absorbancia a 260 nm X 50 µg/ml X factor de dilución

La pureza del ADN extraído se calculó en base a la relación entre la absorbancia a 260 nm y la absorbancia a 280 nm. La pureza esperada corresponde a una relación entre 1,7 y 2,0.

III.2.2. *Genotipificación de las variantes polimórficas de MDR1 y PXR*

Los genotipos de *MDR1* y PXR fueron identificados por ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y posterior empleo de ensayos de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP). Los SNPs C1236T (rs1128503) y C3435T (rs1045642) de *MDR1* fueron genotipificados en base al reporte previo de Cascorbi I *et al*. (2001) y el SNP T-129C (rs3213619) de *MDR1* fue genotipificado en base al reporte de Furuno T *et al.* (2002). Usando las secuencias de *primers* gentilmente provistas por Siccardi M *et al.* (2008) fue diseñado un ensayo de PCR-RFLP para el SNP C63396T (rs2472677) de PXR.

III.2.2.1. *Amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa*

Los ensayos de PCR se realizaron a partir de lisados de PBMC o muestras de ADN genómico. Se utilizó una mezcla de reacción que incluyó buffer de reacción ($MgCl_2$ 1,5 mM), dNTPs, *primers*, Cl_2Mg, enzima Taq polimerasa (*Go Taq, Promega*), 200 a 500 ng de ADN o 5 a 10 μl de lisado celular y agua (libre de DNAsa) en un volumen final de 50 μl. El control negativo de la reacción de PCR se preparó con la mezcla de reacción, en ausencia de muestra y con el agregado agua para completar el volumen final.

Los programas consisten en un primer paso de desnaturalización de la doble hélice de ADN a 94°C, luego un segundo paso de *annealing* (hibridación) del *primer* con el templado de ADN a una temperatura que depende

específicamente de cada par de *primers* y se calcula en base a la siguiente fórmula:

T melting (fusión) = 4ºC X (G + C) + 2ºC X (A + T)

G, C, A, T es el número de los correspondientes nucleótidos en el *primer*

La temperatura de *annealing* seleccionada suele ser aproximadamente 5ºC menor que la temperatura de fusión. Finalmente, se realizó un tercer paso de extensión de la doble cadena de ADN a 72ºC. Este ciclo de amplificación se repite 35 veces. Cada reacción de amplificación se encuentra precedida por una desnaturalización inicial a 94ºC y seguida de una elongación final a 72ºC.

En la **figura M1** se muestran los productos de PCR de 215 pb (*MDR1* T-129C), 366 pb (*MDR1* C1236T), 197 pb (*MDR1* C3435T) y 134 pb (PXR C63396T).

SNP *MDR1* T-129C:

5´ -

AGTCATCTGTGGTGAGGCTGATTGGCTGGGCAGGAACAGCGCCGGGGCGTGGGCTGA

GCACAGCCGCTTCGCTCTCTTTGCCACAGGAAGCCTGAGCTCATTCGAG**(T/ C) AGCGG**C

TCTTCCAAGCTCAAAGAAGCAGAGG**CCGCTG**TTCGTTTCCTTTAGGTCTTTCCACTAAAGT

CGGAGTATCTTCTTCCAAAATT**TCACGTCTTGGTGGCCGTT**

***Primer* MDR129 (*foward*):** 5´ - AGTCATCTGTGGTGAGGCTG

***Primer* MDR129 (*reverse*):** 5´ - AACGGCCACCAAGACGTGA

Tamaño del amplicón: 215 pb

Enzima de restricción: *MspA1I*

SNP *MDR1* C1236T:

5´ -

TATCCTGTGTCTGTGAATTGCCTTGAAGTTTTTTTCTCACGGTCCTGGTAGATCTTGAAG

GG(C/ T) CTGAACCTGAAGGTGCAGAGTGGGCAGACGGT**GGCC**CTGGTTGGAAACAGTG

GCTGTGGGAAGAGCACAACAGTCCAGCTGATGCAGAGGCTCTATGACCCCACAGAGGGG

ATGGTGAGATGACCCATGCGAGCTAGACTGCGGTGATCAGCAGTCACATTCACATCTTTCT

GATGTTGCCCTTTCAATTACAAATGTATGAAAGTCACACTTACTTTTTATTCCAGGTCAGTG

TTGATGGACAGGATATTAGGACCATAAATGTAAGGTTTCTACGGGAAAT**CATTGGTGTGG**

TGAGTCAGG

***Primer* MDR15 (*foward*):** 5´ - TATCCTGTGTCTGTGAATTGC

***Primer* MDR16 (*reverse*):** 5´ - CCTGACTCACCACACCAATG

Tamaño del amplicón: 366 pb

Enzima de restricción: *HaeIII*

SNP *MDR1* C3435T:

5´ -

TGTTTTCAGCTGCTTGATGGCAAAGAAATAAAGCGACTGAATGTTCAGTGGCTCCGGCA

CACCTGGGCATCGTGTCCCAGGAGCCCATCCTGTTTGACTGCAGCATTGCTGAGAACATTG

CCTATGGAGACAACAGCCGGGTGGTGTCACAGGAAGA**GAT(C/ T)** GTGAGGGCAGCAAA

G**GAGGCCAACATACATGCCTT**

***Primer* MDR11 (*foward*):** 5´ - TGTTTTCAGCTGCTTGATGG

***Primer* MDR12 (*reverse*):** 5´ - AAGGCATGTATGTTGGCCTC

Tamaño del amplicón: 197 pb

Enzima de restricción: *Mbo1*

SNP PXR C63396T:

5´ -

GCACAAACATTTTCAATTTCAATGAAGTTCAATTTATCAACTTTTTTGTGCCATATTTTTT

(C/ T) TGATTAAAAAACAAACAAACACAAACAAAAAAAAACTTTTAAA**AGACAGGAATAG**

AATAAGTCTTCCGAATG

***Primer* PXR63396 (*foward*):** 5´ - GCACAAACATTTTCAATTTCAATGAAGTTCA

***Primer* PXR63396 (*reverse*):** 5´ - CATTCGGAAGACTTATTCTATTCCTGTCT

Tamaño del amplicón: 134 pb

Enzima de restricción: *Hpy188I*

FIGURA M1. ***Secuencia nucleotídica de la región genómica amplificada para cada polimorfismo.*** En negrita y subrayado se muestra el sitio de *annealing* con los *primers*. En negrita y sombreado se muestra el polimorfismo y el sitio de corte de la enzima de restricción.

III.2.2.2. *Digestión de los productos de amplificación con enzimas de restricción*

Los amplicones de PCR fueron digeridos durante 3 hs (*MDR1* C1236T y *MDR1* C3435T) o toda la noche (*MDR1* T-129C y PXR C63396T) a 37°C con las enzimas de restricción *HaeIII* (*Fermentas*), *MboI* (*Fermentas*), *MspA1I* (*New England Biolabs*) y *Hpy188I* (*New England Biolabs*), respectivamente.

- **SNP *MDR1* T-129C:** *MspA1I* tiene dos sitios de restricción en el amplicón, uno de ellos correspondiente al polimorfismo *MDR1* T-129C. Esta enzima cliva el producto amplificado en tres fragmentos de 109, 74 y 32 pb en presencia del alelo *MDR1* -129C y en dos fragmentos de 141 y 74 pb en presencia del alelo *MDR1* -129T.

- **SNP *MDR1* C1236T:** *HaeIII* tiene dos sitios de restricción en el amplicón, uno de ellos correspondiente al polimorfismo *MDR1* C1236T. Esta enzima corta al amplicón en tres fragmentos de 269, 62 y 35 pb en presencia del alelo *MDR1* 1236C y en dos fragmentos de 269 y 97 pb en presencia del alelo *MDR1* 1236T.

- **SNP *MDR1* C3435T:** *MboI* tiene solo un sitio de restricción en el amplicón. Esta enzima corta el producto de PCR en dos fragmentos de 158 y 39 pb en presencia del alelo *MDR1* 3435C pero no lo corta en presencia del alelo *MDR1* 3435T.

- **SNP PXR C63396T:** *Hpy188I* tiene dos sitios de restricción en el amplicón, uno de ellos correspondiente al polimorfismo PXR C63396T. Esta enzima cliva el producto amplificado en tres fragmentos de 66, 63 y 5 pb en presencia del alelo PXR 63396C y en dos fragmentos de 129 y 5 pb en presencia del alelo PXR 63396T.

Una alícuota del producto de amplificación (5 a 30 μl) se digirió con una mezcla de reacción que contenía buffer de reacción, seroalbúmina bovina (BSA) y el número de unidades enzimáticas correspondiente a cada ensayo. El volumen final de reacción fue de 15 a 50 μl; este parámetro, además de la temperatura y los tiempos de incubación, se determinó en forma experimental. En la **tabla M1** se muestran las enzimas de restricción utilizadas en los ensayos de digestión y la secuencia reconocida por las mismas.

TABLA M1. ***Enzimas de restricción y los sitios blanco correspondientes***

Enzima de restricción	Sitio de corte
MspA1I	5´ ...**C**MG* CKG...3´ 3´ ...GMC* GKC...5´
HaeIII	5´ ...GG* **C**C...3 3´ ...CC* GG...5´
MboI	5´ ...* GAT**C** ...3´ 3´ ... CTAG* ...5´
Hpy188I	5´ ...T**C** N* GA...3´ 3´ ...CG* N CT...5´

Con un asterisco se muestra el sitio exacto de corte de la enzima. En negrita y subrayado se muestra la base polimórfica.

III.2.2.3. *Electroforesis en gel de agarosa*

A fin de testear la correcta amplificación de los distintos fragmentos en la reacción de PCR, se realizó un gel de agarosa 2,5% (*Ultra pure TM agarose, Invitrogen* en buffer TAE 1X) teñido con bromuro de etidio 1X (0,5 μg/ml, 1 μl por cada 10 ml de gel), en el cual se sembraron 10 μl del producto de amplificación con aproximadamente 1 μl de buffer de siembra (glicerol 50%, azul de bromofenol 0,2%, xylene cyanol 0,2%, pH= 8,3). Luego de la corrida electroforética efectuada a voltaje constante (90 mV) en la que se utilizó como buffer de corrida TAE 1X (TAE: trizma base 4,85 gr/l, ácido acético 1,15 ml, EDTA disódico 0,37 gr/l), se procedió a visualizar las bandas de ADN bajo luz UV con el sistema de imagen *El Logic* (*Kodak*). Para determinar el tamaño de las bandas, se sembró además en los geles un marcador de peso molecular de ADN (50 pb).

Los productos de digestión fueron separados en gel de agarosa 4,5% (*MDR1* C1236T y PXR C63396T) o 3,5% (*MDR1* C3435T y *MDR1* T-129C) con buffer TAE 1X, teñido con el marcador de ADN (*Gel Star Nucleic Acid Gel Stain)* en 1X (1 μl por cada 10 ml de gel) que permite visualizar fragmentos de bajo peso molecular. En el gel se sembró el volumen final de digestión. En la **figura M2** se muestran ejemplos de los perfiles de PCR-RFLP para los genotipos de T-129C, C1236T y C3435T de *MDR1* y C63396T de PXR.

FIGURA M2A

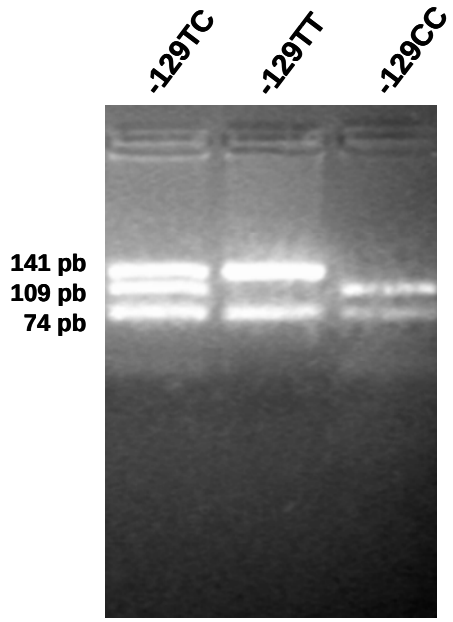


FIGURA M2B

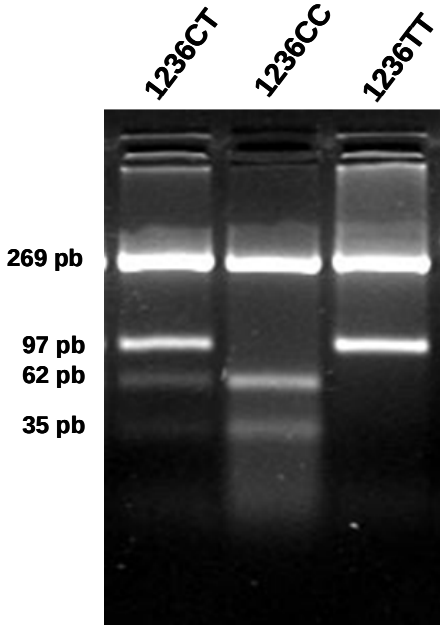


FIGURA M2C

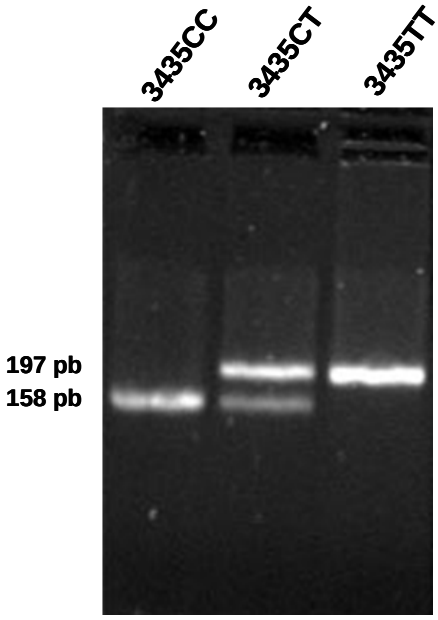


FIGURA M2D

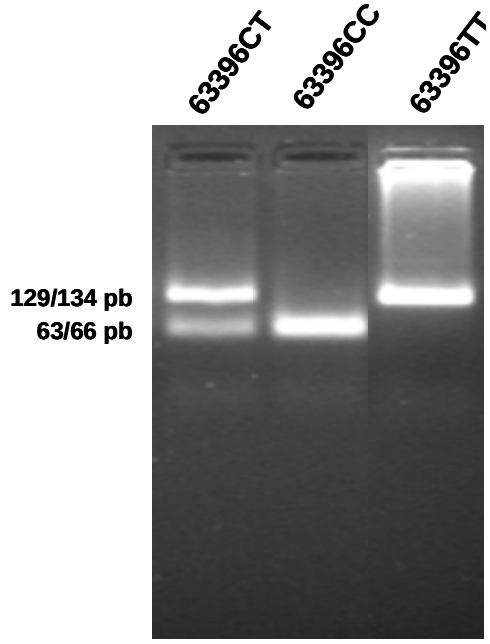


FIGURA M2. ***Perfiles de PCR-RFLP de los polimorfismos MDR1 T-129C (A), MDR1 C1236T (B), MDR1 C3435T (C) y PXR C63396T (D).*** Para cada uno de los SNPs se muestran los tres genotipos.

III.2.3. *Genotipificación de las variantes polimórficas de CCR5 y SDF1*

Los alelos CCR5-wild type y CCR5-Δ32 fueron amplificados por PCR usando *primers* específicos [Mangano A *et al*., 1998] a partir de lisados de PBMC o muestras de ADN genómico. Los productos de PCR de 182 pb correspondiente al alelo CCR5-*wild type* y 150 pb correspondiente al alelo CCR5-Δ32 fueron separados en geles de agarosa 2,5%. El polimorfismo SDF1-3´A fue determinado mediante un ensayo de PCR-RFLP amplificando un fragmento del 3´UTR del gen usando los *primers* reportados por Winkler C *et al*. (1998). El producto de PCR fue digerido con la enzima *MspI* (*New England Biolabs*) y los fragmentos resultantes de 302 pb para el alelo SDF1-3´A y dos fragmentos de 202 y 100 pb para el alelo SDF1-*wild type* fueron identificados en gel de agarosa 2,5%.

III.2.4. *Medición de la concentración plasmática de lopinavir*

El nivel plasmático de LPV fue determinado a partir de sangre extraída inmediatamente antes de la administración de la siguiente dosis de droga (C_{valle}) y entre 1 a 2 hs luego de la administración de la dosis de la mañana ($C_{post\text{-}dosis}$) en el Hospital Garrahan. Se realizó solo una determinación de C_{valle} y una determinación de $C_{post\text{-}dosis}$ por paciente. Se obtuvo el registro de datos de dosificación y momento de muestreo. La adherencia al tratamiento antirretroviral en la semana previa al monitoreo de droga fue evaluada utilizando un cuestionario específicamente diseñado para este estudio y realizado al paciente al momento de la administración de la droga. La

información adicional incluyó información demográfica y antropométrica, parámetros clínicos, virológicos e inmunológicos, exposición previa a PI y duración del tratamiento antirretroviral. La medición de la concentración plasmática de la droga fue realizada por la Cátedra de Farmacología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UBA (Dr. Guillermo F. Bramuglia y colaboradores) mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección ultravioleta como fue descrito por Curras V *et al.* (2009). El menor límite de cuantificación para LPV fue de 50 ng.

III.2.5. *Marcadores bioquímicos de seguimiento*

La respuesta virológica e inmunológica fue evaluada retrospectivamente. El recuento de células T $CD4^+$ y la carga viral fueron analizados antes y después del inicio de HAART con LPV/r. Los datos basales correspondieron a la determinación hecha dentro de un periodo de hasta 24 semanas previo a la exposición de LPV/r. La carga viral fue analizada alrededor de la semana 18 (2 - 46) y 36 (10 - 94) y el recuento de células T $CD4^+$ alrededor de la semana 21 (2 - 57) y 41 (8 - 93) luego del inicio de tratamiento.

III.2.5.1. *Marcadores virológicos*

La viremia plasmática se determinó mediante la cuantificación de la carga viral (log_{10} copias de ARN de HIV-1/ ml de plasma) utilizando métodos comerciales de acuerdo con su disponibilidad en la institución a lo largo del tiempo. Se empleó *HIV-1 RNA QT Nuclisens* (*Organon Teknika*) desde mayo 1998 a junio 2005, *Amplicor HIV-1 Monitor test v 1.5* (*Roche Diagnostics Systems*) desde

junio 2005 a octubre 2007 y *HIV-1 RNA Cobas® TaqMan 48* (*Roche Diagnostic Systems*) desde octubre 2007 al presente.

III.2.5.2. *Marcadores inmunológicos*

El recuento de células T $CD4^+$ (% de células T $CD4^+$) se realizó a partir de sangre entera por citometría de flujo (*FACS sorter, Becton Dickinson*). Esta medición fue realizada por el Laboratorio de Inmunología del Hospital Garrahan, a cargo del Dr. Jorge Rossi.

