
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS
Biológicas y Agropecuarias



"Evaluación de la resistencia del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) a los Antirretrovirales a partir del Análisis Genómico de las regiones de la Proteasa y Retrotranscriptasa en individuos del Centro y Occidente de México"

TESIS PROFESIONAL

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

**PRESENTA
LILIANA GÓMEZ FLORES RAMOS**

Las Agujas, Zapopan, Jalisco, Octubre de 2008



Universidad de Guadalajara
Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Coordinación de Titulación y Carrera de Licenciatura en Biología

1349/ C. C. BIOLOGÍA

C. LILIANA GÓMEZ FLORES RAMOS

PRESENTE

Manifestamos a usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de: **TESIS E INFORMES** opción **TESIS** con el título : “ **Evaluación de la resistencia del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) a los Antirretrovirales a partir del análisis genómico de las regiones de la Proteasa y Retrotranscriptasa en individuos del Centro y Occidente de México**” para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director / a de dicho trabajo el **DR. EDUARDO VAZQUEZ VALLS** y como asesor la **DRA. MARTHA ESCOTO DELGADILLO**.

Sin más por el momento, le envío un caluroso saludo.

ATENTAMENTE

“PIENSA Y TRABAJA”

Las Agujas, Zapopan., 03 de julio del 2008.

DR. FRANCISCO MARTÍN HUERTA MARTÍNEZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN



COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

M en C. GLORIA PARADA BARRERA
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

Dr. Fco. Martín Huerta Martínez.
 Presidente del Comité de Titulación.
 Licenciatura en Biología.
 CUCBA.
 Presente

Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad Tesis, opción Tesis con el título: "Evaluación de la resistencia del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) a los antirretrovirales a partir del análisis genómico de las regiones de la Proteasa y Retrotranscriptasa en individuos del Centro y Occidente de México" que realizó la pasante Liliana Gómez Ramos con número de código 399824883 consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

Atentamente
 6 de Octubre de 2008
 La Agujas, Zapopan, Jalisco

Vo Bo

Dr. Eduardo Vázquez Valls
 Director/a del trabajo,

Martha E
 Dra. Martha Escoto Delgado
 Asesor

URS

Nombre completo de los Síndicos asesores por el Comité de Titulación	Firma de aprobación	Fecha de aprobación
Dra. Anne M. Santerre Lucas	<i>ASanterre</i>	13/oct/08
Dra. Patricia Castro Félix	<i>Patricia Castro</i>	13/oct/08
Dr. Ramón Reynoso Orozco	<i>Ramón Reynoso</i>	13/oct/08
Suplente. Dra. Josefina Casas Solís	<i>Josefina Casas</i>	13/oct/08

Éste trabajo de Tesis se realizó en:

Instituto Mexicano del Seguro Social

Centro de Investigación Biomédica de Occidente

Laboratorio de Inmunodeficiencias y Retrovirus Humanos

A mis padres y abuelos.

ÍNDICE

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
1. ABSTRACT	2
2. INTRODUCCIÓN	3
3. ANTECEDENTES	4
3.1 El virus de la inmunodeficiencia humana	4
3.1.1 Historia Natural	4
3.1.2 Origen y evolución del VIH	5
3.1.3 Hipótesis sobre la transmisión del VIH	6
3.2 Clasificación	8
3.2.1 VIH-1	9
3.2.2 VIH-2	9
3.2.3 Diversidad y distribución del VIH	10
3. 3 Epidemiología	12
3.4 Estructura del VIH	14
3.5 Genoma del VIH	15
3.6 Proteonoma del VIH	17
3.7 Ciclo de Infección	17
3.7.1 Adhesión y fusión	18
3.7.2 Integración	18
3.7.3 Latencia	19
3.7.4 Transcripción	19

3.7.5 Maduración	19
3.8 Respuesta inmune	21
3.9 Propiedades físico-biológicas	21
3.10 Mecanismos de transmisión	22
3.11 Síndrome de la Inmunodeficiencia Humana Adquirida	23
3.12 Tratamiento antirretroviral	25
3.12.1 Inhibidores de la proteasa (IP)	26
3.12.2 Inhibidores de la transcriptasa reversa análogos de los nucleósidos (ITRAN)	26
3.12.3 Inhibidores de la transcriptasa reversa no- análogos de los nucleósidos (ITRANN)	26
3.12.4 Inhibidores de fusión (IF)	27
3.12.5 Inhibidores de entrada (IE)	27
3.12.6 Inhibidores de integrasa (IN)	27
3.12.7 Fármacos antirretrovirales	29
3.13 Resistencia a los antirretrovirales	29
3.13.1 Mutaciones de resistencia	31
3.13.1.1 Mutaciones de la proteasa	32
3.13.1.2 Mutaciones de la transcriptasa reversa	33
3.13.1.3 Mutaciones de la integrasa	34
3.13.1.4 Mutaciones de la envoltura	34
3.13.2 Prevalencia de mutaciones de resistencia a los antirretrovirales	34

3.13.2.1 Prevalencia de mutaciones de resistencia en individuos naïve al tratamiento	35
3.13.2.2 Prevalencia de mutaciones de resistencia en individuos con tratamiento	36
3.13.3 Análisis de resistencia	36
3.13.3.1 Pruebas fenotípicas	37
3.13.3.2 Pruebas genotípicas	37
3.13.4 Aplicación en la clínica	38
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	39
5. HIPÓTESIS	40
6. OBJETIVOS	41
6.1 General	41
6.2 Específicos	41
7. MATERIALES Y MÉTODOS	42
7.1 Diseño del estudio	42
7.2 Lugar y periodo de estudio	42
7.3 Universo de estudio	42
7.4 Tamaño de la muestra	43
7.5 Criterios de inclusión	44
7.6 Criterios de exclusión	45
7.7 Metodología	45
7.7.1 Obtención de la muestra	45
7.7.2 Extracción de ARN	46

7.7.3 Prueba de resistencia genotípica	46
7.8 Análisis estadísticos	47
8. RESULTADOS	48
8.1 Resultados generales	48
8.2 Regiones Centro y Occidente	49
8.3 Individuos con tratamiento	50
8.4 Individuos naïve al tratamiento	57
9. DISCUSIÓN	62
10. CONCLUSIONES	68
11. PERSPECTIVAS	69
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
13. ABREVIATURAS	84
14. GLOSARIO	86
15. ANEXOS	89

1. RESUMEN

1.RESUMEN

Introducción. El tratamiento antirretroviral ha incrementado el promedio y calidad de vida a millones de personas que viven con VIH/SIDA alrededor del mundo, sin embargo el mayor obstáculo para el éxito a largo plazo del tratamiento es la resistencia a los fármacos.

Objetivo. Determinar la frecuencia de los codones de resistencia a los antirretrovirales Inhibidores de la Transcriptasa Reversa (IT) e Inhibidores de la Proteasa (IP) en una muestra de pacientes con y sin tratamiento antirretroviral de las regiones Centro y Occidente de México.

Metodología. Se extrajo ARN viral de 218 individuos VIH+, se amplificó el gen pol codones 1 a 244 del genoma viral, el producto fue secuenciado, alineado y analizado para determinar las mutaciones de resistencia. Se realizaron las pruebas estadísticas de X^2 , U de Mann-Whitney y prueba de Spearman para analizar las variables.

Resultados. Del total, se muestrearon 118 (54%) individuos con tratamiento y 100 (46%) *naïve* al tratamiento. Para el grupo con tratamiento, 102 (87.4%) presentaron resistencia a por lo menos un antirretroviral; 47 (39.5%) presentaron resistencia tanto a los IP como a los IT; 55 (46.2%) tuvieron resistencia solo a los IT, mientras que 2 (1.7%) presentaron resistencia exclusiva a los IP. Del grupo *naïve*, 18 (18%) presentaron resistencia para al menos un antirretroviral; 10 (10%) tanto a los IP como a los IT; 8 (8%) fueron exclusivamente resistentes a los IT; 0% presentó resistencia única a los IP.

Conclusión. Las prevalencia de resistencia a los antirretrovirales fue más alta que la esperada para los dos grupos de individuos.

1. ABSTRACT

Introduction. Antiretroviral treatment has increased the average and quality of life for millions of people living with HIV / AIDS around the world, but the biggest obstacle to the long-term success of the treatment is the emergence of drug resistance.

Aim. To determine the frequency of resistance codons to antiretroviral Reverse Transcriptase Inhibitors (TI) and Protease Inhibitors (PI) in a sample of patients with and without antiretroviral treatment in the central and western regions of Mexico.

Methodology. Viral RNA was extracted from 218 HIV + individuals, the codons 1 to 244 of the pol gene were amplified, the product was sequenced, aligned and analyzed to determine the resistance mutations. Statistical tests of the χ^2 , the Mann-Whitney U and the Spearman test were performed to analyze the variables.

Results. Overall, 118 (54%) individuals with treatment were sampled as well as 100 (46%) *naïve* to treatment. Out of the former group, 102 (87.4%) showed resistance to at least one antiretroviral, 47 (39.5%) showed resistance to both the PI and the TI; 55 (46.2%) were resistant only to the TI, while 2 (1.7%) showed resistance only to the PI. With regard to the latter group, 18 (18%) showed resistance to at least one antiretroviral; 10 (10%) showed resistance to both the PI and the TI; 8 (8%) were resistant only to the TI and none showed resistance only to the PI.

Conclusion. The prevalence of resistance to antiretroviral drugs in individuals, with and without treatment, was higher than expected.

2. INTRODUCCIÓN

2. INTRODUCCIÓN

La infección por VIH ha alcanzado proporciones pandémicas, actualmente a nivel mundial, más de 33 millones de personas viven con VIH/SIDA; África es el continente más afectado con el 72% de los casos.