III.2.6. *Marcadores clínicos de la infección*

El estadío de la infección por HIV-1 y la definición de SIDA fueron establecidos de acuerdo con el criterio de clasificación para niños del Centro de control y prevención de enfermedades [CDC, 1994]. Estos datos fueron recolectados mediante la revisión de historias clínicas del Hospital Garrahan.

III.2.7. *Determinación de la expresión de P-gp en linfocitos $CD4^+$ por citometría de flujo*

Se realizó la puesta a punto del ensayo de citometría de flujo en base al reporte de Ford J *et al.* (2003). La detección de P-gp se realizó utilizando un anticuerpo monoclonal de ratón (IgG2a) conjugado a ficoeritrina (PE) que reconoce un epítope de P-gp humana (UIC2, *Immunotech*) y un anticuerpo control de isotipo de rata (IgG2a) conjugado a PE (*Serotech*). La marcación de células $CD4^+$ se realizó usando un anticuerpo anti-CD4 conjugado a isotiocianato de fluoresceína

(FITC) (*Becton Dickinson*). A partir de $8x10^5$ PBMC aisladas de sangre periférica mediante gradiente de densidad (como se detalla en el punto III.2.1.1 de esta sección), se obtuvo un pellet de estas células realizando un lavado (1 ml de buffer fosfato salino (PBS) 1X frío, centrifugación a 1500 rpm, durante 6 minutos a 4°C y descarte del sobrenadante) y se agregó 100 µl de fijador celular (*Caltag Laboratories*) incubando durante 15 minutos a temperatura ambiente. Luego, se realizó un lavado de las células y se resuspendieron en PBS 1X frío. Se agregaron 35 µl de anticuerpo anti-P-gp, 5 µl de anticuerpo anti-CD4 y $4x10^5$ PBMC y por otra parte se marcaron $4x10^5$ PBMC con 5 µl de la dilución 1/30 de anticuerpo control de isotipo y 5 µl de anticuerpo anti-CD4. Ambos tubos se incubaron durante 90 minutos a 4°C en oscuridad. Posteriormente se realizaron dos lavados y las células se resuspendieron en 200 µl de PBS 1X frío y guardadas en heladera hasta ser pasadas por el citómetro (*FACS sorter, Becton Dickinson*), equipado con un láser de argón con longitud de onda de excitación de 488 nm. Se detectaron las señales de *forward scatter* (FSC) y *side scatter* (SSC) en una escala lineal y la fluorescencia en una escala logarítmica. Para cada muestra analizada se determinó un número de aproximadamente 10.000 eventos de linfocitos $CD4^+$. El análisis de los datos se realizó utilizando el programa FlowJo versión 5.7.3.

III.2.8. *Análisis estadístico*

Las frecuencias genotípicas fueron estimadas por conteo directo de alelos. El ajuste al equilibrio de Hardy-Weinberg fue testeado con la prueba de χ^2 de Pearson. La prueba de Fisher-Freeman-Halton fue usada para evaluar la independencia marginal en tablas de contingencia y el valor *p* fue estimado con

el método de Montecarlo. Se optó por una simulación de Montecarlo debido a que algunos valores marginales elevados no permitieron el cálculo exacto del *p* valor. Las frecuencias haplotípicas fueron estimadas usando el Algoritmo de Maximización de la Esperanza (*www.bioinfo.iconcologia.net/snpstats*). El desequilibrio de ligamiento fue evaluado con el estadístico D´ y testeado con la prueba de χ^2 de Pearson. Se utilizó el método de Kaplan-Meier para estimar la progresión a la enfermedad y las curvas de sobrevida. Los riesgos relativos fueron calculados para un modelo de Riesgos Proporcionales de Cox. Se incluyó alternativamente la exposición o no a HAART como un estrato dependiente del tiempo (ajuste de HAART). También analizamos los alelos CCR5-Δ32 y SDF1-3´A como potenciales confundentes en un modelo estratificado. Se aplicó la formulación de Andersen-Gill del modelo de Riesgos Proporcionales como un proceso de conteo [Andersen PK y Gill RD *et al*., 1982]. Esta formulación no asume que el paciente es seguido desde el tiempo cero, y es útil, en forma general, para introducir un ajuste por una covariable dependiente del tiempo (en nuestro caso: el tratamiento). La intención fue controlar una diferencia en el riesgo de SIDA dentro de cada paciente debido a diferencias en la edad al inicio de HAART y la duración de HAART. Se evaluó el ajuste general con la prueba de Razón de Verosimilitud, mientras que los contrastes entre genotipos para un modelo genético codominante fueron analizados con la prueba de Wald. El tiempo de seguimiento para los niños que no progresaron a SIDA fue la edad al momento de corte del estudio. Hasta este tiempo no se registraron pacientes con pérdidas de seguimiento. Las diferencias entre genotipos de *MDR1* y PXR en relación a las concentraciones valle y post-dosis de LPV, los niveles basales y los cambios en la carga viral y en el recuento de células T $CD4^+$ y los niveles de expresión de P-gp en linfocitos $CD4^+$ fueron analizadas con la prueba de

Kruskal-Wallis aplicando la corrección por Bonferroni para pruebas múltiples cuando fue necesario. La relación entre el porcentaje de células P-gp$^+$ en la población de linfocitos CD4$^+$ y la edad al momento de la determinación se evaluó mediante la prueba de correlación de rangos de Spearman. Se utilizó la prueba de Mann-Whitney para evaluar diferencias entre los niños infectados por HIV-1 y los normales pediátricos en relación a los niveles de expresión de P-gp en linfocitos CD4$^+$. Las pruebas estadísticas fueron realizadas utilizando los programas Graphpad Prism versión 2.01 y Statistix versión 7. Todas las pruebas fueron de dos colas con un nivel de significancia de 0,05.

IV - RESULTADOS

CAPÍTULO 1 - EFECTO DE LOS POLIMORFISMOS DE *MDR1* Y PXR EN LA TRANSMISIÓN VERTICAL DEL HIV-1 Y EN LA PROGRESIÓN A SIDA PEDIÁTRICO

IV.1. *Distribución de los SNPs de MDR1 y PXR en la población general argentina*

Con el objetivo de evaluar la distribución de los genotipos T-129C, C1236T y C3435T de *MDR1* y C63396T de PXR en población argentina, se realizó la genotipificación de un grupo de adultos con serología negativa para HIV-1 (**tabla R1**). Los alelos, 1236T y 3435T de *MDR1*, fueron altamente frecuentes en la población argentina, con una frecuencia del 44%. Las frecuencias genotípicas halladas para el SNP *MDR1* C1236T fueron de 31,17% homocigotas 1236CC, 49,78% heterocigotas 1236CT y 19,05% homocigotas 1236TT. Las frecuencias genotípicas para SNP *MDR1* C3435T fueron: 34,63% homocigotas 3435CC, 43,29% heterocigotas 3435CT y 22,08% homocigotas 3435TT. Para el alelo *MDR1* -129C la frecuencia observada fue baja (5%), con una distribución de genotipos de 90% homocigotas -129TT y 10% heterocigotas -129TC, sin hallarse homocigotas -129CC. El alelo PXR 63396T también fue muy frecuente (46%) en nuestra población, mostrando frecuencias genotípicas de 29% homocigotas 63396CC, 50% heterocigotas 63396CT y 21% homocigotas 63396TT. Las frecuencias alélicas y genotípicas halladas en el grupo de niños infectados por HIV-1 no difirieron significativamente de las observadas en la población general argentina ($p>0,05$). Todos los genotipos estudiados ajustaron al equilibrio de Hardy-Weinberg, indicando que no existe un desvío poblacional en los grupos de estudio.

TABLA R1. ***Frecuencias genotípicas y alélicas de los SNPs T-129C, C1236T y C3435T de MDR1 y C63396T de PXR en donantes con serología negativa para HIV-1 y en niños perinatalmente expuestos al HIV-1***

Alelos y genotipos	Cohorte pediátrica (ajustado por profilaxis con zidovudina) n (%)		*p**	Sin profilaxis con zidovudina n (%)		*p***	Donantes de sangre adultos n (%)
	Infectados por HIV-1	Expuestos no infectados		Infectados por HIV-1	Expuestos no infectados		
***MDR1* -129TT**	200 (91,32)	-		152 (91,57)	53 (96,36)		90 (90,00)
***MDR1* -129TC**	18 (8,22)	-	-	14 (8,43)	2 (3,64)	0,369	10 (10,00)
***MDR1* -129CC**	1 (0,46)	-		0 (00,00)	0 (00,00)		0 (00,00)
Frecuencia del alelo C	0,05	-		0,04	0,02		0,05
***MDR1* 1236CC**	47 (21,46)	35 (27,34)		30 (18,07)	11 (20,00)		72 (31,17)
***MDR1* 1236CT**	109 (49,77)	61 (47,66)	0,715	84 (50,60)	30 (54,54)	0,742	115 (49,78)
***MDR1* 1236TT**	63 (28,77)	32 (25,00)		52 (31,32)	14 (25,45)		44 (19,05)
Frecuencia del alelo T	0,54	0,49		0,57	0,53		0,44
***MDR1* 3435CC**	50 (22,83)	29 (22,66)		33 (19,88)	10 (18,18)		80 (34,63)
***MDR1* 3435CT**	118 (53,88)	65 (50,78)	0,205	90 (54,22)	28 (50,91)	0,785	100 (43,29)
***MDR1* 3435TT**	51 (23,29)	34 (26,56)		43 (25,90)	17 (30,91)		51 (22,08)
Frecuencia del alelo T	0,50	0,52		0,53	0,56		0,44
PXR 63396CC	59 (26,94)	-		48 (28,92)	19 (34,55)		29 (29,00)
PXR 63396CT	100 (45,66)	-	-	74 (44,58)	24 (43,64)	0,659	50 (50,00)
PXR 63396TT	60 (27,40)	-		44 (26,61)	12 (21,82)		21 (21,00)
Frecuencia del alelo T	0,50	-		0,46	0,44		0,46
n	219	128		166	55		100/231

Todas las frecuencias genotípicas ajustaron al equilibrio de Hardy-Weinberg. * Estimación de Montecarlo para la distribución multinomial en tablas de contingencia estratificadas, ** Estimación de Montecarlo para la distribución multinomial en tablas de contingencia (prueba de Fisher-Freeman-Halton).

IV.1.1. *Desequilibrio de ligamiento entre los SNPs C1236T y C3435T de MDR1*

Posteriormente, se analizó la relación de ligamiento entre los SNPs C1236T y C3435T de *MDR1* y, como fue descrito previamente, encontramos en nuestra población un fuerte desequilibrio de ligamiento entre los polimorfismos C1236T y C3435T de *MDR1* ($D = 0{,}155$, $D' = 0{,}633$, $r = 0{,}630$, $p < 0{,}05$). El alelo *MDR1* 3435T se encuentra ligado al alelo *MDR1* 1236T, definiendo nueve pares de haplotipos. En la **figura R1** se muestran las frecuencias haplotípicas de los tres grupos estudiados (donantes de sangre adultos, niños infectados y niños expuestos no infectados). Los pares de haplotipos doble heterocigota (*MDR1* 3435CT/1236CT) y doble homocigota (*MDR1* 3435CC/1236CC y *MDR1* 3435TT/1236TT) fueron los de mayor ocurrencia con frecuencias mayores al 12%. Además, no se observaron diferencias significativas entre las frecuencias haplotípicas de los grupos estudiados.

IV.2. *Rol de los genotipos de MDR1 y PXR en la transmisión vertical del HIV-1*

Una vez establecida la distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas en población general, investigamos si los polimorfismos de *MDR1* y PXR están asociados con la transmisión perinatal del HIV-1. Se analizó la distribución de los genotipos T-129C, C1236T y C3435T de *MDR1* y C63396T de PXR en 219 niños infectados por HIV-1 y 128 niños expuestos no infectados (EU) nacidos de madres con serología positiva para HIV, que representó el grupo control de alto riesgo (**tabla R1**). La distribución de genotipos de *MDR1* y PXR fue similar

entre los dos grupos cuando el análisis fue ajustado por la profilaxis con zidovudina y cuando el análisis fue restringido a niños que no recibieron profilaxis con zidovudina para prevenir la transmisión madre-hijo en los subgrupos de infectados (n= 166) y expuestos no infectados (n= 55). Estos hallazgos sugieren que los SNPs T-129C, C1236T y C3435T de *MDR1* y C63396T de PXR no afectarían la infección natural por HIV-1 a través de la transmisión vertical en la cohorte pediátrica estudiada.

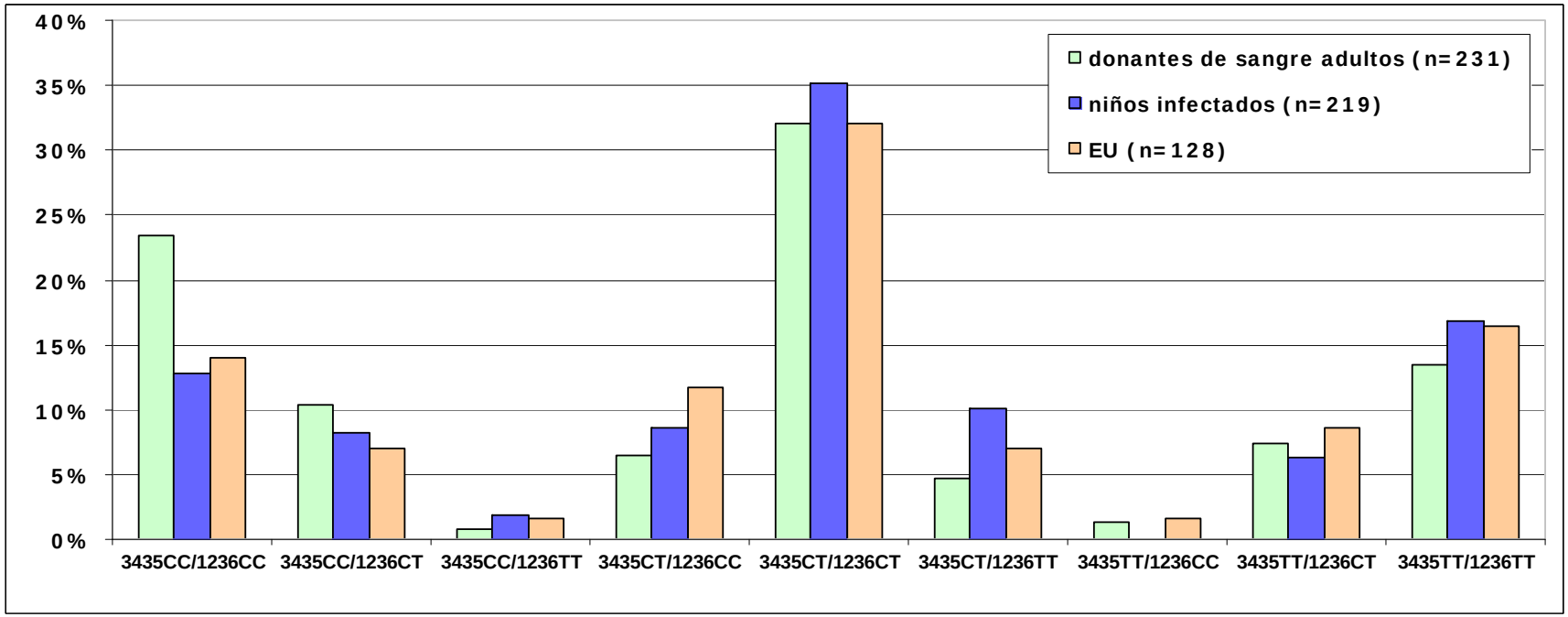


FIGURA R1. ***Frecuencia de los pares de haplotipos de MDR1 (C3435T, C1236T) en donantes de sangre con serología negativa para HIV-1 y en niños perinatalmente expuestos al HIV-1.*** EU: niños expuestos no infectados por HIV-1.

IV.3. *Influencia de los genotipos de MDR1 y PXR en la progresión a SIDA pediátrico*

Otro de los objetivos fue examinar la influencia de los genotipos de *MDR1* y PXR en la progresión a SIDA pediátrico. Para ello, del total de 219 niños infectados por HIV-1, se pudieron evaluar 171 niños de los cuales se disponía de datos clínicos. La mediana de tiempo de seguimiento fue de 108 meses (4 – 232 meses) y 111 niños infectados por HIV-1 progresaron a SIDA durante el periodo de estudio. Se realizó un estudio retrospectivo con curvas de Kaplan-Meier para tiempo a SIDA y el modelado por Regresión de Riesgos Proporcionales de Cox. Los niños heterocigotas *MDR1* 3435CT presentaron un retraso significativo en el tiempo de desarrollo de SIDA de aproximadamente 40 meses respecto de los niños homocigotas *MDR1* 3435CC (p= 0,005; **figura R2A**). Esta diferencia se evidencia al comparar las medianas de tiempo libre de SIDA de 63 meses y 23 meses, respectivamente. Asimismo, los niños heterocigotas *MDR1* 1236CT y homocigotas *MDR1* 1236TT mostraron un retraso en el tiempo de progresión a SIDA de aproximadamente 36 y 23 meses, respectivamente, en comparación a los niños homocigotas *MDR1* 1236CC (p= 0,024 y p= 0,026, respectivamente; **figura R2B**). Las medianas de tiempo libre de SIDA fueron de 52, 39 y 16 meses para los niños heterocigotas *MDR1* 1236CT, homocigotas *MDR1* 1236TT y homocigotas *MDR1* 1236CC, respectivamente. Además, se evaluó el efecto del SNP *MDR1* T-129C en la progresión a la enfermedad, no hallando diferencias significativas entre los niños homocigotas *MDR1* -129TT y los niños *MDR1* -129TC (p= 0,124; **figura R2C**).

Cuando el análisis se restringió al periodo previo al inicio de HAART (eventos de SIDA previo al inicio de HAART= 84), se observaron las mismas tendencias para *MDR1* 3435CT (p= 0,011, RR= 0,529, IC= 0,324–0,865), *MDR1* 1236CT (p= 0,063, RR= 0,617, IC= 0,372–1,103) y *MDR1* 1236TT (p= 0,069, RR= 0,574, IC= 0,316–1,040) (datos no mostrados). Sin embargo, el número de eventos de SIDA fue muy bajo para realizar el análisis del efecto de los SNPs de *MDR1* en el periodo post inicio de HAART (eventos de SIDA durante HAART= 26).

Por otra parte, evaluamos el potencial efecto confundente de los alelos CCR5-Δ32 y SDF1-3´A, debido a que ha sido previamente descripta la influencia de estas variantes en la progresión a SIDA. La frecuencia del alelo CCR5-Δ32 en el grupo de niños infectados por HIV-1 fue del 4% y las frecuencias genotípicas: 92,13% homocigotas CCR5-*wild type*/*wild type* y 7,87% heterocigotas CCR5-*wild type*/Δ32. El alelo SDF1-3´A presentó una frecuencia de 21% en el grupo de niños infectados y las frecuencias genotípicas fueron: 62,56% homocigotas SDF1-*wild type*/*wild type*, 33,65% heterocigotas SDF1-*wild type*/3´A y 3,79% SDF1-3´A/3´A. No se observaron cambios significativos para el rol protector de los polimorfismos C1236T y C3435T de *MDR1* en un modelo estratificado de Riesgos Proporcionales de Cox (datos no mostrados).