Los esfuerzos por brindar Acceso: universal al tratamiento antirretroviral han logrado un profundo impacto en la morbilidad y mortalidad relacionadas con el VIH/SIDA. Como resultado del aumento en el número de personas con Acceso: a los antirretrovirales que en 2005 alcanzó los 1.3 millones; la prevalencia de mutaciones que confieren resistencia a éstos fármacos se incrementó.

El desarrollo de resistencia en el virus de quienes se encuentran bajo tratamiento es resultado, entre otros, de la presión selectiva de los fármacos, la genética del virus y del individuo, el manejo médico y la adherencia al tratamiento.

En los individuos que no han sido sometidos al tratamiento antirretroviral se presenta una resistencia transmitida a los fármacos, resultado de la infección con cepas virales previamente resistentes.

En cada región los patrones de resistencia son diferentes, debido a los variados esquemas terapéuticos, el tiempo de uso de los mismos, la accesibilidad y disponibilidad de los fármacos.

Para el éxito a largo plazo del tratamiento farmacológico contra el VIH/SIDA la resistencia a los ARV es el mayor obstáculo, de ahí, la importancia de describir los patrones de mutaciones de resistencia a los ARV en nuestra región.

3. ANTECEDENTES

3. ANTECEDENTES

3.1 EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA

3.1.1 Historia Natural

El Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) es el agente patógeno causal del Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). El primer reporte de este síndrome fue emitido el 5 de junio de 1981, por el Centro para la prevención y control de enfermedades en Georgia, Estados Unidos ¹.

Investigadores clínicos de Nueva York y California observaron en hombres homosexuales jóvenes, un inusual conjunto de enfermedades poco frecuentes, en particular el Sarcoma de Kaposí (SK) y la neumonía por *Pneumocystis carinii*, así como casos de linfadenopatías inexplicables y persistentes. Las pruebas sanguíneas realizadas a estos pacientes mostraron un importante decremento en el número de Linfocitos T CD4+ ². Se observó también que el síndrome era común a distintos grupos: hombres que mantenían relaciones sexuales con otros hombres, usuarios de drogas intravenosas masculinos y femeninos; hemofílicos y receptores de transfusiones sanguíneas o productos derivados de la sangre; mujeres cuyas parejas sexuales eran hombres bisexuales; quienes recibían productos derivados de la sangre y niños nacidos de madres con SIDA o con historia de drogadicción intravenosa.

El hecho de que el conjunto de casos SIDA se presentara en diversos grupos de riesgo sólo podía explicarse si éste era originado por un agente infeccioso transmisible.

En mayo de 1983, el equipo de Luc Montagnier publicó el primer informe que suministraba evidencias experimentales de una asociación entre un retrovirus y el SIDA³. Su equipo aisló un retrovirus no reconocido previamente, el cual fue denominado Virus Asociado a Linfadenopatías (LAV). A la par, el Dr. Roberto Gallo confirmó los hallazgos del grupo de investigación de Montagnier⁴.

En 1987 el Comité de Taxonomía Viral rebautizó al virus con el nombre de Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) y lo clasificó en el género de los Lentivirus⁵.

3.1.2 Origen y evolución del VIH

Los virus más cercanamente relacionados con el VIH infectan a otros primates y se denominan Virus de la Inmunodeficiencia en Simios (VIS). Más de 20 especies de primates del África Sub-sahariana son portadores de VIS y presentan altas tasas de infección especie-específicas, por lo que se sabe que los primates africanos han estado infectados durante mucho tiempo. Por el contrario, la infección en humanos por el VIH parece ser un fenómeno de principios del siglo pasado⁶.

La mayor diversidad de cepas de VIH así como los índices más altos de infección se encuentran en el África subsahariana, esto sugiere que el evento de infección cruzada de primates no-humanos a humanos ocurrió en el continente africano⁷.

Los análisis filogenéticos indican que el VIH fue transmitido al humano en varios eventos de contagio. De acuerdo a estos análisis el VIH ha sido clasificado en dos grupos: VIH tipo-1 y VIH tipo-2. El VIH-1 fue transmitido al humano por la especie *Pan troglodytes* en tres eventos filogenéticos de infección. El VIH-2, se piensa que fue transmitido por la especie *Cercocebus atys* por al menos siete líneas filogenéticas. El VIH-1 y el VIH-2 se ubican en dos linajes diferentes de los VIS y por lo tanto tienen orígenes diferentes⁷.

La primera muestra sanguínea con evidencia de infección por VIH, identificada por serología y confirmada por la amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y secuenciación, data del año 1959, y perteneció a un individuo de la República Democrática del Congo⁸. Esta muestra se denomina ZR59 y fue utilizada como referencia en los análisis de "Reloj Molecular"⁷. Los resultados de este análisis permitieron estimar la fecha entre 1915 y 1945 del último ancestro común del VIH-1 que comparte el grupo M. Se estima también la presencia del ancestro común del VIH-1 y VIS aislado de *P. troglodytes* entre los años 1591 y 1761^{9,10}.

3.1.3 Hipótesis sobre la transmisión del VIH

Existen tres hipótesis sobre el evento y tiempo de transmisión del VIH-1 de *Pan troglodytes* al humano¹¹ (Figura 1):

1. Transmisión temprana. Propone que el virus fue transmitido a los humanos a finales del siglo XIX o principios del siglo XX a través de la caza e ingesta de carne de chimpancés. El virus permaneció aislado

en un grupo pequeño de humanos hasta cerca de 1930, a partir de ese año comenzó su propagación y diversificación en otras poblaciones humanas en África y eventualmente al resto del mundo.

2. Transmisión por causas epidémicas. Según esta hipótesis, el virus fue transmitido al humano alrededor de 1930 e inmediatamente comenzó su diversificación y expansión geográfica.
3. Transmisión paralela tardía. Hipótesis que sugiere que diversas cepas de VIS fueron transmitidas al humano entre los años de 1940 y 1950 a través de la vacuna de polio virus contaminada con VIS debido a su cultivo en células de riñón del chimpancé.

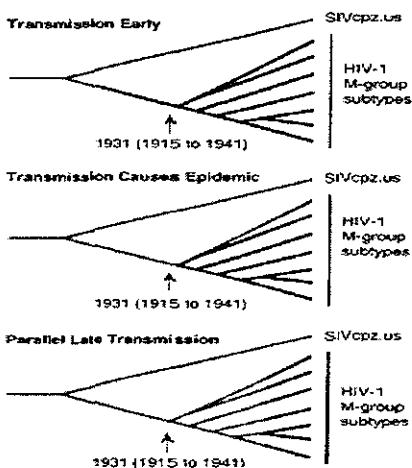


Figura 1. Hipótesis sobre el origen del VIH-1 grupo M a partir de la cepa SIVcpz. Las líneas grises indican la presencia de las poblaciones virales SIVcpz en chimpancé, las líneas negras indican la presencia de VIH1 grupo M en humanos. Korber estableció el ancestro común del VIH 1 grupo M a principios de 1930s. Las tres diferentes hipótesis de la trasmisión del virus de la inmunodeficiencia en chimpancé a humanos, Transmisión temprana, Transmisión por causas epidémicas y Transmisión paralela tardía son consistentes con esta fecha¹.

Los árboles filogenéticos del VIH-1 indican que la propagación del virus fue inicialmente muy lenta. La explosión de la infección en los años 1950s y 1960s, coincide con el término del gobierno colonial en África, varias guerras civiles, la introducción de los programas de vacunación (con la reutilización de las agujas), el crecimiento de las ciudades africanas, la revolución sexual y el incremento de viajeros desde y hacia África ¹¹.

Existe una coincidencia con el periodo de los años 1970s en que los síntomas del SIDA comenzaron a ser predominantes en individuos infectados en Estados Unidos y Europa y el periodo aproximado de 10 años necesarios desde la infección con VIH hasta la progresión al SIDA ^{9,11}.

3.2 CLASIFICACIÓN

El VIH muestra una alta variabilidad genética, esta variabilidad ha permitido clasificar al virus en dos grupos: VIH-1 y VIH-2, los cuales difieren aproximadamente en el 50% de su secuencia, origen, patogénesis y patrones de distribución ¹². El VIH tipo-1 se distribuye mundialmente y es responsable por la infección en los cinco continentes. El VIH tipo-2 se encuentra restringido al Oeste del continente africano ¹³ (Figura 2).

3.2.1 VIH-1

El VIH-1 muestra diferencias filogenéticas que le permiten clasificarlo en grupos o linajes, sub-subtipos, Formas Recombinantes Circulantes (FRC),

Formas Recombinantes Únicas (FRU) y Formas recombinantes Intersubtipo (FRI), que son similares entre sí en un 70%-90% y que debido a tres eventos independientes de contagio constituyen los grupos: M (main), O (outlier) y N (new o non-M, non-O) ¹⁴.

Todas las cepas del VIH-1 descritas en los años 1980s y la mayoría de las descritas actualmente en todo el mundo, pertenecen al grupo M el cual se divide en 9 subtipos: A, B, C D, F, G, H, J y K. Los subtipos A y F se clasifican en sub-subtipos: A1 y A2, F1 y F2. Las FRC son producto de la recombinación de al menos 2 subtipos diferentes, estas formas se identificaron a partir del análisis filogenético de secuencias completas del VIH-1 ^{13, 15, 16}. Están registradas 16 FCR, las dos más prevalentes son FCR01_AE y FCR02_AG, que se encuentran con mayor frecuencia en el sureste de Asia y occidente de África respectivamente ^{14,17}. El grupo O parece ser endémico de Camerún y países vecinos en el centro-occidente de África, y representa una minoría de las cepas del VIH-1. El grupo N se encuentra aislado en Camerún ¹³.