Dado que PXR es un factor de regulación de la expresión de P-gp y de metabolizadores de drogas antirretrovirales como CYP3A4, evaluamos el impacto del SNP PXR C63396T en la evolución de la enfermedad. Sin embargo, no hallamos una diferencia significativa en el tiempo de progresión a SIDA entre los niños PXR 63396CC, PXR 63396CT y PXR 63396TT (p= 0,282; **figura**

R2D) aun cuando el análisis fue restringido al periodo previo al inicio de HAART (p=0,147; datos no mostrados).

No se pudo evaluar la influencia de las variantes de *MDR1* y PXR en términos del tiempo de sobrevida debido a que solo seis pacientes fallecieron durante el periodo de seguimiento y el número de eventos no fue suficiente para realizar el análisis.

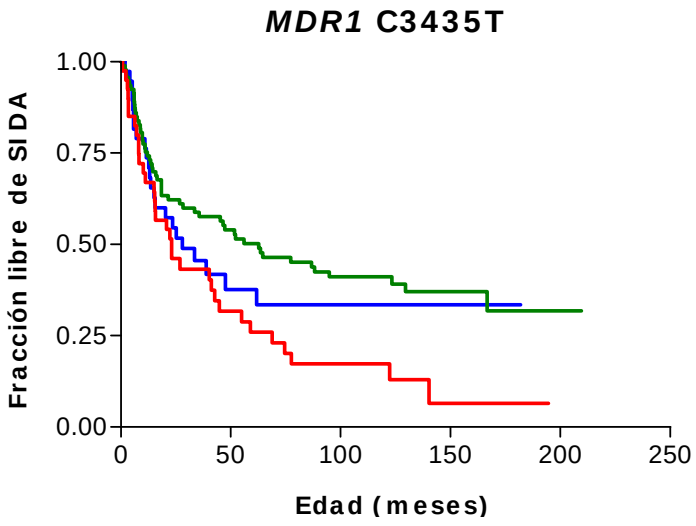
IV.3.1. *Efecto de los pares de haplotipos de MDR1 en la evolución a SIDA infantil*

Dado el fuerte ligamiento entre los SNPs C1236T y C3435T de *MDR1*, examinamos el efecto de los pares de haplotipos en la progresión a la enfermedad. Los niños portadores de los pares de haplotipos *MDR1* 3435CT/1236TT y *MDR1* 3435CT/1236CT mostraron un retraso significativo en el tiempo de progresión a SIDA de aproximadamente 172 y 48 meses, respectivamente respecto de los niños *MDR1* 3435CC/1236CC (p=0,007 y p=0,019, respectivamente; **figura R2E**). Las medianas de tiempo libre de SIDA fueron de 188 meses para los niños *MDR1* 3435CT/1236TT, 64 meses para los niños *MDR1* 3435CT/1236CT y 16 meses para los niños *MDR1* 3435CC/1236CC. Estos resultados sugieren que solo en el contexto de los haplotipos que contienen el genotipo *MDR1* 3435CT, el alelo *MDR1* 1236T presenta una contribución independiente de manera dosis-dependiente. Esto se evidencia en el hecho de que el efecto protector del SNP *MDR1* C1236T adquiere mayor magnitud a medida que aumenta la dosis del alelo *MDR1* 1236T. No se observaron diferencias estadísticamente significativas para los

pares de haplotipos *MDR1* 3435CC/1236CT (n=13), *MDR1* 3435CC/1236TT (n=3) y *MDR1* 3435TT/1236CT (n=10) en la progresión a SIDA (datos no mostrados).

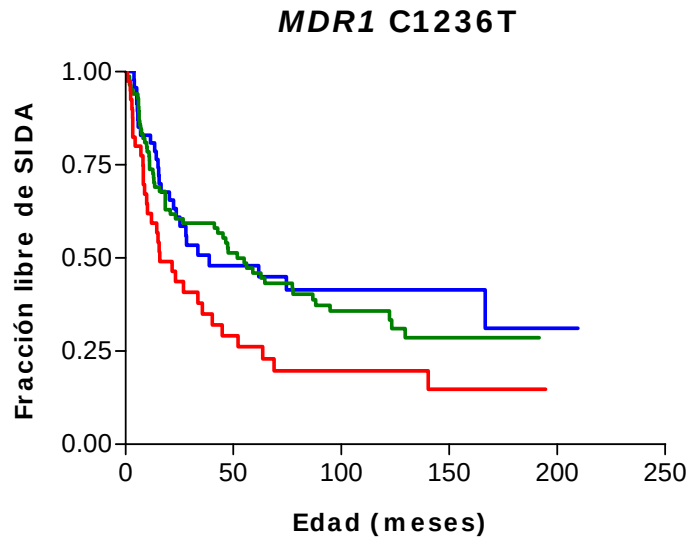
Debido al conocido impacto de HAART en el curso de la enfermedad, el rol potencial de la edad al inicio de HAART y durante HAART debió ser ajustado como factores confundentes. Por ello, el análisis de Kaplan-Meier fue alternativamente ajustado incluyendo la duración de HAART como una covariable dicotómica dependiente del tiempo. La **tabla R2** muestra el análisis ajustado para el modelo de Riesgos Proporcionales de Cox. En ambos modelos, ajustado (**tabla R2**) y no ajustado (**figura R2**), se observaron tendencias similares, confirmando un efecto protector independiente de los pares de haplotipos *MDR1* 3435CT/1236CT y *MDR1* 3435CT/1236TT en la progresión a SIDA pediátrico.

FIGURA R2A



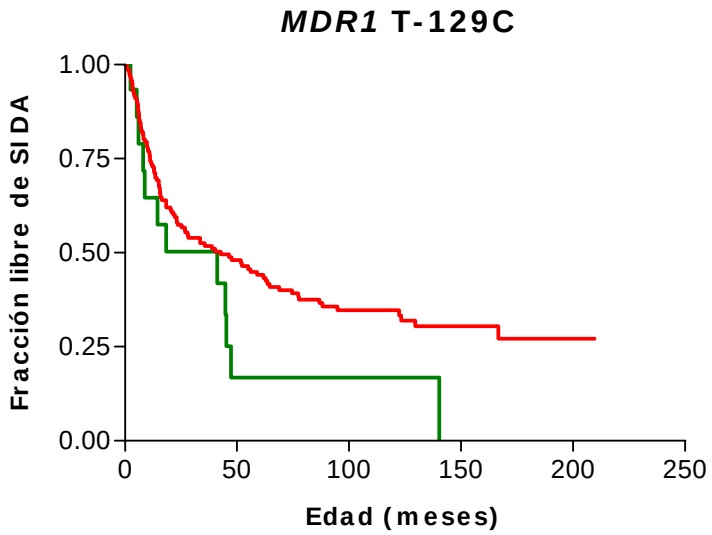
Genotipo	n	SIDA	Mediana a SIDA	RR	95% IC	Contraste entre genotipos (*p*)	Ajuste global (*p*)
3435CC	40	33	23	1*			
3435CT	93	55	63	0,537	0,348 - 0,829	0,005	0,023
3435TT	38	23	28	0,719	0,422 - 1,225	0,230	
Total	171						

FIGURA R2B



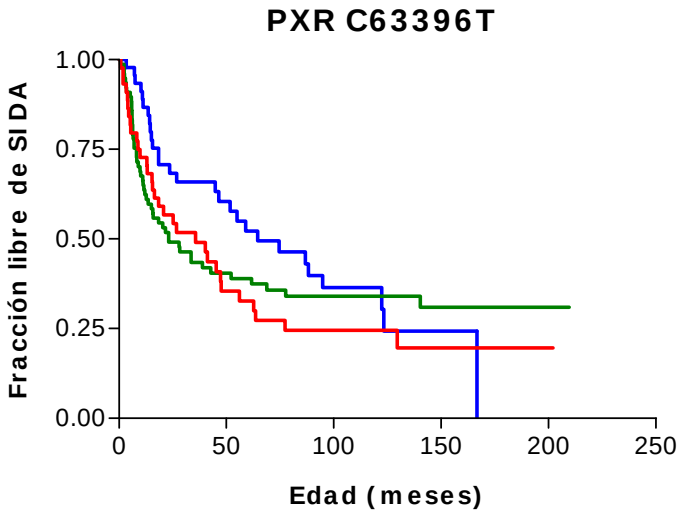
Genotipo	n	SIDA	Mediana a SIDA	RR	95% IC	Contraste entre genotipos (*p*)	Ajuste global (*p*)
1236CC	40	31	16	1*			
1236CT	84	54	52	0,599	0,385 - 0,934	0,024	0,049
1236TT	47	26	39	0,553	0,328 - 0,933	0,026	
Total	171						

FIGURA R2C



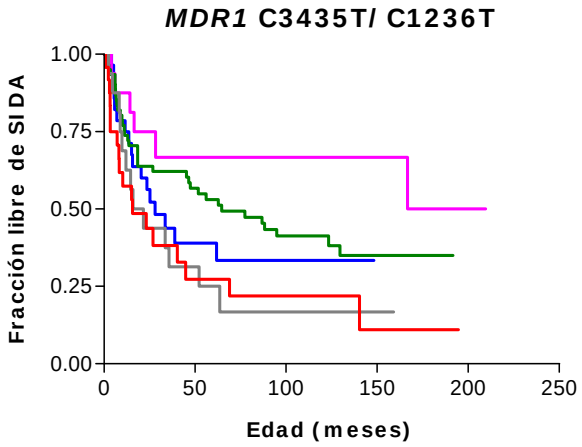
Genotipo	n	SIDA	Mediana a SIDA	RR	95% IC	Contraste entre genotipos (*p*)	Ajuste global (*p*)
-129TT	156	99	43	1*			0,124
-129TC	15	12	41	1,650	0,907 - 3,020	0,100	
Total	171						

FIGURA R2D



Genotipo	n	SIDA	Mediana a SIDA	RR	95% IC	Contraste entre genotipos (*p*)	Ajuste global (*p*)
63396CC	45	32	36	1*			
63396CT	79	51	23	0,881	0,565 - 1,370	0,570	0,282
63396TT	47	28	74	0,672	0,404 - 1,120	0,120	
Total	171						

FIGURA R2E



Pares de haplotipos	n	SIDA	Mediana a SIDA	RR	95% IC	Contraste entre pares de haplotipos (*p*)	Ajuste global (*p*)
3435CC/ 1236CC	24	18	16	1*			
3435CT/ 1236CC	16	13	19	0,948	0,464 - 1,940	0,880	
3435CT/ 1236CT	61	36	64	0,507	0,287 - 0,895	0,019	0,048
3435CT/ 1236TT	16	6	188	0,282	0,111 - 0,714	0,007	
3435TT/ 1236TT	28	17	28	0,707	0,364 - 1,373	0,310	

FIGURA R2. ***Curvas de sobrevida para tiempo a SIDA en niños infectados por HIV-1***

Se utilizó el método de Kaplan-Meier para estimar la fracción libre de SIDA y las curvas de sobrevida. El ajuste global fue evaluado con la prueba de Razón de Verosimilitud y los contrastes entre genotipos/pares de haplotipos fueron analizados con la prueba de Wald. Los valores *p* y RR fueron calculados para un modelo de Riesgos Proporcionales de Cox. RR: riesgo relativo, IC: intervalo de confianza, * grupo de referencia.

A. *MDR1* 3435CC (rojo), *MDR1* 3435CT (verde), *MDR1* 3435TT (azul)

B. *MDR1* 1236CC (rojo), *MDR1* 1236CT (verde), *MDR1* 1236TT (azul)

C. *MDR1* -129TT (rojo), *MDR1* -129TC (verde)

D. PXR 63396CC (rojo), PXR 63396CT (verde), PXR 63396TT (azul)

E. *MDR1* 3435CC/1236CC (rojo), *MDR1* 3435CT/1236CC (gris), *MDR1* 3435CT/1236CT (verde), *MDR1* 3435CT/1236TT (rosa), *MDR1* 3435TT/1236TT (azul)

TABLA R2. ***Progresión a SIDA ajustada por la edad al inicio de HAART y la duración de HAART***

Genotipos y pares de haplotipos	RR	95% IC	Contraste entre genotipos/ pares de haplotipos (*p*)	Ajuste global (*p*)
***MDR1* 3435CC**	1*			
***MDR1* 3435CT**	0,532	0,342 - 0,827	0,005	0,023
***MDR1* 3435TT**	0,713	0,414 - 1,229	0,210	
***MDR1* 1236CC**	1*			
***MDR1* 1236CT**	0,608	0,388 - 0,952	0,029	0,052
***MDR1* 1236TT**	0,545	0,320 - 0,927	0,025	
***MDR1* 3435CC/ 1236CC**	1*			
***MDR1* 3435CT/ 1236CC**	0,941	0,455 - 1,942	0,870	
***MDR1* 3435CT/ 1236CT**	0,515	0,288 - 0,919	0,025	0,037
***MDR1* 3435CT/ 1236TT**	0,249	0,092 - 0,673	0,006	
***MDR1* 3435TT/ 1236TT**	0,706	0,358 - 1,394	0,320	

El ajuste global fue evaluado con la prueba de Razón de Verosimilitud y los contrastes entre genotipos/pares de haplotipos fueron analizados con la prueba de Wald. Los valores *p* y RR fueron calculados para un modelo de Riesgos Proporcionales de Cox. RR: riesgo relativo, IC: intervalo de confianza, * grupo de referencia.

CAPÍTULO 2 - INFLUENCIA DE LOS POLIMORFISMOS DE *MDR1* Y PXR EN LA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE LOPINAVIR Y EN LA RESPUESTA VIROLÓGICA E INMUNOLÓGICA A HAART

IV.4. *Características de los pacientes*

El objetivo fue evaluar si los SNPs de *MDR1* y PXR tienen un efecto en los niveles plasmáticos de LPV y la respuesta virológica e inmunológica a HAART en niños infectados por HIV-1. Para ello, se analizó un subgrupo de 38 pacientes de la cohorte pediátrica, a los que se les realizó un estudio de monitoreo de LPV. Todos los pacientes recibieron régimen de HAART con LPV/r. La dosis oral de LPV fue 230 y 300 mg/m^2/12hs para niños mayores y menores de 6 meses, respectivamente. Las características del grupo de estudio al momento de la determinación de la concentración plasmática de LPV se resumen en la **tabla R3**. Los pacientes estuvieron igualmente distribuidos entre niños y niñas. La mediana de edad fue de 109,7 meses, a pesar de que el rango fue muy amplio incluyendo niños de 7 meses hasta 19 años. La mediana de tiempo de exposición de LPV/r fue de aproximadamente 24 meses. Al momento de la determinación de la concentración plasmática de la droga, la mediana de carga viral plasmática fue de 3,62 $\log_{10}$ copias/ml, la mediana del recuento de células T $CD4^+$ fue del 23% y el 76% de los pacientes había desarrollado SIDA (estadío C). Tres pacientes recibieron HAART con LPV/r por primera vez, mientras que la mayoría había tenido experiencia previa de HAART con otros PI diferentes de LPV (principalmente ritonavir y nelfinavir). Al momento de la cuantificación de LPV, los regimenes de base consistieron en: 2 o 3 NRTI en 35 pacientes (92%), 2 o 3 NRTI más 1 PI (amprenavir) en 2 pacientes (5%) y 4 NRTI más 1 NNRTI (efavirenz) en un paciente (3%).

TABLA R3. ***Características clínicas de los pacientes al momento de la determinación del nivel plasmático de lopinavir***

Características		
Niñas - n (%)		17 (45%)
Edad - mediana, meses [rango]		109,70 [7,83 - 233,47]
Peso corporal - mediana, kg [rango]		23 [9 - 60]
Duración del tratamiento - mediana, meses [rango]		24,68 [2,03 - 62,33]
Estadío clínico, n (%)	**A**	2 (5%)
	B	5 (13%)
	C	29 (76%)
CV plasmática - mediana, log_{10} copias/ ml [rango]		3,62 [1,70 - 5,90]
Recuento de células T $CD4^+$ - mediana, % [rango]		23 [1 - 43]

Duración del tratamiento: tiempo desde el inicio del tratamiento hasta la determinación del nivel plasmático de la droga. CV: carga viral.

IV.5. *Influencia de los SNPs de MDR1 y PXR en la concentración plasmática de lopinavir*

Investigamos si los polimorfismos de *MDR1* (T-129C, C1236T y C3435T) y de PXR (C63396T) pueden afectar la concentración valle (C_{valle}) y post-dosis ($C_{post-dosis}$) de LPV en niños infectados por HIV-1. La distribución de las frecuencias de los SNPs de *MDR1* y PXR fue similar a la descripta previamente en la cohorte pediátrica, con frecuencias cercanas al 50% para los alelos *MDR1* 1236T, *MDR1* 3435T y PXR 63396T y de 5% para el alelo *MDR1* -129T. Para el SNP *MDR1* C1236T, las frecuencias genotípicas halladas fueron 28,95% homocigotas 1236CC, 47,37% heterocigotas 1236CT y 23,68% homocigotas 1236TT. Encontramos que el SNP *MDR1* C1236T tiene un efecto significativo en la concentración post-dosis de LPV (p= 0,016; **tabla R4**). La concentración post-dosis de LPV fue menor en los niños heterocigotas *MDR1* 1236CT respecto de los niños homocigotas *MDR1* 1236TT, con una mediana de $C_{post-dosis}$ de 3,04 µg/ml y 6,50 µg/ml, respectivamente (**figura R3A**). Además, la concentración valle de LPV fue también menor en los pacientes con el genotipo *MDR1* 1236CT

(mediana de C_{valle}= 2,29 µg/ml) respecto de los pacientes con el genotipo *MDR1* 1236TT (mediana de C_{valle}= 6,30 µg/ml), a pesar de que la diferencia no fue estadísticamente significativa (*p*= 0,152; **tabla R4**). No se observó una asociación significativa entre las concentraciones valle y post-dosis de LPV y los genotipos de los SNPs *MDR1* T-129C, *MDR1* C3435T y PXR C63396T. Tampoco hallamos diferencias significativas entre los genotipos de *MDR1* o PXR y las características clínicas de los niños infectados por HIV-1 que se muestran en la **tabla R3**.

TABLA R4. ***Nivel plasmático de lopinavir respecto de los genotipos de MDR1 y PXR***

Genotipos	Concentración plasmática de lopinavir, ug/ ml [rango]			
	n	C_{valle}	n	$C_{post-dosis}$
***MDR1* -129TT**	34	5,12 [0,02 - 15,00]	30	5,26 [0,63 - 15,00]
***MDR1* -129TC**	4	2,96 [0,60 - 10,20]	4	4,15 [0,50 - 11,80]
***MDR1* -129CC**	0	-	0	-
p		1		1
***MDR1* 1236CC**	11	7,90 [0,33 - 15,00]	11	9,70 [2,35 - 15,00]
***MDR1* 1236CT**	18	2,29 [0,02 - 10,70]	15	3,04 [0,50 - 14,22]
***MDR1* 1236TT**	9	6,30 [1,45 - 11,02]	8	6,50 [4,75 - 12,77]
p		0,152		**0,016**
***MDR1* 3435CC**	7	3,57 [0,33 - 10,20]	7	3,04 [1,54 - 11,80]
***MDR1* 3435CT**	24	3,22 [0,02 - 15,00]	21	5,00 [0,50 - 15,00]
***MDR1* 3435TT**	7	6,30 [1,45 - 11,02]	6	6,32 [4,75 - 12,77]
p		0,988		0,656
PXR 63396CC	8	4,58 [0,33 - 15,00]	7	5,00 [2,35 - 11,90]
PXR 63396CT	23	3,57 [0,29 - 11,90]	20	4,93 [0,50 - 15,00]
PXR 63396TT	7	8,20 [0,02 - 10,70]	7	6,50 [1,12 - 14,22]
p		1		1

Las diferencias entre genotipos de *MDR1* y PXR en relación a las concentraciones valle (C_{valle}) y post-dosis ($C_{post-dosis}$) de lopinavir fueron evaluadas con la prueba de Kruskal-Wallis aplicando la corrección de Bonferroni.

IV.6. *Efecto de los SNPs de MDR1 y PXR en la respuesta virológica e inmunológica a HAART*

Además, exploramos si los polimorfismos de *MDR1* y PXR afectan la respuesta virológica e inmunológica al régimen HAART con LPV/r. Se analizaron el recuento de células T $CD4^+$ y la carga viral antes (basal) y después de la exposición a LPV/r (**tabla R5**). La mediana de carga viral basal fue similar entre los genotipos de los cuatro polimorfismos evaluados. Sin embargo, observamos que el polimorfismo *MDR1* C1236T afecta significativamente la respuesta virológica a HAART con LPV/r (p=0,047; **tabla R5**). Los niños heterocigotas *MDR1* 1236CT presentaron una menor disminución de la carga viral a la semana 36 respecto de los niños homocigotas *MDR1* 1236CC, con una mediana de carga viral de -0,50 $\log_{10}$ copias/ml y -2,08 $\log_{10}$ copias/ml, respectivamente (**figura R3B**). Esta diferencia también fue observada a la semana 18, pero no alcanzó significancia estadística (**tabla R5**). Un total de 13 niños (34%) mostraron supresión virológica (CV ≤ 2,6 $\log_{10}$ copias/ml) a la semana 18. De ellos, 5 pacientes fueron homocigotas *MDR1* 1236CC, 4 heterocigotas *MDR1* 1236CT y 4 homocigotas *MDR1* 1236TT. Los SNPs *MDR1* T-129C, *MDR1* C3435T y PXR C63396T no se asociaron con la respuesta virológica a HAART con LPV/r. Ninguno de los polimorfismos de *MDR1* y PXR estudiados mostró asociación significativa con la respuesta inmunológica ni a la semana 21 ni a la semana 41 post inicio del régimen de LPV/r.

En conjunto, estos hallazgos sugieren que solo el SNP *MDR1* C1236T afecta significativamente los niveles plasmáticos de LPV con un consecuente impacto en la eficiencia de la droga en reducir la replicación viral.

TABLA R5. ***Respuesta virológica e inmunológica a HAART con lopinavir respecto de los genotipos de MDR1 y PXR***

Genotipos	CV plasmática - mediana, log_{10} copias/ ml [rango]				Recuento de células T $CD4^+$ - mediana, % [rango]			
	n	Basal	Cambio a las 18 semanas	Cambio a las 36 semanas	n	Basal	Cambio a las 21 semanas	Cambio a las 41 semanas
***MDR1* -129TT**	25[a]	5,17 [2,93 - 6,92]	-1,16 [-3,44 - 0,78]	-1,38 [-3,44 - 0,88]	19	14,00 [1,00 - 31,00]	2,00 [-4,00 - 30,00]	4,00 [-5,00 - 30,00]
***MDR1* -129TC**	2	5,17 [4,89 - 5,45]	-2,63 [-3,56 - (-1,70)]	-3,02 [-3,19 - (-2,85)]	3	38,00 [15,00 - 39,00]	0,00 [-5,00 - 8,00]	7,00 [2,00 - 8,00]
***MDR1* -129CC**	0	-	-	-		-	-	-
p		1	0,316	0,182		0,208	1	1
***MDR1* 1236CC**	10[a]	5,36 [3,04 - 6,92]	-1,47 [-3,56 - (-0,04)]	-2,08 [-3,19 - (-0,90)]	6	18,50 [7,00 - 38,00]	5,50 [0,00 - 30,00]	7,50 [0,00 - 30,00]
***MDR1* 1236CT**	10	5,14 [4,60 - 5,84]	-0,64 [-1,72 - 0,78]	-0,50 [-1,57 - 0,31]	9	22,00 [10,00 - 39,00]	0,00 [-5,00 - 13,00]	3,00 [-5,00 - 10,00]
***MDR1* 1236TT**	7	5,14 [2,93 -5,99]	-1,91 [-3,44 - (-0,65)]	-1,56 [-3,44 - 0,88]	7	2,00 [1,00 - 28,00]	2,00 [-2,00 - 15,00]	4,00 [-1,00 - 7,00]
p		1	0,120	**0,047**		0,365	0,627	0,725
***MDR1* 3435CC**	5	5,45 [4,84 - 6,92]	-0,74 [-3,56 - 0,20]	-1,45 [-2,85 - (-0,24)]	5	23,00 [10,00 - 39,00]	0,00 [-5,00 - 5,00]	2,00 [-5,00 - 8,00]
***MDR1* 3435CT**	17[a]	5,14 [3,04 - 6,38]	-1,26 [-3,44 - 0,78]	-1,51 [-3,44 - 0,31]	11	19,00 [7,00 - 31,00]	5,00 [-4,00 - 30,00]	7,00 [-4,00 - 30,00]
***MDR1* 3435TT**	5	5,62 [2,93 - 5,99]	-1,16 [-3,01 - (-0,65)]	-0,95 [-3,02 - 0,88]	6	2,00 [1,00 - 28,00]	3,50 [-2,00 - 15,00]	4,00 [0,00 - 7,00]
p		1	1	1		0,077	1	0,767
PXR 63396CC	7[a]	5,59 [3,04 - 6,92]	-0,74 [-1,70 - (-0,19)]	-1,10 [-3,19 - 0,31]	3	18,00 [15,00 - 26,00]	5,00 [0,00 - 8,00]	7,00 [0,00 - 8,00]
PXR 63396CT	15	5,14 [2,93 - 6,38]	-1,19 [-3,44 - 0,78]	-1,53 [-3,44 - 0,88]	14	12,50 [1,00 - 39,00]	3,50 [-5,00 - 30,00]	4,00 [-5,00 - 30,00]
PXR 63396TT	5	5,17 [5,00 -5,45]	-1,72 [-3,56 - (-0,09)]	-1,50 [-3,18 - 0,10]	5	24,00 [10,00 - 38,00]	0,00 [-4,00 - 5,00]	7,00 [-4,00 - 8,00]
p		1	1	1		0,948	0,685	1

Las diferencias entre los genotipos de *MDR1 y* PXR en relación a la CV plasmática y al recuento de células T $CD4^+$ (basal y a distintos tiempos) fueron evaluadas con la prueba de Kruskal-Wallis aplicando la corrección de Bonferroni. CV: carga viral. a: el total de los pacientes excepto uno fue evaluado para el cambio de CV a las 36 semanas.

FIGURA R3A

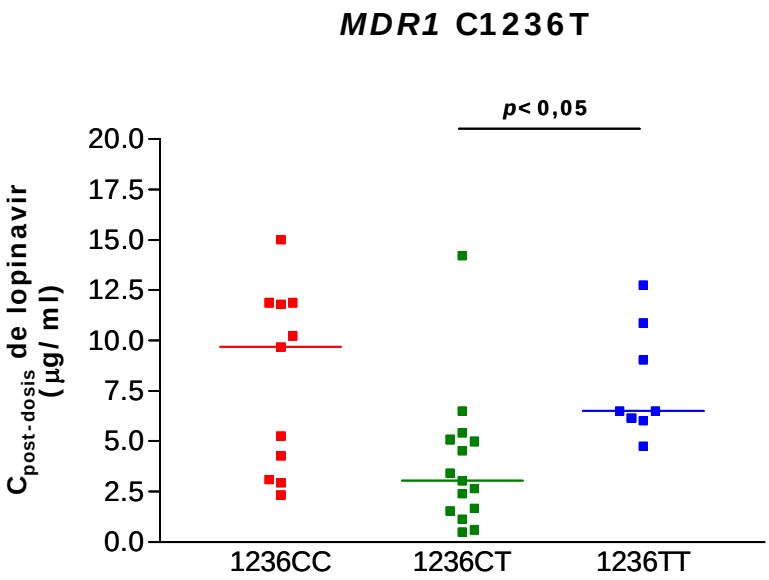


FIGURA R3B

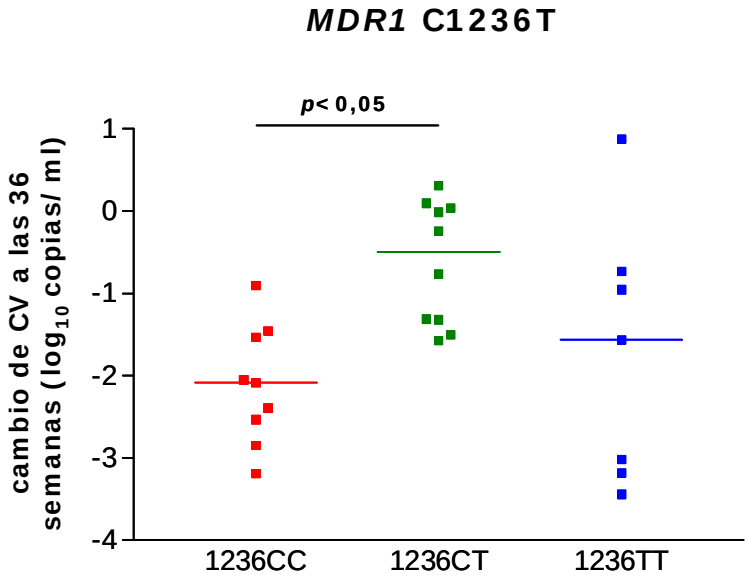


FIGURA R3. ***Efecto del SNP C1236T de MDR1 en la concentración post-dosis de lopinavir y en el cambio de la carga viral***

A. Las diferencias entre los genotipos C1236T de *MDR1* en relación a la concentración post-dosis de lopinavir (µg/ml) fueron evaluados con la prueba de Kruskal-Wallis aplicando la corrección de Bonferroni. Se muestran la mediana de $C_{post-dosis}$ para cada genotipo y el valor de *p* significativo.

B. Las diferencias entre genotipos C1236T de *MDR1* en relación al cambio de la carga viral plasmática a las 36 semanas post inicio de tratamiento fueron calculadas con la prueba de Kruskal-Wallis aplicando la corrección de Bonferroni. Se muestran la mediana de cambio de carga viral para cada genotipo y el valor de *p* significativo. CV: carga viral.

CAPITULO 3 - NIVEL DE EXPRESIÓN DE P-GP EN LINFOCITOS $CD4^+$

IV.7. *Puesta a punto del ensayo de citometría de flujo*

Con el objetivo de evaluar los niveles de P-gp en linfocitos $CD4^+$ se realizó la puesta a punto del ensayo de citometría de flujo en base al trabajo de Ford J *et al.* (2003). En el punto III.2.7 de la sección de Materiales y Métodos se describen en detalle los pasos del protocolo. Brevemente, para la marcación de P-gp en membrana se utilizó un anticuerpo monoclonal de ratón anti-P-gp humana conjugado a PE (UIC2-PE) y la marcación de células $CD4^+$ se realizó usando un anticuerpo anti-CD4 conjugado a FITC. Además se utilizó un anticuerpo control de isotipo de rata conjugado a PE para calcular y corregir la unión inespecífica a los linfocitos. Se partió de un pellet de $8x10^5$ PBMC aisladas de sangre periférica mediante gradiente de densidad, a las cuales se les agregó fijador celular e incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Luego de un lavado con PBS 1X, se marcaron $4x10^5$ PBMC con UIC2-PE y anticuerpo anti-CD4 conjugado a FITC y por otra parte $4x10^5$ PBMC con anticuerpo control de isotipo conjugado a PE y anticuerpo anti-CD4 conjugado a FITC. Se incubó durante 90 minutos a 4°C en oscuridad. Posteriormente, se realizaron dos lavados y las células se resuspendieron en PBS 1X. Una vez realizada la adquisición de los datos en el citómetro de flujo se realizó un análisis de los mismos mediante el programa FlowJo. En un gráfico de dot plot de SSC (complejidad celular) en función de FSC (tamaño celular) se seleccionó la población de linfocitos del total de PBMC (*gate G*1) (**figura R4A**). A partir de los linfocitos seleccionados en este *gate* se realizó un grafico de SSC en función de la intensidad de fluorescencia del anticuerpo anti-CD4 conjugado a FITC

(*gate G2*) (**figura R4B**). Una vez seleccionada la población de linfocitos $CD4^+$ se realiza un gráfico de dot plot para la intensidad de fluorescencia del anticuerpo conjugado a FITC (CD4) en función de la intensidad de fluorescencia del anticuerpo conjugado a PE (P-gp), en el cual se definen cuatro cuadrantes mediante la aplicación de los ejes previamente fijados con la muestra marcada con el anticuerpo control de isotipo conjugado a PE (**figura R4C**). En el mismo se determinó el porcentaje e intensidad de fluorescencia media (IFM) de las células $P\text{-}gp^+$ en la población de linfocitos $CD4^+$ (**figura R4D**).

Se testearon diferentes volúmenes de anticuerpo anti-P-gp y anticuerpo control de isotipo y distintos fijadores celulares a fin de determinar las condiciones adecuadas que nos permitan detectar diferencias interindividuales en la expresión de P-gp. La concentración óptima de UIC2-PE fue determinada mediante la realización de una curva de calibración, en la cual se ensayaron por duplicado tres volúmenes diferentes del anticuerpo (20 μl, 30 μl y 40 μl). En la **figura R5** se muestra la curva de calibración resultante, en la cual se observa que el nivel de expresión de P-gp aumenta en forma lineal con la cantidad de anticuerpo UIC2-PE hasta llegar a una meseta o *plateau*. La menor cantidad de anticuerpo con la cual se alcanza el mayor nivel de expresión de P-gp (35 μl de anticuerpo UIC2-PE) fue determinada como óptima y a utilizar en los subsiguientes ensayos.

FIGURA R4A

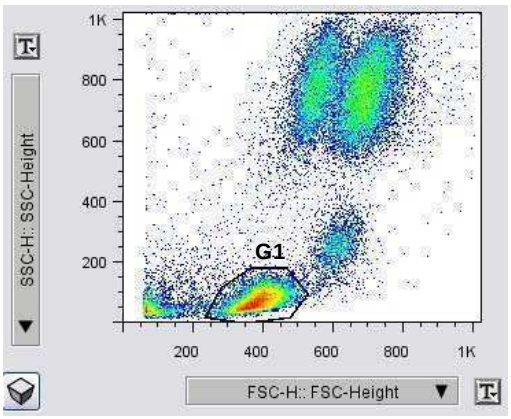


FIGURA R4B

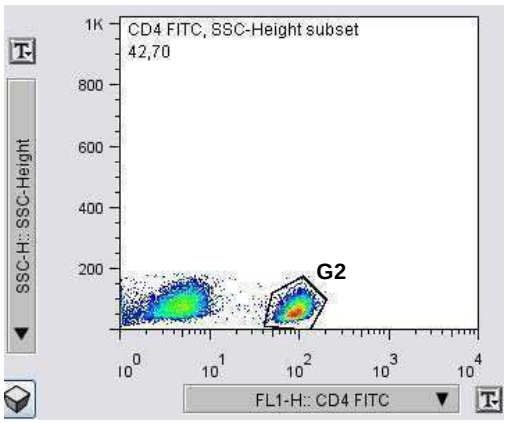


FIGURA R4C

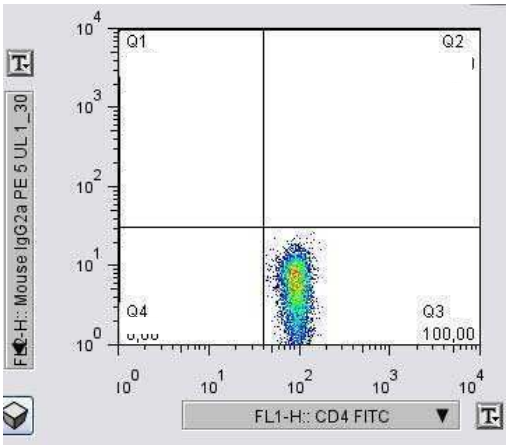


FIGURA R4D

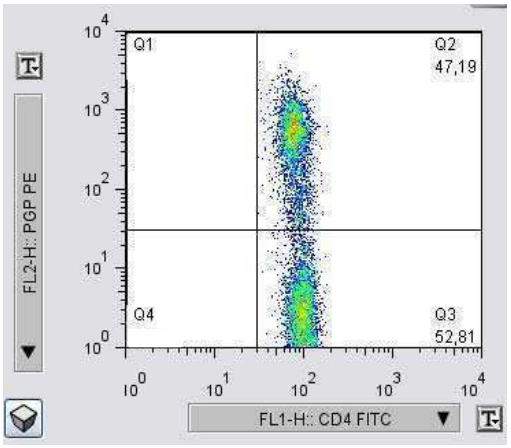


FIGURA R4. ***Muestra representativa del proceso de análisis***

A. Dot plot para los valores de SSC (ordenadas) y FSC (abscisas) utilizado para la selección de la población de linfocitos en una muestra de PBMC circunscripta en el polígono (*gate* G1).

B. Dot plot de las linfocitos seleccionados en el *gate* G1 para los valores de SSC (ordenadas) e intensidad de fluorescencia del anticuerpo anti-CD4 conjugado a FITC (abscisas) utilizado para la selección de la población de linfocitos $CD4^+$ circunscripta en el polígono (*gate* G2).

C y D. Dot plot de los linfocitos seleccionadas en el *gate* G2 para los valores de intensidad de fluorescencia del anticuerpo anti-CD4 conjugado a FITC (abscisas) e intensidad de fluorescencia del anticuerpo control de isotipo conjugado a PE (ordenadas) (**C**) o anticuerpo anti-P-gp conjugado a PE (ordenadas) (**D**). Los valores en cada cuadrante indican el porcentaje de células.