3.2.2 VIH-2

El VIH-2 se clasifica en seis grupos: A, B, C, D, F y G; cada grupo del VIH-2 representa al menos un evento separado de transmisión de *C. atys* al humano ^{14,17}.

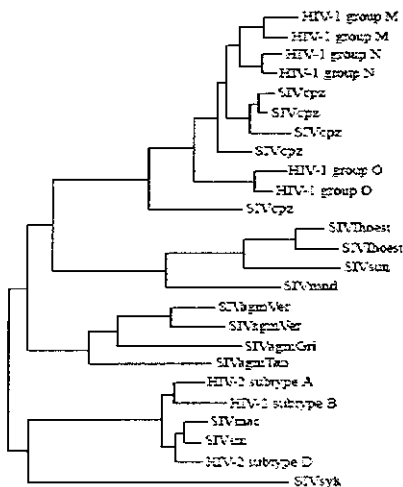


Figura 2. Relaciones filogenéticas entre cepas representativas de VIS obtenidas mediante el análisis de máxima similitud de la secuencia proteica de los genes pol. Están indicados para el VIH-1 el grupo de origen y para el VIH-2 el subtipo. Las cepas de VIS (SIV por sus siglas en inglés) tiene el sufijo que se refiere a la especie de origen: cpz, chimpancé; lhoest, mono I Hoest; sun, mono sun-tailed; mnd, mandril; agm, mono verde africano; Ver, verver; Gri, grivet; Tan, tantalus; mac, Macaco; sm, sooty mangabey *Lophosebus papionini*; syk, mono de Syke ¹¹.

3.2.3 Diversidad y distribución del VIH

La prevalencia de los subtipos así como los patrones de distribución del VIH son disímiles en las diferentes regiones del mundo. El subtipo más prevalente es el C, responsable del 52% de las infecciones en el mundo, seguido del subtipo A, causando el 12%; el subtipo B con 10%, la FRC02_AG con 6.7%, el subtipo G con 5%; las FRU responsables del 4.2% de las infecciones, el subtipo D con 3.6%, la FRC01_AE con el 3.1% y finalmente, el 3.4% restante está distribuido entre los subtipos E, F, H, J, A2, A3, y las FRC 03_AB, 06_cpx, 12_bf, 07 ó 08_BC, y VIH-2 ¹² (Figura 3).

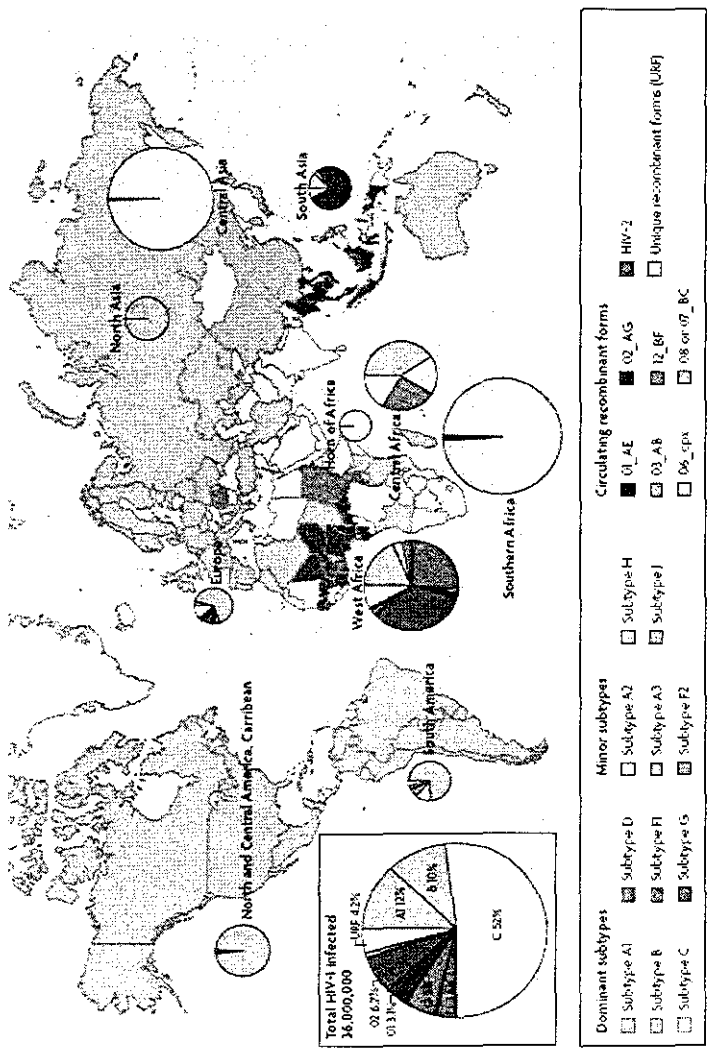


Figura 3. Diversidad y distribución del VIH a nivel mundial.

3.3 EPIDEMIOLOGÍA

Según el reporte del año 2008 del Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA (ONUSIDA) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), el número de personas infectadas por el VIH a nivel mundial es de 33.2 millones¹⁸, se presentaron 2.7 millones de nuevas infecciones y 2.1 millones de personas murieron a causa de la infección por VIH¹⁹.

El 94.4% de las personas infectadas son adultos y 50% son mujeres. Las vías de transmisión son: la sexual, donde destaca en primer término la preferencia heterosexual, seguida de la homosexual masculina; el uso de drogas intravenosas que representa entre el 8% y 10% de los individuos infectados; la transmisión vertical que en los últimos años y debido al tratamiento ha disminuido de 5% a 10% y finalmente, la infección por transfusión sanguínea que representa entre el 3 y 5% de los casos en el mundo¹⁸.

En México, hasta marzo del 2008 el CONASIDA reportó un total de 184 624 casos acumulados de VIH y estimó un número de 195 000 personas infectadas con el virus. Del total de portadores de VIH en el país, el 97.6% son mayores de 15 años, y el 21.5% son mujeres. En la población VIH seropositiva mayor de 15 años, el 95.1% adquirió la infección por contacto sexual; de éstos, el 48.7% por contacto heterosexual, mientras que el 46.4% por contacto homosexual o bisexual principalmente masculino. El 4.6% adquirió la infección por transfusión sanguínea y el 0.3% por el uso de drogas inyectables. La prevalencia de anticuerpos anti-VIH entre los

principales grupos de riesgo se distribuye de la siguiente manera: hombres que tienen sexo con hombres 12.6%, trabajadores sexuales 6.1% y usuarios de drogas inyectables 1.2%.

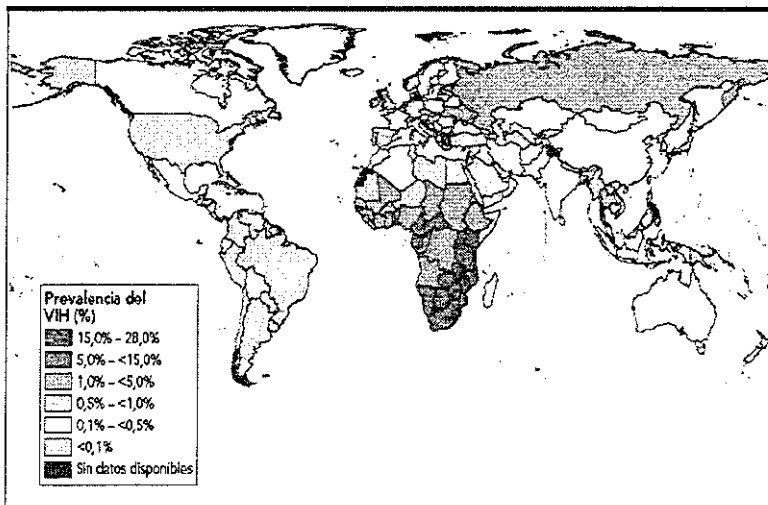


Figura 4. Una visión global de la infección por VIH en el 2007 ^{IV}.

Hasta Diciembre de 2007, se reportó el fallecimiento del 64.3 % de las personas que han vivido desde el inicio de la epidemia con VIH/SIDA en nuestro país²⁰. Después del Distrito Federal, Estado de México y Veracruz, Jalisco ocupa el cuarto lugar en casos acumulados de la infección, concentrando el 8.4% del total en el país con una cifra que asciende a 9 990 infecciones por VIH/SIDA²⁰.

3.4 ESTRUCTURA DEL VIH

El VIH se caracteriza por su tropismo celular hacia los linfocitos CD4+. Se clasifica dentro del género *Lentivirus* de la familia Retroviridae, la cual es un grupo de virus de ARN de cadena sencilla cuyas relaciones genéticas se establecen a partir de la composición de los aminoácidos de la enzima transcriptasa reversa y de la secuenciación de los genes estructurales *gag* y *env*. El género de los virus lentos hace alusión a los largos periodos de incubación de este patógeno intracelular⁵.