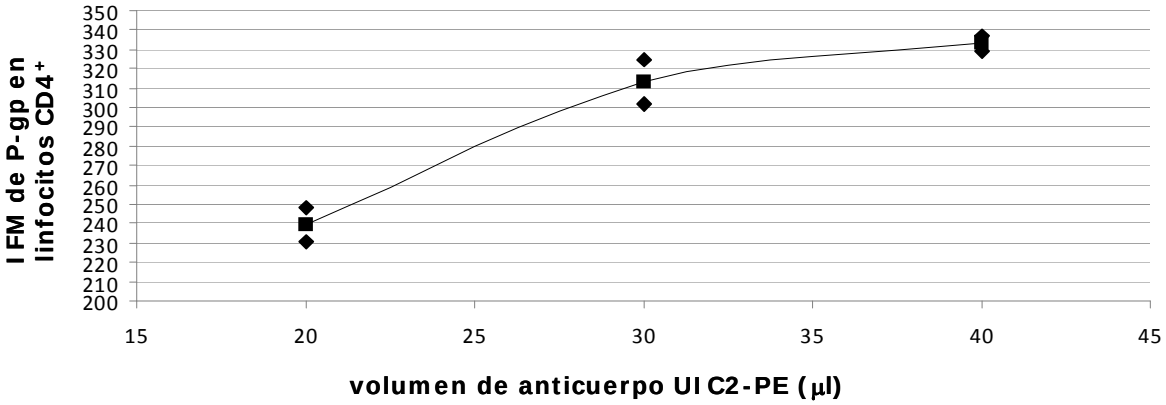


FIGURA R5. ***Curva de calibración para la determinación de la concentración de anticuerpo anti-P-gp a utilizar para los ensayos de citometría de flujo***
Para la realización de la curva de calibración se ensayaron tres concentraciones crecientes de anticuerpo anti-P-gp conjugado a PE por duplicado. En el gráfico se muestran los duplicados (rombos negros) y el promedio (cuadrados negros) de la IFM de las células P-gp$^+$ en la población de linfocitos CD4$^+$.

IV.8. *Efecto de los SNPs de MDR1 y PXR en el nivel de expresión de P-gp*

Nuestro siguiente objetivo fue evaluar el efecto de los SNPs de *MDR1* (T-129C, C1236T y C3435T) y PXR (C63396T) en los niveles de expresión de P-gp en linfocitos CD4$^+$. Para ello, se analizó un grupo de 40 individuos normales (grupo control), de los cuales 14 eran niñas o mujeres. La mediana de edad de este grupo control fue de 19 años con un amplio rango de edad que fue desde los 10 meses a los 57 años. Para todos los individuos del grupo control se realizó la genotipificación de los SNPs de *MDR1* y PXR y la determinación de la expresión de P-gp en linfocitos CD4$^+$ por citometría de flujo. En la **figura R6** se muestran los gráficos del porcentaje de células P-gp$^+$ en la población de linfocitos CD4$^+$ para cada uno de los genotipos de *MDR1* o PXR. Observamos que los niveles de expresión de P-gp presentan una amplia variabilidad desde el 9 al 76%. Sin

embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los genotipos de los SNPs *MDR1* C1236T, *MDR1* C3435T y PXR C63396T en el nivel de expresión de P-gp en linfocitos $CD4^+$. Las medianas de porcentaje de células $P\text{-}gp^+$ para los individuos homocigotas *MDR1* 1236CC, heterocigotas *MDR1* 1236CT y homocigotas *MDR1* 1236TT fueron de: 39±18%, 47±19% y 45±9%, respectivamente (p=0,956) (**figura R6A**). Para el SNP *MDR1* C3435T se observa gráficamente, aunque sin significancia estadística, que los individuos homocigotas *MDR1* 13435CC presentan mayores niveles de expresión de P-gp que los heterocigotas *MDR1* 3435CT y estos, a su vez, mayores niveles que los homocigotas *MDR1* 3435TT, con medianas de porcentaje de células $P\text{-}gp^+$ de 49±16%, 44±18% y 32±17%, respectivamente (p=0,260) (**figura R6B**). Finalmente, las medianas de porcentaje de células $P\text{-}gp^+$ para los individuos homocigotas PXR 63396CC, heterocigotas PXR 63396CT y homocigotas PXR 63396TT fueron de 41±19%, 36±18% y 54±16%, respectivamente (p=0,513) (**figura R6C**). Tampoco hallamos diferencias significativas en relación a la IFM de las células $P\text{-}gp^+$ en la población de linfocitos $CD4^+$ entre los genotipos de los SNPs *MDR1* C1236T, *MDR1* C3435T y PXR C63396T.

No pudimos evaluar el efecto del SNP *MDR1* T-129C debido a que solo dos individuos del total resultaron portadores del genotipo *MDR1* -129TC y no se encontró ningún individuo homocigota *MDR1* -129CC.

FIGURA R6A

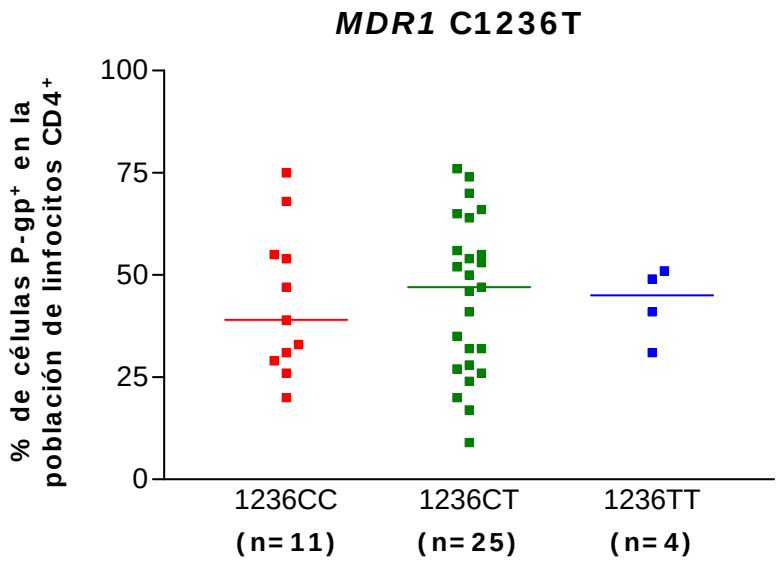


FIGURA R6B

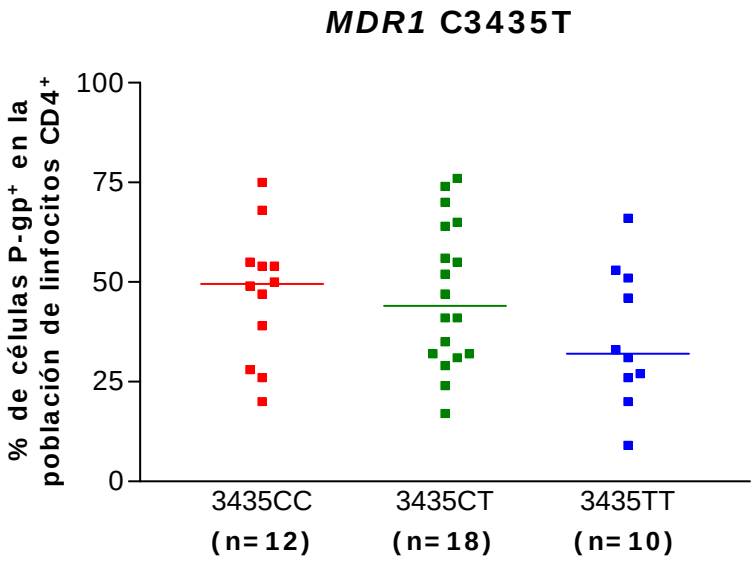


FIGURA R6C

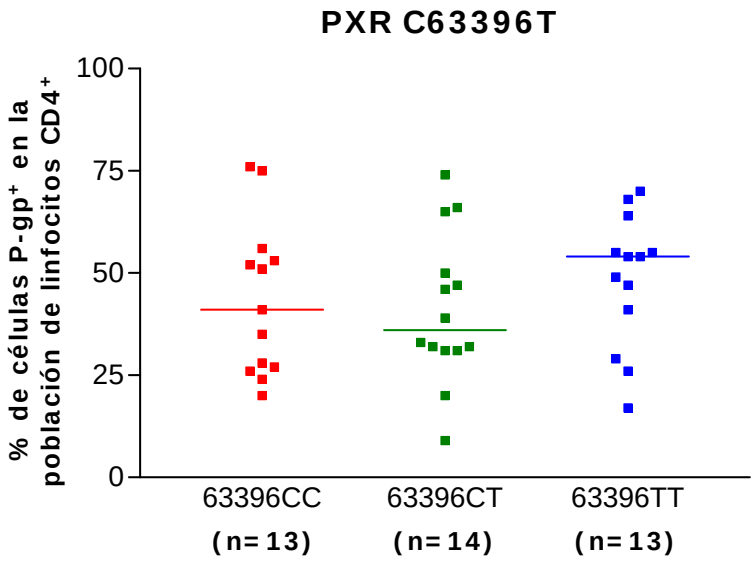


FIGURA R6. ***Efecto de los SNPs de MDR1 y PXR en el nivel de expresión de P-gp***

Las diferencias entre los genotipos para los SNPs *MDR1* C1236T (**A**), *MDR1* C3435T (**B**) y PXR C63396T (**C**) en relación a los niveles de expresión de P-gp en linfocitos $CD4^+$ fueron evaluados con la prueba de Kruskal-Wallis. En cada grafico se muestra la mediana del porcentaje de células $P\text{-}gp^+$ en la población de linfocitos $CD4^+$ y el número de individuos para cada uno de los genotipos.

IV.9. *Influencia de la edad en el nivel de expresión de P-gp*

Posteriormente, nos propusimos investigar la influencia de la edad en la expresión de P-gp. Para ello, realizamos un análisis de correlación entre los niveles de expresión de P-gp en linfocitos $CD4^+$ y la edad al momento de la determinación por citometría de flujo en el grupo de individuos normales. Este grupo control esta compuesto por 20 individuos con un rango de edad de 10 meses a 18 años que concurrieron al Hospital Garrahan para la realización de intervenciones quirúrgicas (normales “pediátricos”) y 20 donantes de sangre

adultos con un rango de edad de 19 a 57 años (normales adultos). Encontramos que el porcentaje de células P-gp$^+$ en la población de linfocitos CD4$^+$ aumenta gradualmente desde los primeros meses de vida hasta la edad adulta (p< 0,0005; **figura R7**), sugiriendo un efecto significativo de la edad en el nivel de expresión de P-gp. Sin embargo, no observamos una correlación significativa entre la edad y la IFM de las células P-gp$^+$.

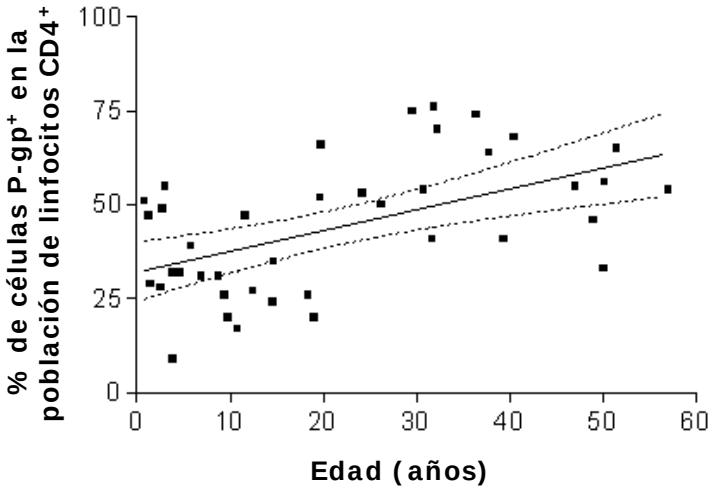


FIGURA R7. ***Correlación entre el nivel de expresión de P-gp y la edad en individuos normales***

Se utilizó la prueba de correlación de rangos de Spearman para evaluar la relación entre el porcentaje de células P-gp$^+$ en la población de linfocitos CD4$^+$ y la edad al momento de la determinación por citometría de flujo en individuos normales.

IV.10. *Impacto de la infección pediátrica por HIV-1 en el nivel de expresión de P-gp*

Nuestro siguiente objetivo fue determinar si la infección pediátrica por HIV-1 podría afectar el nivel de expresión de P-gp en linfocitos CD4$^+$. Para cumplir este objetivo se recolectaron muestras de sangre de 7 niños (5 niñas y 2 niños)

nacidos de madres con serología positiva para HIV-1 entre el 2005 y el 2011 que concurrieron al Hospital Garrahan para el diagnóstico de la infección. Una vez confirmado el resultado positivo para la infección por HIV-1, a cada uno de los pacientes se le realizó una determinación de la expresión de P-gp en linfocitos $CD4^+$ por citometría de flujo en el periodo previo al inicio de la terapia HAART. Ninguno de estos niños recibió alguna de las tres partes del régimen de AZT del Protocolo 076 y el rango de edades de este grupo al momento de la determinación fue de 2 meses a 5 años. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el grupo control en relación al efecto de la edad en el nivel de expresión de P-gp, se incluyeron 9 normales pediátricos con un rango de edades similar al del grupo de niños infectados (10 meses a 4 años). Los niños infectados por HIV-1 presentaron un porcentaje de células $P\text{-}gp^+$ en la población de linfocitos $CD4^+$ significativamente mayor que los normales pediátricos, con medianas de porcentaje de células $P\text{-}gp^+$ de 80±25% y 32±15%, respectivamente ($p < 0{,}0005$; **figura R8**). No observamos diferencias entre el grupo control y el de niños infectados por HIV-1 en relación a la IFM de las células $P\text{-}gp^+$.

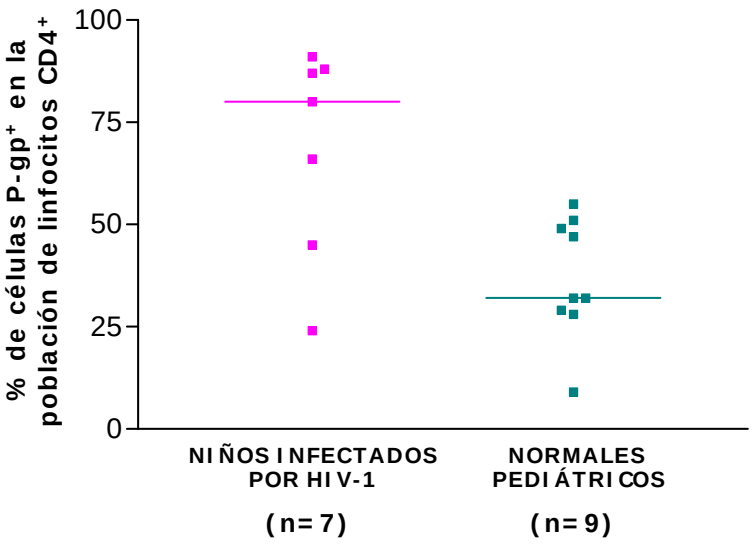


FIGURA R8. ***Efecto de la infección pediátrica por HIV-1 en el nivel de expresión de P-gp***

Se utilizó la prueba de Mann-Whitney para evaluar diferencias entre los niños infectados por HIV-1 y los normales pediátricos en relación a los niveles de expresión de P-gp en linfocitos $CD4^+$. En el grafico se muestra la mediana del porcentaje de células $P\text{-}gp^+$ en la población de linfocitos $CD4^+$ y el número de individuos para cada uno de los grupos.

V - DISCUSIÓN

En este trabajo de Tesis Doctoral se estudió el impacto de SNPs de *MDR1* y PXR en la infección pediátrica por HIV-1, analizando su efecto en la transmisión vertical, la evolución clínica y la respuesta al tratamiento antirretroviral.

Dado que no existen reportes de la frecuencia de los SNPs de *MDR1* (T-129C, C1236T y C3435T) y PXR (C63396T) en población argentina, nuestro primer objetivo fue describir la distribución genotípica y alélica de los distintos polimorfismos para un grupo de donantes de sangre adultos con serología negativa para HIV-1. Encontramos que los SNPs C1236T y C3435T de *MDR1* y C63396T de PXR son altamente frecuentes, alcanzando una frecuencia del 45%. Existe un fuerte desequilibrio de ligamiento entre los SNPs de *MDR1*, C1236T y C3435T, definiendo nueve pares de haplotipos, de los cuales los pares de haplotipos *MDR1* 3435CC/1236CC, *MDR1* 3435CT/1236CT y *MDR1* 3435TT/1236TT fueron los de mayor ocurrencia con frecuencias mayores al 12%. Contrariamente, el alelo *MDR1* -129C es muy poco frecuente en la población argentina (5%) y no se hallaron individuos homocigotas *MDR1* -129CC.

Han sido descriptas marcadas variaciones en las frecuencias alélicas de los SNPs de *MDR1* y PXR entre poblaciones con distinto origen étnico. El alelo *MDR1* 3435T presenta frecuencias similares entre caucásicos (~47%) [Hoffmeyer S *et al*., 2000; Furuno T *et al*., 2002; Bernal ML *et al*., 2003] y asiáticos (~44%) [Ameyaw MM *et al*., 2001; Komoto C *et al*., 2006], mientras que es menos frecuente entre descendientes de africanos (~19%) [Ameyaw MM *et al*., 2001]. La composición étnica de la población argentina es considerada “hispano-caucásica” y esta principalmente compuesta por

descendientes de caucásicos, con muy poca de mezcla con africanos y asiáticos. En concordancia, las frecuencias del alelo *MDR1* 3435T en la población argentina (44%) son similares a las previamente reportadas en poblaciones caucásicas de Alemania (48%), Italia (46%) y España (48%) [Hoffmeyer S *et al*., 2000; Furuno T *et al*., 2002; Bernal ML *et al*., 2003], pero fueron significativamente diferentes de las reportadas en poblaciones africanas (afroamericanos: 16%, Kenia: 17%, Ghana: 17%, Sudan: 27%) ($p < 0,05$). Además, no se observaron diferencias significativas en la distribución de las variantes génicas C3435T de *MDR1* entre nuestra población y poblaciones de Asia (Japón: 41% y China: 47%) [Ameyaw MM *et al*., 2001; Komoto C *et al*., 2006]. La frecuencia del SNP *MDR1* C1236T solamente fue reportada en poblaciones alemana (48%) [Hoffmeyer S *et al*., 2000] y japonesa (66%) [Komoto C *et al*., 2006]. Las frecuencias encontradas en la población argentina (44%) fueron similares a las del grupo caucásico pero significativamente diferentes de las encontradas en la población asiática ($p < 0,05$). La frecuencia alélica del SNP *MDR1* T-129C varia ampliamente entre distintas poblaciones, siendo del 3% en italianos [Furuno T *et al*., 2002], 8% en japoneses [Tanabe M *et al*., 2001] y 21% en africanos [Parathyras J *et al*., 2009]. La frecuencia hallada en la población argentina (5%) fue similar a la reportada en los grupos caucásico y asiático pero significativamente diferente de la frecuencia de población africana ($p < 0,05$). Finalmente, el alelo PXR 63396T fue menos frecuente en la población argentina (46%) en comparación a las poblaciones de origen español (57%) e italiano (63%) [Schipani A *et al*., 2010]. Además, las frecuencias del alelo PXR 63396T reportadas para grupos africanos de Ghana (39%) y Kenia (45%) fueron similares a la frecuencia encontrada en nuestro grupo [Schipani A *et al*., 2010].

Establecida la frecuencia de los SNPs de *MDR1* y PXR en población argentina, evaluamos su rol en la infección por HIV-1. Pocos estudios analizaron el efecto de las variantes genéticas de *MDR1* en la susceptibilidad al HIV-1 y la mayoría exploró cohortes adultas. En nuestro estudio no encontramos diferencias significativas ni en la distribución genotípica ni en las frecuencias alélicas de los polimorfismos T-129C, C1236T y C3435T de *MDR1* o C63396T de PXR entre los niños infectados por HIV-1 y los niños expuestos no infectados, demostrando que estos SNPs no influencian la susceptibilidad a la infección natural por HIV-1 adquirida por transmisión vertical. Nuestros hallazgos concuerdan con los de Ifergan I *et al*. (2002), quienes no observaron diferencias significativas en las frecuencias alélicas del SNP *MDR1* C3435T entre adultos infectados por HIV-1 (que adquirieron la infección por contacto homosexual o uso de drogas inyectables) y adultos caucásicos altamente expuestos (por transmisión sexual o parenteral) no infectados. En contraste, Kedmi M *et al*. (2007) encontraron una mayor frecuencia del alelo *MDR1* 3435C en una cohorte de adultos infectados por HIV-1 (caucásicos y de Etiopía) en comparación con el grupo de controles con serología negativa para HIV-1. Sin embargo, el estudio no incluyó individuos expuestos al HIV-1 no infectados y las vías de transmisión no fueron especificadas.

Nuestro próximo objetivo fue investigar la implicancia de las variantes genéticas de *MDR1* (T-129C, C1236T y C3435T) y PXR (C63396T) en la progresión a la enfermedad en niños infectados por transmisión vertical. Demostramos que la heterocigosidad para los polimorfismos *MDR1* C1236T y *MDR1* C3435T y la homocigosidad *MDR1* 1236TT retrasan significativamente la progresión a SIDA pediátrico. No hay estudios realizados en población infantil

en relación a la progresión a la enfermedad. Saitoh A *et al*. (2005) también reportaron un rol protector del genotipo *MDR1* 3435CT, observando que los niños heterocigotas presentan una respuesta virológica a HAART más rápida y una mayor concentración de nelfinavir (PI) comparado con los homocigotas *MDR1* 3435CC. Nuestros resultados sugieren que la heterocigosidad *MDR1* 3435CT predeciría una ventaja (heterosis) en relación al curso de la infección por HIV-1. El fenómeno de heterosis es frecuente en humanos y podría ocurrir en más del 50% de todas las asociaciones de genes [Comings DE *et al.*, 2000]. Recientemente, fue propuesto un ejemplo de heterosis por Hellemann D *et al*. (2007), mostrando que la heterocigosidad de los alelos de la lectina ligadora de manosa (MBL2) estaría significativamente asociada con el aumento de sobrevida en pacientes en cuidado intensivo comparado con los individuos *wild type* y homocigotas mutantes, en respuesta tanto a infecciones severas como a inflamación aguda.

El efecto protector revelado por los heterocigotas *MDR1* 3435CT fue aun más pronunciado en el contexto de los pares de haplotipos que contienen el alelo *MDR1* 1236T. Los niños portadores del par de haplotipos *MDR1* 3435CT/1236TT presentaron un mayor retraso en el tiempo de progresión a SIDA que los niños portadores del par de haplotipos *MDR1* 3435CT/1236CT. Además, se observaron tendencias similares cuando se realizó el análisis en el periodo previo al inicio de HAART o fue ajustado con la edad al inicio de HAART y la duración de HAART, indicando que la terapia antirretroviral no sería un factor confundente del efecto de los SNPs C3435T y C1236T de *MDR1* sobre el curso de la infección por HIV-1. En contraste con nuestros hallazgos, dos estudios de cohortes de adultos no encontraron ninguna asociación entre el SNP *MDR1*

C3435T y la progresión a la enfermedad [Bleiber G *et al*., 2004; Hendrickson SL *et al*., 2008]. No obstante, los puntos de corte clínico fueron diferentes a los evaluados en este estudio. Uno de ellos midió el tiempo necesario para que el recuento de células T $CD4^+$ disminuya de 500 a 200 células/ml previo al inicio del tratamiento [Bleiber G *et al*., 2004] y el otro estudio consideró la progresión a SIDA post inicio de HAART [Hendrickson SL *et al*., 2008]. En nuestro estudio no nos fue posible analizar el efecto de los SNPs de *MDR1* y PXR sobre la progresión a SIDA post inicio de HAART debido al restringido número de eventos durante el periodo de estudio (n= 26). Resulta difícil comparar entre los distintos reportes, dadas las discrepancias entre las poblaciones estudiadas, incluyendo origen étnico, tamaño muestral y diseño del estudio en cohortes pediátricas y de adultos, así como diferentes puntos de corte clínico de la progresión a la enfermedad y regimenes antirretrovirales.

Dado que los alelos CCR5-Δ32 y SDF1–3´ A pueden afectar la progresión a SIDA pediátrico [Misrahi M *et al*., 1998; Mangano A *et al*., 2000; Tresoldi E *et al*., 2002], testeamos la implicancia de estos polimorfismos como factores genéticos confundentes del efecto de los SNPs de *MDR1* en la progresión a SIDA, sin hallar diferencias significativas.

Diferentes hipótesis han tratado de explicar la posible relación entre P-gp y HIV-1, incluyendo la interacción entre P-gp y otras proteínas de membrana. Se reportó una fuerte correlación positiva entre el nivel de expresión de CXCR4 (coreceptor del HIV-1) y P-gp y la colocalización de estas proteínas en membrana de linfocitos [Owen A *et al*., 2004 a]. El aumento de la expresión de CXCR4 fue asociada con una emergencia de cepas de HIV más patogénicas, la

cual, en combinación con una concomitante mayor expresión de P-gp, podría favorecer el surgimiento en estas células de virus menos sensibles a drogas antirretrovirales específicas y de esta manera contribuir a la aceleración de la progresión a la enfermedad. En forma similar a CXCR4, otra proteína de membrana que colocaliza y coprecipita con P-gp es Caveolina 1 (CAV-1), lo cual podría indicar una interacción entre estas dos proteínas [Cai C *et al*., 2004]. CAV-1 es una proteína muy pequeña (22 kDa) y uno de los componentes principales (junto con CAV-2 y CAV-3) de las Caveolas, comúnmente llamadas "parches lipídicos" (*lipid rafts*), que son regiones ricas en colesterol y esfingolípidos que forman microdominios en membrana resistentes a detergentes. Entre las múltiples funciones de CAV-1, una de las más importantes es su implicancia en la transducción de señales, pero también se la ha asociado con procesos de transcitosis y endocitosis. Por otra parte, en estudios con células 293T cotransfectadas con HIV y CAV-1 se observó una reducción de la replicación viral [Llano M *et al*., 2002]. Resulta difícil diferenciar entre los efectos de P-gp sobre la dinámica viral y aquellos producidos por proteínas asociadas a P-gp. La interacción directa entre P-gp y CXCR4 o CAV-1 podría afectar la replicación del HIV-1, interfiriendo con los procesos de entrada y liberación de las partículas virales, respectivamente. Teniendo en cuenta esta evidencia, podemos suponer que los portadores de los genotipos protectores de *MDR1* podrían modular el curso clínico de la infección por HIV-1 a través de P-gp. Sin embargo, se necesitan más estudios para corroborar esta hipótesis.

Otro de los objetivos de este trabajo de Tesis fue evaluar el efecto de los polimorfismos T-129C, C1236T y C3435T de *MDR1* y C63396T de PXR en la respuesta al tratamiento antirretroviral. Para ello, en un subgrupo de pacientes

infectados por HIV-1 que recibían LPV/r como parte del régimen HAART se realizó un estudio farmacogenético analizando los niveles plasmáticos de LPV y la respuesta virológica e inmunológica. Encontramos que solo la heterocigosidad para el polimorfismo C1236T de *MDR1* esta asociada significativamente con un menor nivel de LPV y una mayor carga viral, sugiriendo que sería un factor genético de riesgo en la respuesta a esta droga.

Diversos estudios analizaron la influencia del SNP *MDR1* C3435T en la respuesta antirretroviral; sin embargo, su rol sigue siendo poco claro. Nuestros resultados concuerdan con un estudio reciente de Rakhmanina NY *et al*. (2011), quienes no encontraron diferencias significativas en el área bajo la curva y en el *clearance* de LPV entre los genotipos de *MDR1* C3435T y G2677T en una cohorte de niños infectados por HIV-1 de origen predominantemente afroamericano. Otros estudios realizados en adultos mostraron resultados similares cuando se evaluó la concentración valle de LPV [Winzer R *et al*., 2003; Ma Q *et al*., 2007; Estrela R de C *et al*., 2009].

Inicialmente, Fellay J *et al*. (2002) hallaron que adultos infectados por HIV-1 homocigotas *MDR1* 3435TT presentan la mejor recuperación del recuento de células T $CD4^+$ luego de un periodo de 24 semanas post inicio de HAART. Luego, Saitoh A *et al*. (2005), estudiando un grupo de pacientes pediátricos, encontraron que los heterocigotas *MDR1* 3435CT presentan la mayor reducción de la carga viral a las 8 semanas del inicio de HAART. Sin embargo, varios estudios en cohortes de adultos no pudieron corroborar estos hallazgos [Brumme ZL *et al*., 2003; Haas DW *et al*., 2003; Nasi M *et al*., 2003; Zhu D *et al*., 2004; Verstuyft C *et al*., 2005; Winzer R *et al*., 2005; Hendrickson S *et al*.,

2008; Parathyras J *et al*., 2009]. Nosotros no hallamos una asociación del SNP *MDR1* C3435T con la respuesta inmunológica o virológica a HAART con LPV/r. Hasta el momento, la mayor parte de la evidencia apoya la idea de que el SNP *MDR1* C3435T no parecería tener un efecto en la respuesta virológica o inmunológica a la terapia antirretroviral.

El SNP *MDR1* C3435T presenta un fuerte desequilibrio de ligamiento con el SNP *MDR1* C1236T en el exón 12 [Kim RB *et al*., 2001]. Por eso, analizamos la influencia de este SNP en los niveles plasmáticos de LPV y en la respuesta virológica e inmunológica. Sorprendentemente, encontramos que los niños heterocigotas *MDR1* 1236CT presentan una concentración plasmática de LPV ($C_{post\text{-}dosis}$) significativamente menor en comparación con los homocigotas *MDR1* 1236TT, pudiendo ser un factor de riesgo para la falla virológica o el desarrollo de resistencia antirretroviral. Por otra parte, nosotros no observamos una asociación significativa entre los genotipos del SNP *MDR1* C1236T y la C_{valle} de LPV, de forma similar a un estudio realizado por Estrela R de C *et al*. (2009) en hombres adultos brasileros infectados por HIV-1. Además, la Porte CJ *et al*. (2007) no encontraron una correlación significativa entre este polimorfismo y la concentración máxima de saquinavir (PI) en voluntarios adultos sanos.

También observamos que los niños heterocigotas *MDR1* 1236CT tienen una menor reducción de la carga viral a las 36 semanas del inicio de tratamiento con LPV/r en comparación con los homocigotas *MDR1* 1236CC. Sin embargo, no encontramos un impacto del SNP *MDR1* C1236T en la respuesta inmunológica como fue reportado en el grupo de adultos estudiado por Parathyras J *et al*. (2009). Por el contrario, Zhu D *et al*. (2004) reportaron que los pacientes con el

genotipo *MDR1* 1236CC muestran un menor aumento del recuento de células T $CD4^+$ al mes y a los 9 meses del inicio de HAART respecto de los pacientes con el genotipo *MDR1* 1236TT, sin hallar diferencias en las tasas de supresión viral. La principal diferencia con nuestro estudio es que en el análisis llevado a cabo por Zhu D *et al*. (2004) se incluyó un grupo de pacientes adultos que recibieron diferentes combinaciones de tratamientos con PI como parte de HAART, mientras que en nuestra cohorte se usó LPV/r como únicos PI.

La expresión de *MDR1* esta regulada por el factor de transcripción nuclear PXR, en respuesta a endobióticos y xenobióticos. El polimorfismo C63396T de PXR fue recientemente identificado [Lamba J *et al*., 2008] y asociado con niveles de atazanavir (PI) por debajo de la concentración mínima efectiva (150 ng/ml) en una cohorte de adultos caucásicos infectados por HIV-1 [Siccardi M *et al*., 2008]. Sin embargo, nosotros no observamos un efecto de este SNP en la concentración plasmática valle y post-dosis de LPV o la respuesta a la terapia en niños infectados por HIV-1. Son necesarios más estudios para determinar el potencial impacto de PXR como modificador de la respuesta a la terapia antirretroviral.

Como se mencionó anteriormente, se debe tener en cuenta que diversos factores como la etnia, la edad, los regimenes de HAART y el criterio aplicado para el análisis de la respuesta inmunológica y virológica a la terapia (ejemplo: puntos de tiempo evaluados antes y después del tratamiento) dificultan la realización de una comparación adecuada entre los estudios farmacogenéticos.

Nuestros hallazgos sugieren que el SNP *MDR1* C1236T puede modificar los niveles plasmáticos de LPV y la respuesta virológica a HAART. A pesar de que el efecto de SNP *MDR1* C1236T en la expresión y/o actividad de P-gp no ha sido claramente establecida, hipotetizamos que los portadores del genotipo *MDR1* 1236CT podrían tener un nivel de expresión/actividad de P-gp alterado en enterocitos que limitaría la absorción de LPV y consecuentemente reduciría su concentración en células T $CD4^+$, provocando una menor disminución de la carga viral.

Finalmente, evaluamos si los SNPs de *MDR1* (C1236T y C3435T) y PXR (C63396T), la edad y la infección pediátrica por HIV-1 afectan el nivel de expresión de P-gp en linfocitos $CD4^+$. La asociación entre el polimorfismo C3435T de *MDR1* y la expresión o actividad de P-gp ha sido ampliamente investigada. Inicialmente, Hoffmeyer S *et al*. (2000) reportaron que los individuos portadores del genotipo homocigota *MDR1* 3435TT muestran menores niveles de expresión de P-gp en duodeno y menor actividad del transportador (mayor concentración plasmática de digoxina) respecto de los individuos homocigotas *MDR1* 3435CC. Además, Hitzl M *et al*. (2001) mostraron que los individuos homocigotas *MDR1* 3435TT presentan niveles de expresión de ARNm de *MDR1* y actividad de P-gp (mayor eflujo de rodamina 123) en células *natural killer* $CD56^+$ significativamente menores que los individuos homocigotas *MDR1* 3435CC. Estos resultados fueron confirmados por Owen A *et al*. (2004 a) al evaluar el nivel de expresión de P-gp en PBMC mediante ensayos de citometría de flujo. Sin embargo, otros estudios realizados en muestras de placenta e hígado no hallaron una asociación significativa entre el SNP C3435T de *MDR1* y la expresión de P-gp [Tanabe M *et al*., 2001; Owen A *et*

al., 2005 b]. En este estudio no hallamos evidencia de un efecto significativo de los polimorfismos sinónimos C1236T y C3435T de *MDR1* en el nivel de expresión de P-gp en linfocitos $CD4^+$ en un grupo de individuos normales que incluyó niños y adultos. Mas aún, Kimchi-Sarfaty C *et al*. (2007) realizaron ensayos *in vivo* de expresión transiente de P-gp *wild type* o polimórfica en células HeLa, a partir de los cuales concluyeron que ni el SNP *MDR1* C1236T ni el SNP *MDR1* C3435T alteran el nivel de expresión de ARNm *MDR1* o de la proteína P-gp. Sin embargo, detectaron diferencias en la conformación del transportador, hipotetizando que la sustitución de codones "frecuentes" por codones "poco frecuentes" (como ocurriría en presencia de polimorfismos sinónimos) podría afectar la cinética de los procesos cotraduccionales de plegamiento e inserción en membrana de P-gp, alterando la estructura de los sitios de interacción con el sustrato.

Por otra parte, Owen A *et al*. (2004 b) mostró una correlación positiva entre los niveles de expresión de ARNm de *MDR1* y PXR, sugiriendo que el nivel de expresión de genes blanco de PXR podría estar directamente determinado por el nivel de expresión de este factor de transcripción. Además, el alelo PXR 63396T ha sido asociado con un mayor nivel de expresión de ARNm PXR en hígado de donantes adultos [Lamba J *et al*., 2008]. Sin embargo, nuestro estudio no mostró un efecto significativo del SNP PXR C63396T en el nivel de expresión de P-gp en linfocitos $CD4^+$ de individuos normales.

Investigamos si la edad podría afectar el nivel de expresión de P-gp en linfocitos $CD4^+$. Encontramos una fuerte correlación positiva entre la edad y el porcentaje de células P-gp^+ en un grupo de individuos normales. La expresión

de la proteína fue menor en niños desde los 10 meses de vida y aumentó gradualmente en adultos hasta los 57 años. Estos resultados son consistentes con otros estudios [Aggarwal S *et al*., 1997; Giraud C *et al*., 2010]. Aggarwal S *et al*. (1997) reportaron que los individuos jóvenes presentan un nivel de expresión de ARNm de *MDR1* y P-gp y actividad del transportador en linfocitos $CD4^+$ significativamente menor que en los individuos adultos. Este hallazgo fue confirmado por un análisis reciente que incluyó niños recién nacidos hasta adultos mayores de 18 años [Giraud C *et al*., 2010].

Entre los estudios que analizaron el impacto de la edad en la función de P-gp en linfocitos $CD4^+$ también existen grandes discrepancias [Pilarski LM *et al*., 1995; Machado CG *et al*., 2003; Giraud C *et al*., 2009]. Mientras que Machado CG *et al*. (2003) mostraron una disminución progresiva de la actividad del transportador desde el nacimiento hasta la edad adulta, Giraud C *et al*. (2009) demostró una alta actividad de P-gp en niños recién nacidos que disminuye con la edad hasta los 2 años para luego mantenerse constante hasta la adultez. La falta de correlación entre los reportes que analizaron la expresión de *MDR1* o P-gp y aquellos que evaluaron la actividad de la proteína podría relacionarse con mecanismos de regulación post transcripcional que necesitan ser esclarecidos.

La asociación observada en este estudio tiene implicancias en la eficacia del tratamiento antirretroviral administrado en niños, quienes, debido a su menor nivel de expresión de P-gp en linfocitos $CD4^+$, podrían experimentar los riesgos asociados a una sobreexposición a moléculas terapéuticas que son sustrato de este transportador. A pesar de presentar concentraciones plasmáticas similares,

la concentración intracelular de la droga en linfocitos $CD4^+$ podría ser menor en niños que en adolescentes y adultos.