Morfológicamente el VIH es una partícula esférica que mide de 100 a 120 nm, con estructuras que se ubican en tres capas: la interna o nucleoide, que contiene el genoma y enzimas virales, una cápside icosaédrica y una capa lipídica externa o envoltura derivada de la célula infectada²¹:

1. Capa interna o nucleoide. Contiene dos cadenas sencillas de RNA viral conformadas de manera lineal, idénticas y de polaridad positiva. Alberga también a la nucleoproteína p7 y las enzimas Proteasa (PR), Integrasa (IN) y Transcriptasa Reversa (TR).
2. Cápside de estructura icosaédrica: formada por la proteína p24.
3. Capa externa o envoltura: formada por una doble membrana lipídica, donde se insertan 72 complejos glucoproteicos, particularmente las glucoproteínas gp120 (de superficie) y gp41 (transmembranal) y los antígenos de histocompatibilidad clase I y clase II que proceden de la célula hospedera. Debajo de la membrana lipídica, se localiza la proteína matriz p17 que se une a la gp41 (Figura 5)

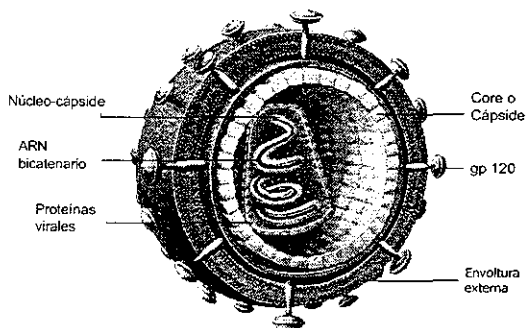


Figura 5. Estructura del VIH V.

3.5 GENOMA DEL VIH

El genoma del VIH-1 consta de 9.8 kb y el del VIH-2 de 10.0 kb, integrado en dos copias de Ácido Ribonucleico de cadena sencilla (ssARN) en forma lineal, en el sentido 5'→3' flanqueado por dos marcos de repetición terminales (LRT), los cuales regulan la integración viral en el genoma del hospedero, la expresión génica y la replicación viral. Está compuesto por nueve genes: tres estructurales, dos regulatorios y cuatro accesorios ²².

Los genes estructurales son *gag*, *pol* y *env*. El gen *gag* codifica para las proteínas de la cápside central (p24, p17, p9 y p7), *pol* codifica para las enzimas virales transcriptasa reversa (p66), integrasa (p31) y proteasa (p15), y *env* da origen a las glicoproteínas de envoltura gp41 y gp120 ²².

Los genes regulatorios *tat* y *rev* codifican proteínas que no son ensambladas dentro del virus, pero son esenciales en la replicación viral dentro de la célula.

Los cuatro genes accesorios son *vif*, *vpr*, *rev*, *vpu*. *Vif* codifica una proteína que al parecer es necesaria para la infección al facilitar el desensamblaje del virión permitiendo la transcripción inversa. Las funciones de *vpr* incluyen dirigir el complejo de pre-integración del virus al núcleo, detener la proliferación celular en la fase G2, la transactivación de genes celulares y la inducción de la diferenciación celular. El gen *rev* codifica para una proteína que exporta los fragmentos de ARNm del núcleo al citoplasma para ser transcritos. *Vpu* solo se encuentra en el VIH-1, tiene dos funciones: degradar el CD4 en el retículo endoplásmico y aumentar la liberación de los virus desde la membrana celular. En el VIH-2 el gen *vpu* se conoce como *vpx* y tiene funciones muy similares al gen *vpr* del VIH-1 ²³.

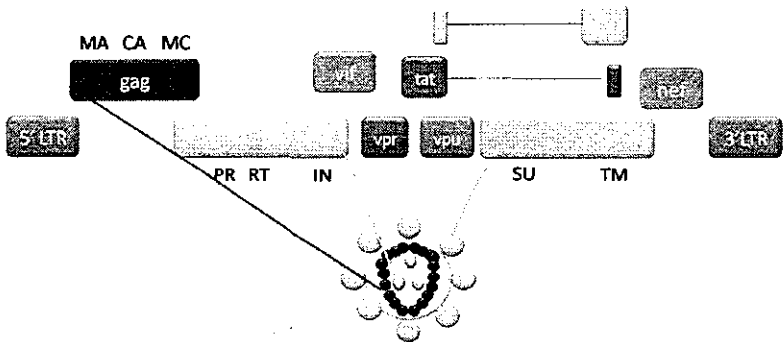


Figura 6. Genoma del VIH. Se observan los genes del VIH-1 y las principales proteínas para las que codifican, así como su localización en la estructura del virus. *Gag* codifica para las proteínas estructurales MA (p17) proteína de anclaje de membrana, CA (p24) proteína estructural de cápside y MC (p7) proteína de núcleo-cápside. *Pol* codifica para las enzimas PR (p10) proteasa, RT (p66) transcriptasa reversa e IN (p32) integrasa. *Env* para las glucoproteínas de envoltura SU (gp120) receptor de superficie, TM (gp 41) proteína transmembranal ^{vi}.

3.6 PROTEONOMA DEL VIH

Las proteínas virales son esenciales durante el ciclo de infección del virus. Actúan como proteínas estructurales dando forma a la partícula viral o como enzimas que catalizan los pasos cruciales de la replicación viral (Cuadro 1).

Cuadro 1. Principales proteínas víricas y su función durante el ciclo de infección ²³		
Proteína	Tamaño (kDa)	Función
Gag	p24	Proteína estructural de la cápside
	p17	Proteína miristilada de anclaje a la membrana
	p6	Une las proteínas Vpr
	p7	Proteína de núcleo-cápside que ayuda en la transcripción reversa
Transcriptasa reversa (TR)	p66	Transcripción reversa
Proteasa (PR)	p10	Procesamiento post-traducciona l de las proteínas virales
Integrasa (IN)	p32	Integración del ADNc viral
Env	gp120	Proteína de superficie
	gp41	Proteína transmembrana l
	p14	Transactivación
Tat	p19	Regulación de la expresión del ARNm viral
Nef	p27	Proteína pleiotrópica, aumenta o disminuye la replicación viral
Vif	p23	Aumenta la infectividad viral
Vpr	p15	Ayuda en la replicación viral
Vpu	p16	Ayuda en la liberación del virus
Vpx	p15	Homólogo a Vpr. No se encuentra en VIH-1 pero sí en VIH-2 y SIV
Tev	p26	Proteína tripartita tat-env-rev

3.7 CICLO DE INFECCIÓN

Las principales células susceptibles a la infección por el VIH son los linfocitos T cooperadores, los macrófagos, las células de Langerhans, las células dendríticas foliculares, megacariocitos y células tímicas que expresan el receptor CD4 ²³. Para que el VIH pueda entrar a la célula y replicarse debe llevar a cabo una serie de pasos que son denominados ciclo de infección.

3.7.1 Adhesión y fusión

El ciclo de infección del VIH comienza cuando la partícula viral se une por medio de la glucoproteína de envoltura gp120 al receptor de superficie celular CD4. La interacción gp120/CD4 provoca cambios conformacionales tanto en el receptor CD4 como en la glucoproteína gp120 lo que posibilita el reclutamiento de los co-receptores de quimocinas CCR5 y CXCR4 ²⁴. Una segunda interacción, entre gp120 y uno de estos co-receptores, provoca un nuevo cambio conformacional, lo que finalmente causa la disociación de la gp120 del receptor CD4 y la preparación de gp41 para la fusión ²⁵. La entrada de los viriones a la célula es mediada por el péptido de fusión de gp41 en la membrana celular, liberando la cápside central del virus al citoplasma ²⁶.

3.7.2 Integración

Una vez que se han fusionado la membrana viral y celular, la cápside comienza a desarticularse, formando el *Complejo de transcripción reversa* y *Complejo de pre-integración*. El ARN viral es transcrito por la transcriptasa reversa en una molécula de ADN de doble cadena. Una vez sintetizado el ADN proviral éste se une al *Complejo de preintegración* y se desplaza al núcleo con la ayuda de vpr; allí la integrasa corta el ADN del huésped e integra el provirus en forma lineal al genoma de la célula infectada²⁷. Después de la integración del genoma viral, la célula infectada puede desarrollar una infección latente o una persistente.

3.7.3 Latencia

Una vez que se ha integrado el provirus al genoma de la célula, este puede permanecer latente, replicarse de forma controlada o sufrir una replicación masiva que resulta en un efecto citopático. En la mayoría de los linfocitos el provirus se encuentra en estado latente. El paso de la fase de latencia a la de reactivación depende de factores celulares de transcripción, como la proteína NF-κB, que sólo se induce en procesos de activación inmunológica. Una vez activado, el estado de latencia se pierde rápidamente y el virus se manifiesta agresivo²⁸.

3.7.4 Transcripción

En su regulación se involucran tanto proteínas celulares, como proteínas reguladoras codificadas por el virus, ya que en esta etapa el provirus se comporta como un gen. Existen dos momentos de la expresión genética: la temprana, que involucra la transcripción de los genes reguladores *nef*, *tat* y *rev*²⁹ y la tardía en la que se transcriben los genes estructurales y enzimáticos codificados por *gag*, *pol* y *env*; así como los genes accesorios *vif*, *vpr* y *vpu*. El RNAm del VIH se sintetiza como un único transcrito, que se transporta al citoplasma, donde es procesado en ARN de distintos tamaños³⁰.

3.7.5 Maduración

Las proteínas virales son procesadas antes de ensamblarse en partículas virales maduras. Los productos de *env*, gp120 y gp41 son transportados a la

membrana celular gracias a Vpu ³¹. Las proteínas de la cápside son ensambladas en el citoplasma de la célula huésped y llevadas a la superficie de la célula para su liberación ³². Finalmente, una vez que han madurado los virones y se han ensamblado correctamente las proteínas virales, el nucleóide se desplaza a la membrana celular donde se recubre de la membrana lipídica y de glucoproteínas de superficie adheridas a ella y es liberado por gemación. Las partículas virales salen de la célula y sufren un proceso de maduración extracelular mediado por la proteasa ³³.

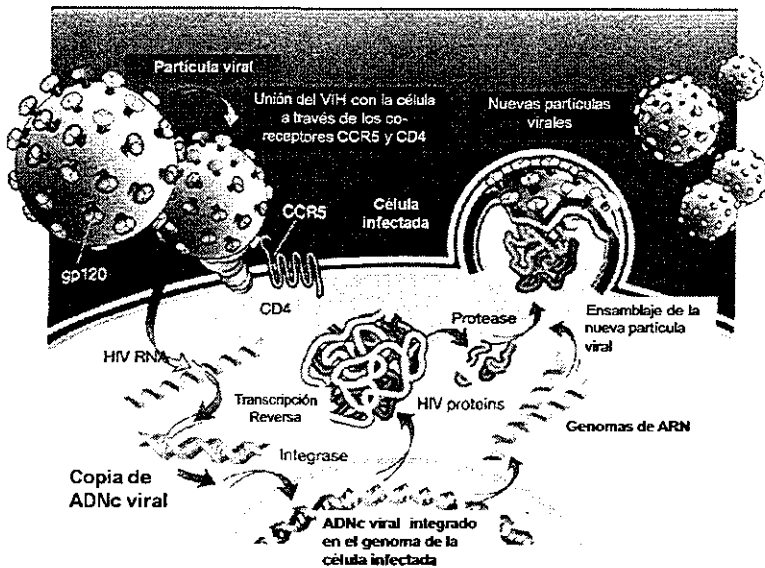


Figura 7. Ciclo de replicación del VIH ^{VI}.

3.8 RESPUESTA INMUNE

La respuesta inmune se produce cuando el virus entra en contacto con tres líneas celulares: los linfocitos T, los monocitos/macrófagos y las células dendríticas. Su tropismo celular se dirige hacia el receptor CD4 de los Linfocitos T cooperadores que a través de interleucinas y citocinas activan a los linfocitos B para la producción de anticuerpos específicos y a las células presentadoras de antígeno MHC clase II. La actividad de los macrófagos se estimula mediante el interferón gamma; la actividad citotóxica de los linfocitos TCD8+ y células asesinas naturales (NK) mediante la interleucina 12. Las principales alteraciones de la inmunidad celular se manifiestan en el incremento de la reacción de hipersensibilidad de la actividad citotóxica del linfocito TCD8+ y la disminución en el número de los linfocitos T CD4+. En la actividad humoral las alteraciones presentadas son la activación policlonal del linfocito B, la formación de auto-anticuerpos, disminución en la producción de inmunoglobulinas, disfunción de los neutrófilos, inmunosupresión, anergia, desarrollo de infecciones oportunistas y neoplasias ³⁴.

3.9 PROPIEDADES FÍSICO-BIOLÓGICAS

De sus propiedades físico-biológicas se sabe que el virus no es capaz de replicarse si se mantiene más de dos horas fuera de una estructura celular; se inactiva mediante el calor a 56°C durante 10 a 20 minutos y con el uso de desinfectantes como el glutaraldehído, hipoclorito, alcohol, etanol, peróxido de hidrógeno y formaldehído ³⁵.

3.10 MECANISMOS DE TRANSMISIÓN

Los mecanismos de transmisión tanto para el VIH -1 como para el VIH-2 son el contacto sexual, sanguíneo y perinatal. En el caso del VIH -2 su virulencia es menor y su periodo de latencia más prolongado ³⁶. Recientemente se ha descrito el riesgo relativo para adquirir la infección por VIH en función de la práctica sexual sin protección, como a continuación se describe (Cuadro 2)³⁷:

Cuadro 2. Prácticas sexuales y el riesgo relativo de adquirir la infección con VIH	
Preferencia	Riesgo relativo (%)
Sexo anal receptivo	100
Sexo vaginal receptivo	20
Sexo anal insertivo	13
Sexo vaginal insertivo	10
Felatio receptivo	2
Felatio insertivo	1

3.11 SINDROME DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA ADQUIRIDA

La progresión de la infección con VIH comprende tres fases. La fase aguda, que va desde el momento de la infección hasta que se produce la seroconversión y dura aproximadamente de tres a ocho semanas; la fase asintomática, que dura en promedio de 8 años; y una fase sintomática que culmina con el diagnóstico de SIDA (Figura 4). Se diagnostica SIDA cuando el conteo de linfocitos CD4+ del paciente se encuentra por debajo de 200 células/mm³. Aproximadamente el 10% de las personas infectadas por el VIH-1 progresan a SIDA en los dos o tres primeros años de la infección (progresores rápidos). Entre un 5% y un 10% permanecerán asintomáticos hasta los 10 a 15 años de la infección, y mantendrán el número de linfocitos

CD4+ por encima de $500/\text{mm}^3$ (no progresores a largo plazo). El resto de pacientes sin tratamiento, en promedio, desarrollarán SIDA a partir de los diez años de la infección ³⁸ (Figura 8).

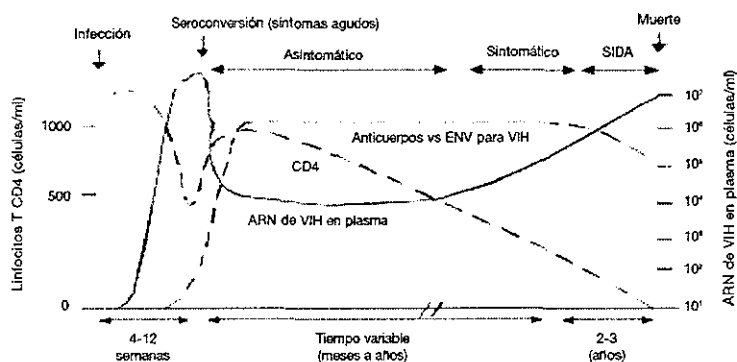


Figura 8. Curso típico de la infección de VIH ^{VIII}.

La OMS y la CDC han establecido las categorías clínicas de la progresión de la infección con VIH (Cuadro 3). Estas categorías ayudan al médico tratante a determinar el momento en que el paciente debe iniciar una terapia ARV.

Cuadro 3. Categorías clínicas para adolescentes y adultos según la Organización Panamericana de la Salud ³⁸.

Categoría	Linfocitos T CD4+ (cél/mL)	Síntomas
A1	>500	
A2	200-499	Personas con infección primaria y asintomática, acompañada de linfadenopatías persistentes y generalizadas.
A3	<199	

B1	>500	Pacientes que presentan o hayan presentado síntomas que no pertenecen a la categoría C, pero que están relacionados con la infección de VIH como: angiomas bacilar, candidiasis vulvo-vaginal, o candidiasis oral resistente al tratamiento, displasia de cérvix uterino o carcinoma de cérvix no invasivo, enfermedad pélvica inflamatoria (EPI), fiebre menor a 38,5 °C o diarrea, de más de un mes de duración, herpes zóster (más de un episodio, o afección de más de un dermatoma), leucoplasia oral vellosa, neuropatía periférica y púrpura trombocitopénica idiopática (PTI).	
B2	200-499		
B3	<199		
C1	>500	Pacientes que presentan o hayan presentado algunas complicaciones incluidas en la definición de sida de 1987 de la OMS	Enfermedades Asociadas
C2	200-499		
C3	<199		
		Infecciones Oportunistas	<p>Infecciones bacterianas: Septicemia por <i>Salmonella</i>. Tuberculosis. Infecciones por micobacterias atípicas. Infecciones víricas: Infección por citomegalovirus y virus del herpes simple (VHS tipos 1 y 2), Infecciones fúngicas: Aspergilosis. Candidiasis. Coccidioidomicosis, extrapulmonar o diseminada. Criptococcosis extrapulmonar. Histoplasmosis, diseminada o extrapulmonar. Infecciones por protozoos: Neumonía por <i>Pneumocystis jirovecii</i>. Toxoplasmosis neurológica Criptosporidiosis intestinal crónica. Isosponias intestinal crónica.</p>
		Procesos cronicados	Bronquitis y neumonía
		Procesos asociados directamente con el VIH	Demencia relacionada con el VIH (encefalopatía por VIH). Leucoencefalopatía multifocal progresiva. Síndrome de desgaste.
		Procesos tumorales:	Sarcoma de Kaposi. Linfoma de Burkitt. Otros linfomas no-Hogdkin, especialmente linfoma inmunoblástico, linfoma cerebral primario o linfoma de células B. Carcinoma invasivo de cérvix

3.12 TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL

Desde la introducción del Zidovudine (AZT) en 1987 como primer fármaco antirretroviral, el desarrollo de medicamentos para combatir la infección con VIH ha sido continuo y progresivo. El blanco principal de estos fármacos son los pasos críticos del ciclo viral, los cuales son bloqueados mediante la acción de los ARV sobre las enzimas que permiten la replicación del VIH.

El uso de la terapia antirretroviral a finales de los años 80s redujo sustancialmente la morbilidad y mortalidad asociadas al VIH como lo demostró el estudio de Euro SIDA ³⁹. A partir de la introducción de la terapia antirretroviral altamente activa (TARAA) en el año de 1996, la combinación de al menos dos ARVs, permitió el incremento de la barrera genética a la resistencia, lo que ha hecho posible reducir la carga viral por debajo de los niveles detectables ^{40,41}.

Hoy en día, para el tratamiento de la infección con VIH se cuenta con al menos 22 fármacos y formulaciones diferentes, lo que da lugar a una amplia gama de posibles esquemas de TAARA.

De acuerdo al blanco de bloqueo, los fármacos antirretrovirales se han clasificado de la siguiente manera: Inhibidores de la Proteasa (IP), Inhibidores de la Transcriptasa Reversa Análogos de los Nucleósidos (ITRAN), Inhibidores de la Transcriptasa Reversa No Análogos de los Nucleósidos (ITRANN), Inhibidores de fusión (IF) , Inhibidores de Entrada (IE) e Inhibidores de la Integrasa (IN) .