En este estudio preliminar demostramos que los niños infectados por HIV-1 expresan mayores niveles de P-gp en linfocitos $CD4^+$ que los normales pediátricos con similar rango de edad. Más aun, todos los pacientes evaluados en nuestro estudio fueron *naive* de tratamiento al momento de la determinación por citometría de flujo, permitiéndonos analizar más claramente el rol de la infección en la expresión de P-gp, sin el efecto confundente de la terapia antirretroviral. Similarmente, Gollapudi S *et al*. (1990) encontraron que la infección de HIV-1 induce un aumento en la expresión de P-gp en líneas de células T y monocitos. Además, Malorni W *et al*. (1998) observó un aumento de la expresión de P-gp en linfocitos $CD4^+$ de donantes sanos luego de 24 hs de exposición de estas células a la glicoproteína gp120 de HIV. Estos resultados fueron confirmados por Andreana A *et al.* (1996), en un estudio realizado en un grupo de adultos infectados por HIV-1, quienes presentaron un mayor nivel de expresión de P-gp, pero menor actividad, en linfocitos $CD4^+$ y $CD8^+$ respecto de los individuos control. En contraste, Meaden ER *et al*. (2001) encontraron que los niveles de expresión de P-gp en PBMC de individuos infectados por HIV-1 son significativamente menores que en voluntarios sanos. Sin embargo, a diferencia de nuestro estudio, ellos evaluaron un grupo de adultos infectados bajo tratamiento y los niveles de la proteína fueron expresados en IFM de las células $P\text{-}gp^+$. Nosotros no observamos diferencias en relación a la IFM, y sí en el porcentaje de las células $P\text{-}gp^+$ de la población de linfocitos $CD4^+$, sugiriendo que es el número de células expresando P-gp, y no el número de moléculas de

proteína por célula, lo que podría estar siendo afectado tanto por la edad como por la infección por HIV-1.

En conjunto, nuestros hallazgos sugieren que el polimorfismo C1236T de *MDR1* ejercería efectos contrapuestos en la infección pediátrica por HIV-1, al cumplir, por un lado, un rol protector en la progresión a SIDA y, por el otro, reducir la eficacia de la terapia antirretroviral, asociándose con menores niveles de droga en plasma y una menor respuesta virológica.

VI - CONCLUSIONES

1. Nuestros resultados demuestran que los polimorfismos *MDR1* C1236T y *MDR1* C3435T retrasarían la progresión a SIDA pediátrico, aun en el periodo previo al inicio de HAART, sugiriendo que P-gp jugaría un rol importante en la infección por HIV-1 independientemente de su función en el transporte de drogas.

2. Ninguno de los SNPs de *MDR1* o PXR analizados en este estudio parece influenciar la transmisión perinatal del HIV-1.

3. El polimorfismo C1236T de *MDR1* se asocia con una menor la concentración plasmática de lopinavir y una mayor carga viral, pudiendo ser un factor de riesgo para la falla virológica o el desarrollo de resistencia antirretroviral.

4. Los SNPs de *MDR1* o PXR no se asociaron con diferencias en los niveles de expresión de P-gp en linfocitos $CD4^+$.

5. La edad y la infección pediátrica por HIV-1 podrían ser dos factores claves de la determinación del nivel de expresión de P-gp en linfocitos $CD4^+$.

VII - REFERENCIAS

Aggarwal S, Tsuruo T, Gupta S. Altered expression and function of P-glycoprotein (170 kDa), encoded by the MDR 1 gene, in T cell subsets from aging humans. J Clin Immunol. **1997**; 17(6):448-54.

Albermann N, Schmitz-Winnenthal FH, Z'graggen K, Volk C, Hoffmann MM, Haefeli WE, Weiss J. Expression of the drug transporters MDR1/ABCB1, MRP1/ABCC1, MRP2/ABCC2, BCRP/ABCG2, and PXR in peripheral blood mononuclear cells and their relationship with the expression in intestine and liver. Biochem Pharmacol. **2005**; 70(6):949-58.

Ameyaw MM, Regateiro F, Li T, Liu X, Tariq M, Mobarek A, Thornton N, Folayan GO, Githang'a J, Indalo A, Ofori-Adjei D, Price-Evans DA, McLeod HL. MDR1 pharmacogenetics: frequency of the C3435T mutation in exon 26 is significantly influenced by ethnicity. Pharmacogenetics. **2001**; 11(3):217-21.

Andreana A, Aggarwal S, Gollapudi S, Wien D, Tsuruo T, Gupta S. Abnormal expression of a 170-kilodalton P-glycoprotein encoded by MDR1 gene, a metabolically active efflux pump, in CD4+ and CD8+ T cells from patients with human immunodeficiency virus type 1 infection. AIDS Res Hum Retroviruses. **1996**; 12(15):1457-62.

Ansersen PK & Gill RD. Cox.s regression model for counting processes: A large sample study. Annals of Statistics **1982**; 10(4):1100-1120.

Antonelli G, Turriziani O, Cianfriglia M, Riva E, Dong G, Fattorossi A, Dianzani F. Resistance of HIV-1 to AZT might also involve the cellular expression of

multidrug resistance P-glycoprotein. AIDS Res Hum Retroviruses. **1992**; 8(10):1839-44.

Auger I, Thomas P, De Gruttola V, Morse D, Moore D, Williams R, Truman B, Lawrence CE. Incubation periods for paediatric AIDS patients. Nature. **1988**; 336(6199):575-7.

Barnhart HX, Caldwell MB, Thomas P, Mascola L, Ortiz I, Hsu HW, Schulte J, Parrott R, Maldonado Y, Byers R. Natural history of human immunodeficiency virus disease in perinatally infected children: an analysis from the Pediatric Spectrum of Disease Project. Pediatrics. **1996**; 97(5):710-6.

Bernal ML, Sinues B, Fanlo A, Mayayo E. Frequency distribution of C3435T mutation in exon 26 of the MDR1 gene in a Spanish population. Ther Drug Monit. **2003**; 25(1):107-11.

Blanche S, Rouzioux C, Moscato ML, Veber F, Mayaux MJ, Jacomet C, Tricoire J, Deville A, Vial M, Firtion G, de Crepy A, Douard D, Robin M, Courpotin C, Ciraru-Vigneron N, le Deist F, Griscelli C, and the HIV Infection in Newborns French Collab Study Group. N Engl J Med. **1989**; 320(25):1643-8.

Bleiber G, May M, Suarez C, Martinez R, Marzolini C, Egger M, Telenti A; Swiss HIV Cohort Study. MDR1 genetic polymorphism does not modify either cell permissiveness to HIV-1 or disease progression before treatment. J Infect Dis. **2004**; 189(4):583-6.

Bradshaw DM, Arceci RJ. Clinical relevance of transmembrane drug efflux as a mechanism of multidrug resistance. J Clin Oncol. **1998**; 16(11):3674-90.

Brumme ZL, Dong WW, Chan KJ, Hogg RS, Montaner JS, O'Shaughnessy MV, Harrigan PR. Influence of polymorphisms within the CX3CR1 and MDR-1 genes on initial antiretroviral therapy response. AIDS. **2003**; 17(2):201-8.

Cai C, Chen J. Overexpression of caveolin-1 induces alteration of multidrug resistance in Hs578T breast adenocarcinoma cells. Int J Cancer. **2004**; 111(4):522-9.

Camus M, Deloménie C, Didier N, Faye A, Gil S, Dauge MC, Mabondzo A, Farinotti R. Increased expression of MDR1 mRNAs and P-glycoprotein in placentas from HIV-1 infected women. Placenta. **2006**; 27(6-7):699-706.

Cascorbi I, Gerloff T, Johne A, Meisel C, Hoffmeyer S, Schwab M, Schaeffeler E, Eichelbaum M, Brinkmann U, Roots I. Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in white subjects. Clin Pharmacol Ther. **2001**; 69(3):169-74.

Centers for Disease Control (CDC). Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men--New York City and California. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. **1981 a**; 30(25):305-8.

Centers for Disease Control (CDC). Pneumocystis pneumonia--Los Angeles. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. **1981 b**; 30(21):250-2.

Centers for Disease Control (CDC). Update on acquired immune deficiency syndrome (AIDS)--United States. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. **1982 a**; 31(37):507-8, 513-4.

Centers for Disease Control (CDC). Pneumocystis carinii pneumonia among persons with hemophilia A. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. **1982 b**; 31(27):365-7.

Centers for Disease Control (CDC). Possible transfusion-associated acquired immune deficiency syndrome (AIDS) - California. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. **1982 c**; 31(48):652-4.

Centers for Disease Control (CDC). Unexplained immunodeficiency and opportunistic infections in infants--New York, New Jersey, California. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. **1982 d**; 31(49):665-7.

Centers for Disease Control (CDC). Immunodeficiency among female sexual partners of males with acquired immune deficiency syndrome (AIDS) - New York. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. **1983**; 31(52):697-8.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Revised classification system for human immunodeficiency virus (HIV) infection in children under 13 years of age. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. **1994**; 43(RR-12):1-10.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Working Group on Antiretroviral Therapy and Medical Management of HIV infected children. **2006**.

Choo EF, Leake B, Wandel C, Imamura H, Wood AJ, Wilkinson GR, Kim RB. Pharmacological inhibition of P-glycoprotein transport enhances the distribution of HIV-1 protease inhibitors into brain and testes. Drug Metab Dispos. **2000**; 28(6):655-60.

Cianfriglia M, Dupuis ML, Molinari A, Verdoliva A, Costi R, Galluzzo CM, Andreotti M, Cara A, Di Santo R, Palmisano L. HIV-1 integrase inhibitors are substrates for the multidrug transporter MDR1-P-glycoprotein. Retrovirology. **2007**; 4:17.

Clavel F, Guétard D, Brun-Vézinet F, Chamaret S, Rey MA, Santos-Ferreira MO, Laurent AG, Dauguet C, Katlama C, Rouzioux C, Klatzman D, Champalimud JL, Montagnier L. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. Science. **1986**; 233(4761):343-6.

Comans-Bitter WM, de Groot R, van den Beemd R, Neijens HJ, Hop WC, Groeneveld K, Hooijkaas H, van Dongen JJ. Immunophenotyping of blood lymphocytes in childhood. Reference values for lymphocyte subpopulations. J Pediatr. **1997**; 130(3):388-93.

Comings DE, MacMurray JP. Molecular heterosis: a review. Mol Genet Metab. **2000**; 71(1-2):19-31.

Connor EM, Sperling RS, Gelber R, Kiselev P, Scott G, O'Sullivan MJ, VanDyke R, Bey M, Shearer W, Jacobson RL, Jimenez E, O'Neill E, Bazin B, Delfraissy JF, Culnane M, Coombs R, Elkins M, Moye J, Stratton P, Balsley J. Reduction of

maternal-infant transmission of human immunodeficiency virus type 1 with zidovudine treatment. Pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 076 Study Group. N Engl J Med. **1994**; 331(18):1173-80.

Cooper ER, Charurat M, Mofenson L, Hanson IC, Pitt J, Diaz C, Hayani K, Handelsman E, Smeriglio V, Hoff R, Blattner W; Women and Infants' Transmission Study Group. Combination antiretroviral strategies for the treatment of pregnant HIV-1-infected women and prevention of perinatal HIV-1 transmission. J Acquir Immune Defic Syndr. **2002**; 29(5):484-94.

Curras V, Hocht C, Mangano A, Niselman V, Mariño Hernández E, Cáceres Guido P, Mecikovsky D, Bellusci C, Bologna R, Sen L, Rubio MC, Bramuglia GF. Pharmacokinetic study of the variability of indinavir drug levels when boosted with ritonavir in HIV-infected children. Pharmacology. **2009**; 83(1):59-66.

Dreimane D, Nielsen K, Deveikis A, Bryson YJ, Geffner ME. Effect of protease inhibitors combined with standard antiretroviral therapy on linear growth and weight gain in human immunodeficiency virus type 1-infected children. Pediatr Infect Dis J. **2001**; 20(3):315-6.

Duliege AM, Messiah A, Blanche S, Tardieu M, Griscelli C, Spira A. Natural history of human immunodeficiency virus type 1 infection in children: prognostic value of laboratory tests on the bimodal progression of the disease. Pediatr Infect Dis J. **1992**; 11(8):630-5.

Estevez ME, Bruno S, Sen L, Scaglione C, Diez RA, Musso AM. Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) with Kaposi's sarcoma in homosexuals in Argentina. Medicina (B Aires). **1983**; 43(4):477.

Estrela R de C, Ribeiro FS, Barroso PF, Tuyama M, Gregório SP, Dias-Neto E, Struchiner CJ, Suarez-Kurtz G. ABCB1 polymorphisms and the concentrations of lopinavir and ritonavir in blood, semen and saliva of HIV-infected men under antiretroviral therapy. Pharmacogenomics. **2009**; 10(2):311-8.

European Collaborative Study. Children born to women with HIV-1 infection: natural history and risk of transmission. Lancet. **1991**; 337(8736):253-60.

European Collaborative Study. Mother-to-child transmission of HIV infection in the era of highly active antiretroviral therapy. Clin Infect Dis. **2005**; 40(3):458-65.

European Mode of Delivery Collaboration. Elective caesarean-section versus vaginal delivery in prevention of vertical HIV-1 transmission: a randomised clinical trial. Lancet. **1999**; 353(9158):1035-9.

Fellay J, Marzolini C, Meaden ER, Back DJ, Buclin T, Chave JP, Decosterd LA, Furrer H, Opravil M, Pantaleo G, Retelska D, Ruiz L, Schinkel AH, Vernazza P, Eap CB, Telenti A; Swiss HIV Cohort Study. Response to antiretroviral treatment in HIV-1-infected individuals with allelic variants of the multidrug resistance transporter 1: a pharmacogenetics study. Lancet. **2002**; 359(9300):30-6.

Fojo A, Lebo R, Shimizu N, Chin JE, Roninson IB, Merlino GT, Gottesman MM, Pastan I. Localization of multidrug resistance-associated DNA sequences to human chromosome 7. Somat Cell Mol Genet. **1986**; 12(4):415-20.

Ford JM. Experimental reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by pharmacological chemosensitisers. Eur J Cancer. **1996**; 32A(6):991-1001.

Ford J, Hoggard PG, Owen A, Khoo SH, Back DJ. A simplified approach to determining P-glycoprotein expression in peripheral blood mononuclear cell subsets. J Immunol. Methods **2003**; 274(1-2):129-37.

Fung KL, Gottesman MM. A synonymous polymorphism in a common MDR1 (ABCB1) haplotype shapes protein function. Biochim Biophys Acta. **2009**; 1794(5):860-71.

Furuno T, Landi MT, Ceroni M, Caporaso N, Bernucci I, Nappi G, Martignoni E, Schaeffeler E, Eichelbaum M, Schwab M, Zanger UM. Expression polymorphism of the blood-brain barrier component P-glycoprotein (MDR1) in relation to Parkinson's disease. Pharmacogenetics. **2002**; 12(7):529-34.

Geick A, Eichelbaum M, Burk O. Nuclear receptor response elements mediate induction of intestinal MDR1 by rifampin. J Biol Chem. **2001**; 276(18):14581-7.

Gibb DM, Tess BH. Interventions to reduce mother-to-child transmission of HIV infection: new developments and current controversies. AIDS. **1999**; 13 Suppl A:S93-102.

Giraud C, Declèves X, Perrot JY, Manceau S, Pannier E, Firtion G, Morini JP, Chappuy H, Batteux F, Chouzenoux S, Scherrmann JM, Blanche S, Tréluyer JM. High levels of P-glycoprotein activity in human lymphocytes in the first 6 months of life. Clin Pharmacol Ther. **2009**; 85(3):289-95.

Giraud C, Manceau S, Declèves X, Goffinet F, Morini JP, Chappuy H, Batteux F, Chouzenoux S, Yousif S, Scherrmann JM, Blanche S, Tréluyer JM. Influence of development, HIV infection, and antiretroviral therapies on the gene expression profiles of ABC transporters in human lymphocytes. J Clin Pharmacol. **2010**; 50(2):226-30.

Gollapudi S, Gupta S. Human immunodeficiency virus I-induced expression of P-glycoprotein. Biochem Biophys Res Commun. **1990**; 171(3):1002-7.

Goodwin B, Hodgson E, D'Costa DJ, Robertson GR, Liddle C. Transcriptional regulation of the human CYP3A4 gene by the constitutive androstane receptor. Mol Pharmacol. **2002**; 62(2):359-65.

Gortmaker SL, Hughes M, Cervia J, Brady M, Johnson GM, Seage GR 3rd, Song LY, Dankner WM, Oleske JM; Pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 219 Team. Effect of combination therapy including protease inhibitors on

mortality among children and adolescents infected with HIV-1. N Engl J Med. **2001**; 345(21):1522-8.

Gottesman MM, Hrycyna CA, Schoenlein PV, Germann UA, Pastan I. Genetic analysis of the multidrug transporter. Annu Rev Genet. **1995**; 29:607-49.

Haas DW, Wu H, Li H, Bosch RJ, Lederman MM, Kuritzkes D, Landay A, Connick E, Benson C, Wilkinson GR, Kessler H, Kim RB. MDR1 gene polymorphisms and phase 1 viral decay during HIV-1 infection: an adult AIDS Clinical Trials Group study. J Acquir Immune Defic Syndr. **2003**; 34(3):295-8.

Hellemann D, Larsson A, Madsen HO, Bonde J, Jarløv JO, Wiis J, Faber T, Wetterslev J, Garred P. Heterozygosity of mannose-binding lectin (MBL2) genotypes predicts advantage (heterosis) in relation to fatal outcome in intensive care patients. Hum Mol Genet. **2007**; 16(24):3071-80.

Hendrickson SL, Jacobson LP, Nelson GW, Phair JP, Lautenberger J, Johnson RC, Kingsley L, Margolick JB, Detels R, Goedert JJ, O'Brien SJ. Host genetic influences on highly active antiretroviral therapy efficacy and AIDS-free survival. J Acquir Immune Defic Syndr. **2008**; 48(3):263-71.

Hitzl M, Drescher S, van der Kuip H, Schäffeler E, Fischer J, Schwab M, Eichelbaum M, Fromm MF. The C3435T mutation in the human MDR1 gene is associated with altered efflux of the P-glycoprotein substrate rhodamine 123 from CD56+ natural killer cells. Pharmacogenetics. **2001**; 11(4):293-8.

Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmöller J, Johne A, Cascorbi I, Gerloff T, Roots I, Eichelbaum M, Brinkmann U. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A. **2000**; 97(7):3473-8.

Hulgan T, Donahue JP, Hawkins C, Unutmaz D, D'Aquila RT, Raffanti S, Nicotera F, Rebeiro P, Erdem H, Rueff M, Haas DW. Implications of T-cell P-glycoprotein activity during HIV-1 infection and its therapy. J Acquir Immune Defic Syndr. **2003**; 34(2):119-26.