3.12.1 Inhibidores de la Proteasa (IP)

Los IP son fármacos que presentan una estructura peptídica análoga al sustrato natural -poliproteína vírica- con el que compiten por el centro catalítico de la proteasa, impidiendo la escisión de las proteínas *gag* y *gag-pol*, originando la formación de viriones inmaduros no infecciosos. Según su estructura se agrupan en: compuestos miméticos de estado transicional: Saquinavir (SQV), Indinavir (IDV) y Nelfinavir (NFV), o pseudosimétricos o simétricos como Ritonavir (RTV). Los IP se caracterizan por ser muy selectivos, poco tóxicos y muy potentes ⁴².

3.12.2 Inhibidores de la Transcriptasa Reversa Análogos de los Nucleósidos (ITRAN)

Los ITRAN se asemejan estructuralmente a los dNTPs trifosfatados, pero carecen del grupo 3'OH. Los ITRAN inhiben el proceso de transcripción a través de la inhibición competitiva de los dNTPs lo que provoca la terminación prematura de la cadena de ADN por la modificación del grupo 3' OH, y evita la formación del enlace fosfodiéster entre la elongación de la cadena de ADN y el nuevo nucleósido trifosfatado 5' ⁴³.

3.12.3 Inhibidores de la Transcriptasa Reversa No-análogos de los Nucleósidos (ITRANN)

Los ITRANN se unen de manera no competitiva a la TR para inducir un cambio conformacional en el sitio activo de la enzima. Esta unión inhibe la función de la TR por un mecanismo alostérico mediante el cual se desplaza

un bloque la asparagina respecto al sitio de unión de la polimerasa ⁴⁴.

13.12.4 Inhibidores de Fusión (IF).

Estos fármacos bloquean la fusión de la partícula viral con la membrana celular impidiendo de esta manera la entrada del virión al citoplasma de la célula blanco. Los IF se adhieren a las proteínas de superficie de las células del sistema inmune o a las proteínas de superficie del VIH en la región HR1 de la glucoproteína gp41. Fuzeon (T-20) es el único medicamento de este tipo aprobado por la FDA en la actualidad ^{45,46}.

3.12.5 Inhibidores de Entrada (IE)

Los IE actúan sobre las proteínas de superficie de los linfocitos, como la proteína CD4 ó los receptores CCR5 ó CXCR4 ⁴⁷. Maraviroc, hasta la fecha único IE aprobado por la FDA, bloquea el correceptor de quimiocinas CCR5 unido por gp 120 ^{48,49}.

3.12.6 Inhibidores de la Integrasa (IN)

Los IN son fármacos de última generación cuyo blanco es la enzima Integrasa. A través de la inactivación de esta proteína se logra evitar la integración del ADNc viral al genoma de la célula ⁵⁰. El Raltegravir, aprobado por la FDA en Octubre de 2007, es un diketo-ácido con potente actividad inhibitoria de la transferencia de la hebra de ADNc en cepas virales con genotipo silvestre o mutante ^{51,52}.

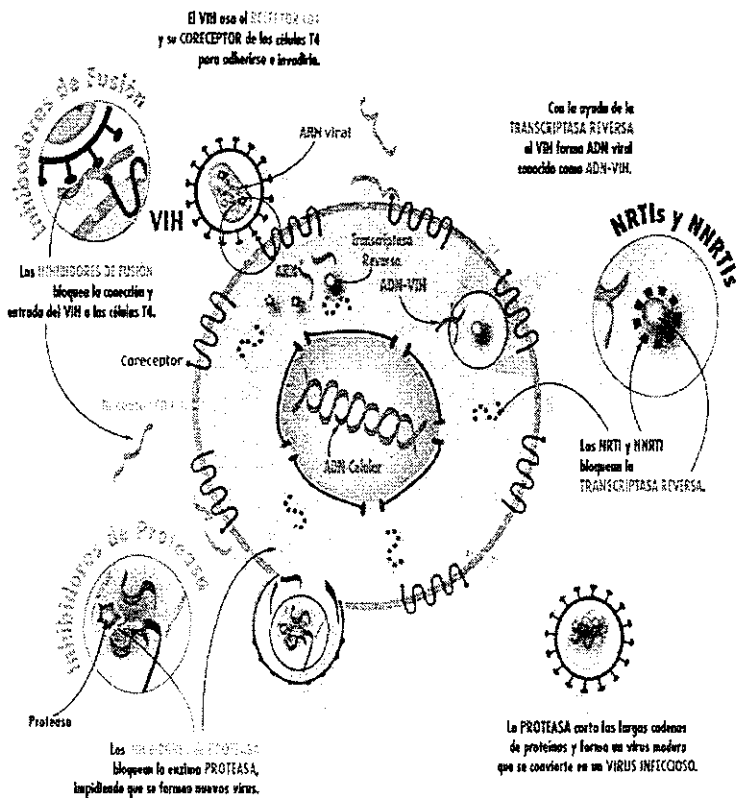


Figura 9. Mecanismo de acción de los ARV ^V.

3.12.7 Fármacos antirretrovirales

Existen en el mercado 22 ARV que han sido aprobados por la FDA ⁵³ (Cuadro 3) los cuales están disponibles para el tratamiento de las personas que viven con VIH/SIDA en México.

Cuadro 4. Fármacos ARV aprobados por la FDA ⁵³

Clase	Nombre Genérico	Abreviatura	Blanco	Mecanismo de Acción
Inhibidores de la Proteasa	Atazanavir	AVT	Proteasa	Se unen al sitio activo de la enzima, inhibiendo su función.
	Darunavir	DRV		
	Fosamprenavir	FPV		
	Indinavir	IDV		
	Lopinavir	LPV		
	Nelfinavir	NFV		
	Saquinavir	SQV		
	Tipranavir	TPV		
Inhibidores de la Transcriptasa Reversa No-análogo de los nucleósidos	Delavirdine	DLV	Transcriptasa Reversa	No fosfonilados. Se unen directamente a la TR.
	Efavirenz	EFV		
	Etravirine	ETR		
	Nevirapine	NVP		
Inhibidores de la Transcriptasa Reversa Análogos de los nucleósidos	Lamivudine	3TC	Transcriptasa Reversa	Fosforilados por enzimas celulares. Competitivamente inhiben la síntesis de ADN viral o causan la terminación de la cadena.
	Abacavir	ABC		
	Zidovudine	AZT		
	Stavudine	D4T		
	Didanosine	DDI		
	Emtricitabine	FTC		
	Tenofovir	TDF		
Inhibidor de Fusión	Enfuvirtida	T-20	Envoltura gp41	Se unen a la región HR1 de la glucoproteína gp41
Inhibidor de Entrada	Maraviroc	MVC	CCR5 y CCRX4	Bloquea los receptores para Bquimiocina, CCR5 y CCRX4
Inhibidor de la Integrasa	Raltegravir	RAL	Integrasa	Impiden la introducción del ADNc viral al ADN de la celular por inhibición de la Integrasa.

3.13 RESISTENCIA A LOS ANTIRRETROVIRALES

Debido a la acelerada replicación del VIH, con tasas cercanas a 10^{10} partículas virales por día, además de la ausencia de actividad exonucleasa

de la Transcriptasa Reversa viral, las mutaciones genómicas en el VIH aparecen de manera natural ⁵⁴.

La tasa de mutación del VIH-1 es de 1 en 10^5 pares de bases por ciclo⁵⁵, es decir, aparece una mutación por cada ciclo de replicación, por lo que la infección con VIH se caracteriza por una extremada diversidad genética de las poblaciones virales ^{56,57}.

Las variantes virales son denominadas cuasiespecies. Estas variantes evolucionan continuamente y son capaces de evadir la respuesta inmune del hospedador adquiriendo un tropismo celular alterado y presentando variantes resistentes a los fármacos ⁵⁸.

La heterogeneidad de la población del VIH-1 en un individuo infectado puede no estar distribuida de manera equitativa en todo el cuerpo. La disparidad de las cuasiespecies virales y la cantidad de RNA viral puede variar, particularmente en el cerebro, sangre, genitales y tejido linfóide ^{59,60}.

Por lo anterior, existe la posibilidad de encontrar cepas de VIH resistentes a cualquier antirretroviral aún antes del inicio de una terapia farmacológica. Por otro lado, cuando el paciente es tratado bajo un régimen terapéutico, los fármacos seleccionan las sub-poblaciones con mutaciones preexistentes, además de generar mutaciones adicionales debidas la presión del medicamento ⁶¹, lo que genera aún más resistencias.

El uso de mono o dúo terapias con NRTIs y elección inapropiada de la terapia antirretroviral generalmente resultan en una supresión sub-óptima de la replicación del VIH, lo que permite en el virus una evolución rápida de la resistencia a los fármacos a los que es expuesto ⁶².

La existencia de mutaciones relacionadas a resistencia en individuos sin previo tratamiento ARV, la inadecuada adherencia del paciente al régimen terapéutico, la potencia sub óptima de la terapia antirretroviral y la incorrecta prescripción de los fármacos, son algunos factores asociados con la falla al tratamiento ^{63,64}.

3.13.1 Mutaciones de resistencia

Las mutaciones de resistencia son cambios en el ARN viral que están asociadas con la resistencia fenotípica a cualquiera de los antirretrovirales disponibles. Generalmente, se expresan a modo de codones (Figura 10).

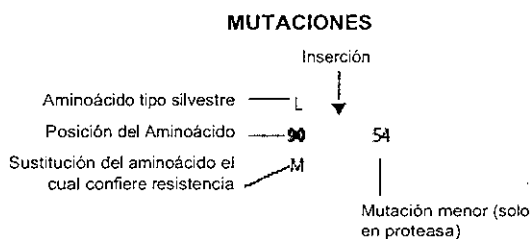


Figura 10. Nomenclatura de las mutaciones de resistencia ^{IX}.

Existen más de 200 mutaciones asociadas con la resistencia a cada una de las 6 clases de ARV disponibles en México ⁶⁵.

3.13.1.1 Mutaciones de la Proteasa

Se han identificado por arriba de 60 mutaciones que se asocian con la resistencia a los IP que incluyen tanto mutaciones mayores como menores ⁶⁵ (Figura 11).



Figura 11. Mutaciones asociadas con resistencia a los IP ^{IX}.

3.13.1.2 Mutaciones de la Transcriptasa Reversa

Más de 50 mutaciones provocan resistencia a los ITRAN, incluyendo la mutación M184V, mutaciones de multi-resistencia, mutaciones asociadas a análogos de la timidina y mutaciones accesorias o secundarias. Entre las mutaciones de la TR se asocian aproximadamente 40 con la resistencia a los ITRANN, incluyendo mutaciones mayores y menores, mutaciones secundarias y mutaciones menores polimórficas y no-polimórficas ⁶⁵ (Figura 12).

Mutaciones en el gen de la Transcriptasa reversa asociados con resistencia a Inhibidores de la Transcriptasa

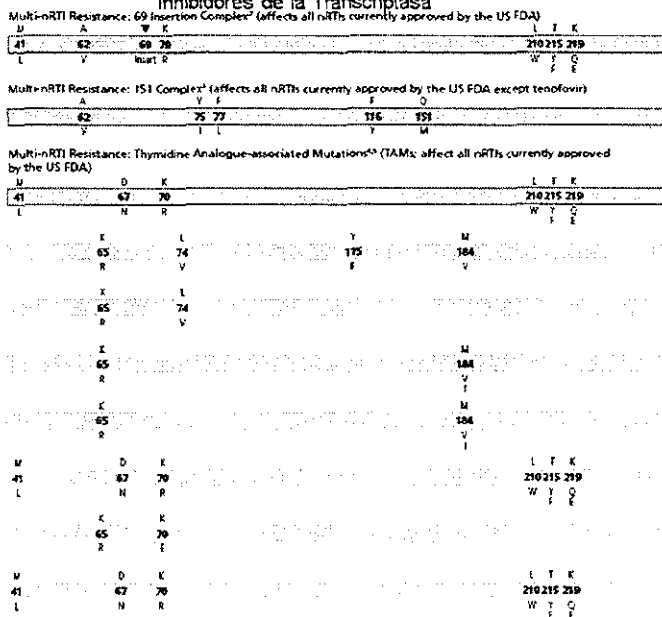


Figura 12. Mutaciones asociadas con resistencia a los IT ^{IX}.

3.13.1.3 Mutaciones de la Integrasa

Para el caso del Raltegravir se conocen alrededor de 30 mutaciones asociadas con resistencia ⁶⁵ (Figura 13).

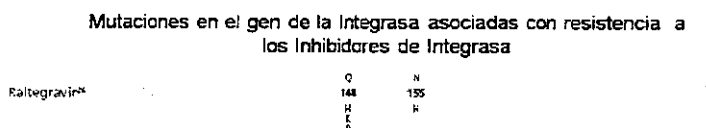


Figura 13. Mutaciones asociadas con resistencia a los IN ^{IX}.

3.13.1.4 Mutaciones de la envoltura

Finalmente del IF Enfuvirtide se han descrito más de 15 mutaciones en la gp41 que se asocian con resistencia. Aún no se conocen mutaciones en gp120 que provoquen resistencia a los Inhibidores de CCR5 como el Maraviroc ⁶⁵ (Figura 14).

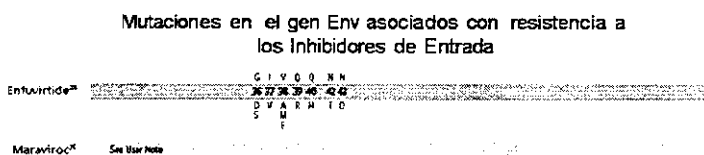


Figura 14. Mutaciones asociadas con resistencia a los IE ^{IX}.

3.13.2 Prevalencia de mutaciones de resistencia a los antirretrovirales.

La prevalencia de las mutaciones asociadas con la resistencia a los antirretrovirales varía en las diferentes regiones del mundo, debido a

múltiples factores entre los que se encuentran el Acceso: a los fármacos ARV, los esquemas de tratamiento y la adherencia al tratamiento del paciente.

La detección de mutaciones asociadas a resistencia a los ARV en individuos que no han sido expuestos al tratamiento farmacológico se debe principalmente a la transmisión de resistencia a los fármacos, en la cual, un individuo es infectado con las cepas resistentes de otro individuo que ha sido previamente tratado con medicamentos ARV ⁶³.

3.13.2.1 Prevalencia de mutaciones de resistencia en individuos *naïve* al tratamiento

La prevalencia de resistencia en pacientes sin tratamiento reportada para Europa ⁶⁷ y Canadá ⁶⁸ es de alrededor del 10%, mientras que en Estados Unidos fluctúa desde 10% ⁶⁹ hasta 25.2% ⁷⁰. En América Latina, la prevalencia en individuos con infección reciente, es muy variable, y va desde 2.5 % en Chile ⁷¹, 3.3% en Perú ⁷², hasta 3.1% a 22.2% en Brasil ^{73,74}.

En México, se han reportado diferentes prevalencias, desde el 2.8% en Monterrey ⁷⁵, 8.7% en Distrito Federal ⁷⁷, 12.7% en una muestra nacional⁷⁸ y 16% en pacientes del Occidente de México ⁷⁹.

La transmisión de la resistencia va en aumento en los últimos años en la mayoría de los países del mundo, debido al incremento en el Acceso: al tratamiento ARV, lo que ha provocado fallas en los esquemas utilizados para el tratamiento inicial de los pacientes *naïve*, originando un problema de salud pública

3.13.2.2 Prevalencia de mutaciones de resistencia en individuos con tratamiento

En los pacientes que se han sometido al tratamiento ARV y tienen carga de ARN viral detectable, la prevalencia de resistencia es cercana al 78% en Estados Unidos y Canadá ⁸⁰, de 81.8% en India ⁸¹, 48.6% en Corea ⁸², y 77% en Chile ⁷¹. Los ITRAN presentan mayor resistencia con 70% seguido de los IP con 42% y de los ITRANN con 31%. Los pacientes que desarrollan más resistencia son los que se encuentran en la etapa más avanzada de la infección, transmiten cepas resistentes a los ARV y requieren de una intervención terapéutica eficiente ^{80, 83,84}.

3.13.3 Análisis de resistencia

Las pruebas de resistencia, conjuntamente con las pruebas de carga viral y cuenta de linfocitos CD4/CD8 son los instrumentos que, asociados con la clínica, ayudan al médico tratante a prescribir un régimen terapéutico eficaz para el paciente.

En los últimos años, las pruebas de resistencia del VIH se han vuelto un estándar en los Estados Unidos y países de la Unión Europea. Su objetivo es detectar mutaciones en el genoma del VIH de un paciente y si estas mutaciones afectan la actividad de uno o más de los medicamentos disponibles para el tratamiento del VIH/SIDA ⁸⁵. Estas pruebas ayudan a determinar la efectividad de los ARV así como el tiempo que estos pueden ser utilizados ⁸⁶. Existen dos tipos de pruebas para evaluar la resistencia a los ARV's: las pruebas fenotípicas y las pruebas genotípicas.

3.13.3.1 Pruebas fenotípicas

Las pruebas fenotípicas de resistencia miden la capacidad de replicación del virus en presencia de ARV a diferentes concentraciones. Estas pruebas pueden ser fenotipos tradicionales, en las cuales se realiza un cultivo de las células del paciente con VIH y los fenotipos recombinantes, las cuales amplifican el gen *pol*, que es incorporado en un plásmido recombinante, para después colocarse en un cultivo con diferentes concentraciones de ARV's, a fin de evaluar la sensibilidad a los mismos ⁸⁷.

Estas pruebas miden de manera directa la sensibilidad del VIH al medicamento, generando resultados del índice inhibitorio al 50 o 90% IC₅₀ o IC₉₀. Son útiles para determinar resistencia cruzada y son de fácil interpretación para los médicos tratantes. Las pruebas fenotípicas son más costosas, los valores de corte solo están establecidos y estandarizados para pocos ARV, además de no detectar poblaciones menores del 10-25%, ni mutaciones tempranas ⁸⁸.

3.13.3.2 Pruebas genotípicas

Las pruebas genotípicas de resistencia detectan mutaciones específicas en el gen de la proteasa, de la transcriptasa reversa y de la envoltura ⁸⁵. Existen tres técnicas para llevar a cabo este tipo de pruebas: hibridación del producto amplificado (LIPA), el uso de chips en el que se analizan los codones por hibridación, y el análisis por secuenciación del gen *pol* y *env*. Estas pruebas son más sensibles en la detección de poblaciones virales mutantes, el tiempo

de entrega de resultados es más corto, además, detectan mutaciones tempranas previas a la aparición de resistencia fenotípica. Con las pruebas genotípicas se mide indirectamente la resistencia, se requiere de experiencia en el análisis de la secuencia para la interpretación de los resultados y es necesario el uso de algoritmos que correlacionen las mutaciones de resistencia con aquellas conocidas que confieren resistencia fenotípica ^{85,89}.