Ifergan I, Bernard NF, Bruneau J, Alary M, Tsoukas CM, Roger M. Allele frequency of three functionally active polymorphisms of the MDR-1 gene in high-risk HIV-negative and HIV-positive Caucasians. AIDS. **2002**; 16(17):2340-2.

Inaba M, Kobayashi H, Sakurai Y, Johnson RK. Active efflux of daunorubicin and adriamycin in sensitive and resistant sublines of P388 leukemia. Cancer Res. **1979**; 39(6 Pt 1):2200-3.

Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. Biochim Biophys Acta. **1976**; 455(1):152-62.

Kedmi M, Maayan S, Cohen SB, Hauzi M, Rund D. MDR1 and CYP3A4 polymorphisms are associated with HIV seropositivity in Israeli patients but do

not influence the course of HIV disease. AIDS Patient Care STDS. **2007**; 21(9):653-8.

Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW, Sauna ZE, Calcagno AM, Ambudkar SV, Gottesman MM. A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. Science. **2007**; 315(5811):525-8.

Kim RB, Fromm MF, Wandel C, Leake B, Wood AJ, Roden DM, Wilkinson GR. The drug transporter P-glycoprotein limits oral absorption and brain entry of HIV-1 protease inhibitors. J Clin Invest. **1998**; 101(2):289-94.

Kim RB, Leake BF, Choo EF, Dresser GK, Kubba SV, Schwarz UI, Taylor A, Xie HG, McKinsey J, Zhou S, Lan LB, Schuetz JD, Schuetz EG, Wilkinson GR. Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans. Clin Pharmacol Ther. **2001**; 70(2):189-99.

Komoto C, Nakamura T, Sakaeda T, Kroetz DL, Yamada T, Omatsu H, Koyama T, Okamura N, Miki I, Tamura T, Aoyama N, Kasuga M, Okumura K. MDR1 haplotype frequencies in Japanese and Caucasian, and in Japanese patients with colorectal cancer and esophageal cancer. Drug Metab Pharmacokinet. **2006**; 21(2):126-32.

Kopka J, Batalla M, Mangano A, Mecikovsky D, Bologna R, Sen L. Relevance of viral phenotype in the early AIDS outcome of pediatric HIV-1 primary infection. Pediatr Res. **2002**; 52(4):475-80.

Lamba J, Lamba V, Strom S, Venkataramanan R, Schuetz E. Novel single nucleotide polymorphisms in the promoter and intron 1 of human pregnane X receptor/NR1I2 and their association with CYP3A4 expression. Drug Metab Dispos. **2008**; 36(1):169-81.

la Porte CJ, Li Y, Béïque L, Foster BC, Chauhan B, Garber GE, Cameron DW, van Heeswijk RP. The effect of ABCB1 polymorphism on the pharmacokinetics of saquinavir alone and in combination with ritonavir. Clin Pharmacol Ther. **2007**; 82(4):389-95.

Lee CG, Gottesman MM, Cardarelli CO, Ramachandra M, Jeang KT, Ambudkar SV, Pastan I, Dey S. HIV-1 protease inhibitors are substrates for the MDR1 multidrug transporter. Biochemistry. **1998**; 37(11):3594-601.

Lee CG, Ramachandra M, Jeang KT, Martin MA, Pastan I, Gottesman MM. Effect of ABC transporters on HIV-1 infection: inhibition of virus production by the MDR1 transporter. FASEB J. **2000**; 14(3):516-22.

Llano M, Kelly T, Vanegas M, Peretz M, Peterson TE, Simari RD, Poeschla EM. Blockade of human immunodeficiency virus type 1 expression by caveolin-1. J Virol. **2002**; 76(18):9152-64.

Lynne M, Mofenson JS, Lambert E, Stiehm R, Bethel J, Meyer WA, Whitehouse J, Moye J, Reichelderfer P, Harris DR, Glenn Fowler M, Mathieson BJ, and. Nemo GJ, for the Pediatric AIDS Clinical Trials Group Study 185 Team. Risk factors for

perinatal transmission of human immunodeficiency virus type 1 in women treated with zidovudine. NEJM **1999**; 341: 385-93.

Machado CG, Calado RT, Garcia AB, Falcão RP. Age-related changes of the multidrug resistance P-glycoprotein function in normal human peripheral blood T lymphocytes. Braz J Med Biol Res. **2003**; 36(12):1653-7.

Malorni W, Lucia MB, Rainaldi G, Cauda R, Cianfriglia M, Donelli G, Ortona L. Intracellular expression of P-170 glycoprotein in peripheral blood mononuclear cell subsets from healthy donors and HIV-infected patients. Haematologica. **1998**; 83(1):13-20.

Mangano A, Prada F, Roldán A, Picchio G, Bologna R, Sen L. Distribution of CCR-5 delta32 allele in Argentinian children at risk of HIV-1 infection: its role in vertical transmission. AIDS. **1998**; 12(1):109-10.

Mangano A, Kopka J, Batalla M, Bologna R, Sen L. Protective effect of CCR2-64I and not of CCR5-delta32 and SDF1-3'A in pediatric HIV-1 infection. J Acquir Immune Defic Syndr. **2000**; 23(1):52-7.

Mangano A, Gonzalez E, Dhanda R, Catano G, Bamshad M, Bock A, Duggirala R, Williams K, Mummidi S, Clark RA, Ahuja SS, Dolan MJ, Bologna R, Sen L, Ahuja SK. Concordance between the CC chemokine receptor 5 genetic determinants that alter risks of transmission and disease progression in children exposed perinatally to human immunodeficiency virus. J Infect Dis. **2001**; 183(11):1574-85.

Ma Q, Brazeau D, Zingman BS, Reichman RC, Fischl MA, Gripshover BM, Venuto CS, Slish JC, DiFrancesco R, Forrest A, Morse GD. Multidrug resistance 1 polymorphisms and trough concentrations of atazanavir and lopinavir in patients with HIV. Pharmacogenomics. **2007**; 8(3):227-35.

Marzolini C, Paus E, Buclin T, Kim RB. Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. Clin. Pharmacol. Ther. **2004**; 75(1):13-33.

Meaden ER, Hoggard PG, Maher B, Khoo SH, Back DJ. Expression of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein in healthy volunteers and HIV-infected patients. AIDS Res Hum Retroviruses. **2001**; 17(14):1329-32.

Misrahi M, Teglas JP, N'Go N, Burgard M, Mayaux MJ, Rouzioux C, Delfraissy JF, Blanche S. CCR5 chemokine receptor variant in HIV-1 mother-to-child transmission and disease progression in children. JAMA. **1998**; 279(4):277-80.

MSAL (Dirección de SIDA y ETS, Ministerio de Salud, Presidencia de la Nación). Boletín sobre el VIH-SIDA en la Argentina. **2010**; Año XIII, Número 27.

Nakamura T, Sakaeda T, Horinouchi M, Tamura T, Aoyama N, Shirakawa T, Matsuo M, Kasuga M, Okumura K. Effect of the mutation (C3435T) at exon 26 of the MDR1 gene on expression level of MDR1 messenger ribonucleic acid in duodenal enterocytes of healthy Japanese subjects. Clin Pharmacol Ther. **2002**; 71(4):297-303.

Nasi M, Borghi V, Pinti M, Bellodi C, Lugli E, Maffei S, Troiano L, Richeldi L, Mussini C, Esposito R, Cossarizza A. MDR1 C3435T genetic polymorphism does not influence the response to antiretroviral therapy in drug-naive HIV-positive patients. AIDS. **2003**; 17(11):1696-8.

Owen A, Chandler B, Bray PG, Ward SA, Hart CA, Back DJ, Khoo SH. Functional correlation of P-glycoprotein expression and genotype with expression of the human immunodeficiency virus type 1 coreceptor CXCR4. J Virol. **2004 a**; 78(21):12022-9.

Owen A, Chandler B, Back DJ, Khoo SH. Expression of pregnane-X-receptor transcript in peripheral blood mononuclear cells and correlation with MDR1 mRNA. Antivir Ther. **2004 b**; 9(5):819-21.

Owen A, Chandler B, Back DJ. The implications of P-glycoprotein in HIV: friend or foe? Fundam Clin Pharmacol. **2005 a**; 19(3):283-96.

Owen A, Goldring C, Morgan P, Chadwick D, Park BK, Pirmohamed M. Relationship between the C3435T and G2677T(A) polymorphisms in the ABCB1 gene and P-glycoprotein expression in human liver. Br J Clin Pharmacol. **2005 b**; 59(3):365-70.

Parathyras J, Gebhardt S, Hillermann-Rebello R, Grobbelaar N, Venter M, Warnich L. A pharmacogenetic study of CD4 recovery in response to HIV antiretroviral therapy in two South African population groups. J Hum Genet. **2009**; 54(5):261-5.

Persidis A. Cancer multidrug resistance. Nat Biotechnol. **1999**; 17(1):94-5.

Pilarski LM, Paine D, McElhaney JE, Cass CE, Belch AR. Multidrug transporter P-glycoprotein 170 as a differentiation antigen on normal human lymphocytes and thymocytes: modulation with differentiation stage and during aging. Am J Hematol. **1995**; 49(4):323-35.

Rakhmanina NY, Neely MN, Van Schaik RH, Gordish-Dressman HA, Williams KD, Soldin SJ, van den Anker JN. CYP3A5, ABCB1, and SLCO1B1 polymorphisms and pharmacokinetics and virologic outcome of lopinavir/ritonavir in HIV-infected children. Ther Drug Monit. **2011**; 33(4):417-24.

Ramachandran C, Melnick SJ. Multidrug resistance in human tumors-molecular diagnosis and clinical significance. Mol Diagn. **1999**; 4(2):81-94.

Saitoh A, Singh KK, Powell CA, Fenton T, Fletcher CV, Brundage R, Starr S, Spector SA. An MDR1-3435 variant is associated with higher plasma nelfinavir levels and more rapid virologic response in HIV-1 infected children. AIDS. **2005**; 19(4):371-80.

Sarkadi B, Muller M. Search for specific inhibitors of multidrug resistance in cancer. Semin Cancer Biol. **1997**; 8(3):171-82.

Schipani A, Siccardi M, D'Avolio A, Baietto L, Simiele M, Bonora S, Rodríguez Novoa S, Cuenca L, Soriano V, Chierakul N, Saguenwong N, Chuchuttaworn C,

Hoskins JM, Dvorak AM, McLeod HL, Davies G, Khoo S, Back DJ, Di Perri G, Owen A. Population pharmacokinetic modeling of the association between 63396C->T pregnane X receptor polymorphism and unboosted atazanavir clearance. Antimicrob Agents Chemother. **2010**; 54(12):5242-50.

Siccardi M, D'Avolio A, Baietto L, Gibbons S, Sciandra M, Colucci D, Bonora S, Khoo S, Back DJ, Di Perri G, Owen A. Association of a single-nucleotide polymorphism in the pregnane X receptor (PXR 63396C-->T) with reduced concentrations of unboosted atazanavir. Clin Infect Dis. **2008**; 47(9):1222-5.

Siegsmund M, Brinkmann U, Schäffeler E, Weirich G, Schwab M, Eichelbaum M, Fritz P, Burk O, Decker J, Alken P, Rothenpieler U, Kerb R, Hoffmeyer S, Brauch H. Association of the P-glycoprotein transporter MDR1(C3435T) polymorphism with the susceptibility to renal epithelial tumors. J Am Soc Nephrol. **2002**; 13(7):1847-54.

Speck RR, Yu XF, Hildreth J, Flexner C. Differential effects of p-glycoprotein and multidrug resistance protein-1 on productive human immunodeficiency virus infection. J Infect Dis. **2002**; 186(3):332-40.

Störmer E, von Moltke LL, Perloff MD, Greenblatt DJ. Differential modulation of P-glycoprotein expression and activity by non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors in cell culture. Pharm Res. **2002**; 19(7):1038-45.

Synold TW, Dussault I, Forman BM. The orphan nuclear receptor SXR coordinately regulates drug metabolism and efflux. Nat Med. **2001**; 7(5):584-90.

Szabo D, Keyzer H, Kaiser HE, Molnar J. Reversal of multidrug resistance of tumor cells. Anticancer Res. **2000**; 20(6B):4261-74.

Tanabe M, Ieiri I, Nagata N, Inoue K, Ito S, Kanamori Y, Takahashi M, Kurata Y, Kigawa J, Higuchi S, Terakawa N, Otsubo K. Expression of P-glycoprotein in human placenta: relation to genetic polymorphism of the multidrug resistance (MDR)-1 gene. J Pharmacol Exp Ther. **2001**; 297(3):1137-43.

The European Collaborative Study. Maternal viral load and vertical transmission of HIV-1: an important factor but not the only one. AIDS. **1999**; 13(11):1377-85.

Tovo PA, de Martino M, Gabiano C, Cappello N, D'Elia R, Loy A, Plebani A, Zuccotti GV, Dallacasa P, Ferraris G. Prognostic factors and survival in children with perinatal HIV-1 infection. The Italian Register for HIV Infections in Children. Lancet. **1992**; 339(8804):1249-53.

Tresoldi E, Romiti ML, Boniotto M, Crovella S, Salvatori F, Palomba E, Pastore A, Cancrini C, de Martino M, Plebani A, Castelli G, Rossi P, Tovo PA, Amoroso A, Scarlatti G; European Shared Cost Project Group; Italian Register for HIV Infection in Children. Prognostic value of the stromal cell-derived factor 1 3'A

mutation in pediatric human immunodeficiency virus type 1 infection. J Infect Dis. **2002**; 185(5):696-700.

Ueda I, Yoshida T. Hydration of lipid membranes and the action mechanisms of anesthetics and alcohols. Chem Phys Lipids. **1999**; 101(1):65-79.

UNAIDS. Report on the global AIDS epidemic 2010. **2010**.

Verstuyft C, Marcellin F, Morand-Joubert L, Launay O, Brendel K, Mentré F, Peytavin G, Gérard L, Becquemont L, Aboulker JP; ANRS081 Study Group. Absence of association between MDR1 genetic polymorphisms, indinavir pharmacokinetics and response to highly active antiretroviral therapy. AIDS. **2005**; 19(18):2127-31.

Washington CB, Wiltshire HR, Man M, Moy T, Harris SR, Worth E, Weigl P, Liang Z, Hall D, Marriott L, Blaschke TF. The disposition of saquinavir in normal and P-glycoprotein deficient mice, rats, and in cultured cells. Drug Metab Dispos. **2000**; 28(9):1058-62.

Wilfert CM, Wilson C, Luzuriaga K, Epstein L. Pathogenesis of pediatric human immunodeficiency virus type 1 infection. J Infect Dis. **1994**; 170(2):286-92.

Wilfert CM, Gross PA, Kaplan JE, Holmes KK, Masur H, Phair JP, Simonds RJ. Quality standard for the enumeration of CD4+ lymphocytes in infants and children exposed to or infected with human immunodeficiency virus. Clin Infect Dis. **1995**; 21 Suppl 1:S134-5.

Winkler C, Modi W, Smith MW, Nelson GW, Wu X, Carrington M, Dean M, Honjo T, Tashiro K, Yabe D, Buchbinder S, Vittinghoff E, Goedert JJ, O'Brien TR, Jacobson LP, Detels R, Donfield S, Willoughby A, Gomperts E, Vlahov D, Phair J, O'Brien SJ. Genetic restriction of AIDS pathogenesis by an SDF-1 chemokine gene variant. Science. **1998**; 279(5349):389-93.

Winzer R, Langmann P, Zilly M, Tollmann F, Schubert J, Klinker H, Weissbrich B. No influence of the P-glycoprotein genotype (MDR1 C3435T) on plasma levels of lopinavir and efavirenz during antiretroviral treatment. Eur J Med Res. **2003**; 8(12):531-4.

Winzer R, Langmann P, Zilly M, Tollmann F, Schubert J, Klinker H, Weissbrich B. No influence of the P-glycoprotein polymorphisms MDR1 G2677T/A and C3435T on the virological and immunological response in treatment naïve HIV-positive patients. Ann Clin Microbiol Antimicrob. **2005**; 4:3.

Zhu D, Taguchi-Nakamura H, Goto M, Odawara T, Nakamura T, Yamada H, Kotaki H, Sugiura W, Iwamoto A, Kitamura Y. Influence of single-nucleotide polymorphisms in the multidrug resistance-1 gene on the cellular export of nelfinavir and its clinical implication for highly active antiretroviral therapy. Antivir Ther. **2004**; 9(6):929-35.

TABLA A1. ***Sustratos, inhibidores e inductores de P-gp*** (tabla adaptada de Marzolini C *et al*., 2004)

Droga	Sustrato	Inhibidor	Inductor
Agentes anticancerígenos			
Actinomicina D	x		
Daunorubicina	x		
Docetaxel	x		
Doxorubicina	x		
Etopósido	x		
Imatinib	x		
Irinotecan	x		
Mitomicina C	x		
Mitoxantrona	x		
Paclitaxel	x		
Tenipósido	x		
Topotecán	x		
Vinblastina	x		
Vincristina	x		
Agentes antihipertensivos			
Carvedilol		x	
Celiprolol	x		
Diltiazem	x		
Losartan	x		
Nicardipina		x	
Reserpina		x	
Talinolol	x		
Agentes antirrítmicos			
Amiodarona		x	
Digoxina	x		
Propafenona		x	
Quinidina	x	x	
Verapamilo	x	x	
Esteroides			
Aldosterona	x		
Cortisol	x		
Dexametasona	x		x
Metilprednisolona	x		
Antibióticos			
Claritromicina		x	
Eritromicina	x	x	
Levofloxacina	x		
Rifampina	x		x
Sparfloxacina	x		
Tetraciclina	x		
Antimicóticos			
Itraconazol	x	x	
Ketoconazol		x	
Antiácidos			
Cimetidina	x		
Ranitidina	x		

Continuación de TABLA A1

Droga	Sustrato	Inhibidor	Inductor
Inmunosupresores			
Ciclosporina	x	x	
Sirolimus	x	x	
Tacrolimus	x	x	
Valspodar	x	x	
Antidepresivos			
Amitriptilina	x		
Fluoxetina		x	
Hierba de San Juan			x
Paroxetina		x	
Sertralina		x	
Neurolépticos			
Clorpromazina		x	
Fenotiazina			x
Flupentixol		x	
Antiepilépticos			
Fenobarbital	x		
Fenitoína	x		
Opioides			
Metadona		x	
Morfina	x		x
Pentazocina		x	
Antieméticos			
Domperidona	x		
Ondansetrón	x		
Inhibidores de proteasa			
Amprenavir	x		x
Atazanavir	x	x	x
Indinavir	x	x	x
Lopinavir	x	x	
Nelfinavir	x	x	x
Ritonavir	x	x	x
Saquinavir	x	x	x
Otros			
Acido retinóico			x
Atorvastatina	x	x	
Bromocriptina		x	
Colchicina	x		
Dipiridamol		x	
Emetina		x	
Fexofenadina	x		
Ivermectina	x		
Loperamida	x		
Mefloquina	x	x	
Progesterona		x	
Rodamina 123	x		
Espironolactona		x	
Terfenadina	x		
Vecuronium	x		