3.13.4 Aplicación en la clínica

Una prueba de resistencia que se lleva a cabo en el momento oportuno aporta beneficios para el paciente y para la institución encargada del tratamiento del mismo ⁹⁰. Entre estos beneficios se encuentran: evitar el cambio innecesario del tratamiento antirretroviral, descartar problemas de adherencia, favorecer la utilización del fármaco durante el mayor tiempo posible, evitar toxicidad farmacológica y reducir costos del tratamiento ⁸⁶, sin olvidar el aumento en calidad y promedio de vida del paciente.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las pruebas de resistencia genotípica favorecen la detección oportuna de los codones de resistencia que aparecen en el genoma viral durante la historia natural de la infección por VIH y causan la ineffectividad de los antirretrovirales.

Los patrones de resistencia a los antirretrovirales son diferentes en todo el mundo, producto de diversos factores como: falta de adherencia del paciente, esquemas de combinación, fecha de aprobación de los antirretrovirales para su uso en cada país, cambios imprevistos por falta de abastecimiento oportuno, modificación por la industria farmacéutica en la presentación y dosis, accesibilidad a los fármacos y el ejercicio incorrecto de la práctica médica.

La aparición de mutaciones de resistencia, se acompaña del incremento en la carga viral y de una disminución en el número de linfocitos CD4+, consecuentemente de inmunodeficiencia y de la presencia de enfermedades oportunistas que aumentan el costo país debido a la morbilidad y mortalidad entre los individuos VIH positivos.

El propósito de este trabajo es describir los patrones de resistencia que presenta el VIH que portan los individuos que viven con este virus en el Centro y Occidente de México, con el objeto de ofrecer al personal de salud herramientas que soporten la toma de decisiones tempranas y acertadas, sobre cuándo y con qué fármacos iniciar o cambiar la terapia antirretroviral.

5. HIPÓTESIS

5. HIPÓTESIS

La frecuencia de codones de resistencia del VIH es igual entre individuos con tratamiento y sin tratamiento de las regiones Occidente y Centro de México.

6. OBJETIVOS

6. OBJETIVOS

6.1 General

Evaluar la frecuencia de los codones de resistencia a los antirretrovirales Inhibidores de la Transcriptasa Reversa e Inhibidores de la Proteasa en una muestra de pacientes con y sin tratamiento antirretroviral de las regiones Centro y Occidente de México.

6.2 Específicos.

- 6.2.2 Correlacionar la frecuencia de aparición de los codones de resistencia con la cuenta de linfocitos CD4/CD8 y la carga viral.
- 6.2.3 Establecer las bases científicas para proponer, por regiones, esquemas terapéuticos basados en los hallazgos de este estudio.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Diseño del estudio

Descriptivo, retrospectivo, transversal, ciego.

7.2 Lugar y periodo del estudio

El trabajo experimental y analítico se llevó a cabo en el Laboratorio de Inmunodeficiencias y Retrovirus Humanos del Centro de Investigación Biomédica de Occidente, CMNO IMSS, en la Ciudad de Guadalajara, Jalisco, México entre los meses de Junio y Agosto de 2008.

7.3 Universo de estudio

Individuos VIH seropositivos mediante la técnica ELISA y Western-Blot de acuerdo a la NOM-010-SSA-1993 con y sin tratamiento antirretroviral, derechohabientes del IMSS, mayores de 18 años que aceptaron de forma voluntaria y por escrito participar en el estudio (Anexo 1).

Los pacientes adscritos a la Unidad Médica de Alta Especialidad (UMAE), La Raza, Centro Médico Nacional (CMN), Hospital Gabriel Mancera, Hospital Siglo XXI; Hospitales Primero de Octubre y Veinte de Noviembre del ISSSTE, formaron el grupo de pacientes del Centro de México. Las personas que ingresaron al estudio como grupo del Occidente de México, estaban siendo atendidas en la UMAE de Especialidades del Centro Médico Nacional de Occidente, Hospital General Regional No. 110, Hospital General Regional

No. 45, Hospital General de Zona No. 46, del IMSS, además de individuos del Nuevo Hospital Civil de Guadalajara, Dr. Juan I Menchaca, y Hospital General de Occidente de la Secretaría de Salud, Jalisco.

7.4 Tamaño de la muestra

Se determinó un intervalo de confianza del 95%, con un error de precisión de 0.05 para los individuos *naïve* y del 0.07 para los individuos con tratamiento. La probabilidad de ocurrencia del fenómeno se calculó de acuerdo al promedio de prevalencia de los valores reportados en la literatura, ajustados al peso del tamaño de la población *naïve* al tratamiento reportada en cada uno de los artículos sobre diferentes regiones de México, resultando una media de 12.1%. Para el cálculo de los pacientes tratados, se determinó con el promedio mundial que es del 60%.

La distribución del total de la muestra para cada uno de los grupos se hizo considerando estratos proporcionales en función del número de pacientes de cada región a analizar.

La fórmula para obtener la proporción promedio ponderada del tamaño de muestra es:

$$\frac{\sum(\text{Proporción} * n_s)}{\sum n_s}$$

Donde, "proporción" corresponde a la prevalencia reportada en la literatura sobre 100, y "n" al número de individuos considerados en cada muestra (Cuadro 5).

Ciudad	Año	Prevalencia	n	Proporción
Monterrey	2001-2003	2.8	36	1.008
México D.F.	2005	8.7	103	8.961
Occidente	2002-2003	16.0	99	15.84
Nacional	2006-2007	12.7	500	63.5
Total			738	89.309
Total/n				0.121
Promedio				12.1

El tamaño de la muestra se calculó con la fórmula:

$$n = \frac{Z\alpha^2 * p * q}{d^2}$$

Variables	Cálculo para pacientes sin tratamiento	Cálculo para pacientes con tratamiento
Z	1.96	1.96
Intervalo de confianza 95%		
P	0.12	0.6
Probabilidad del fenómeno		
q	0.88	0.4
1-p		
d ²	0.05	0.07
Error de precisión		
n	83	96
Tamaño de muestra		

7.5 Criterios de inclusión

- Pacientes con infección por VIH que hayan vivido 5 o más años en las regiones Centro y Occidente de México.
- Haber dado su consentimiento por escrito sobre su inclusión en el estudio, previo consentimiento informado (Anexo 1).
- Individuos del género masculino o femenino entre los 18 y 60 años de edad.

- Individuos previos a iniciar terapia antirretroviral.
- Individuos con tratamiento triple (2 Inhibidores de la transcriptasa reversa análogo o no análogo de los nucleósidos y 1 Inhibidor de proteasa), durante un periodo mínimo de 18 y máximo de 36 meses.
- Individuos con cuentas de linfocitos CD4 + ≤ 500 células/ μl y carga viral $\geq 20,000$ copias/ml por la técnica de RNA-PCR ó $\geq 10,000$ copias/ml con la prueba b-DNA.
- Individuos con historia clínica completa (Anexo 2).

7.6 Criterios de exclusión.

- No completar la muestra biológica, necesaria para las pruebas de laboratorio.
- Individuos bajo tratamiento antirretroviral por un periodo menor a 18 meses.
- Individuos que hayan abandonado el tratamiento antirretroviral por un periodo mayor a 15 días antes de la obtención de la muestra sanguínea.

7.7 Metodología

7.7.1 Obtención de la muestra

Se obtuvo una muestra de 15 ml de sangre periférica mediante punción venosa de 218 pacientes en un tubo con EDTA. Del volumen sanguíneo inicial, se separó el plasma mediante centrifugación y se mantuvo a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$

hasta la extracción del ARN viral.

7.7.2 Extracción de ARN

La extracción de ARN viral contenido en plasma se llevó a cabo con el kit de extracción QIAmp ARN viral (Qiagen, Hilden, Germany) de acuerdo a las especificaciones del fabricante (Anexo 3).

7.7.3 Prueba de resistencia genotípica

Para el análisis de resistencia genotípica se obtuvo ADNc, a partir del ARN viral extraído del plasma, mediante la técnica de Retrotranscripción de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR). Se obtuvieron, como producto de amplificación, el gen de la proteasa y los primeros 318 codones de la transcriptasa reversa, utilizando para esta reacción el kit de amplificación comercial VIH-1 TruGene (Bayer HealthCare, Toronto, Ontario).

Se tomaron tres alícuotas del producto amplificado para realizar la reacción CLIP con PCR anidada del gen de la proteasa, y los codones 39 al 142 y 135 al 244 del gen de la Transcriptasa Reversa. La reacción CLIP consta de una PCR en presencia de los iniciadores marcados con fluorocromos Cy5.5 (sentido) y Cy5.0 (antisentido), dNTPs y didesoxinucleótidos en proporción 300:1.

Los productos de reacción se colocaron en un gel de acrilamida al 6% en un Long Read Tower para su secuenciación (Anexo 4). Cada muestra secuenciada se analizó con el software de GeneObjects (versión 3.2, SIEMENS), las secuencias fueron alineadas con el software Clustal X y

analizadas con los algoritmos del software de identificación de mutaciones de resistencia a los antirretrovirales de la Universidad de Stanford ⁹¹ (Anexo 5).

La resistencia genotípica se clasificó en tres niveles: baja, intermedia y alta, de acuerdo con el Panel Internacional de Expertos en los Antirretrovirales del VIH (Anexo 6).

7.8 Análisis estadísticos

Las variables continuas se reportan como promedios y rangos, las variables categóricas como porcentajes. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa SPSS ⁹². Se utilizó la prueba U de Mann-Whitney para comparar las variables continuas y X^2 para comparar las variables categóricas. Para analizar si había asociación estrecha entre carga viral, cantidad de linfocitos CD4 y número de mutaciones, se llevó a cabo un análisis de correlación de Spearman.

8. RESULTADOS

8. RESULTADOS

8.1 Resultados generales

Se estudiaron 218 individuos VIH positivos de los cuales el 89% correspondieron al sexo masculino. Se formaron dos grupos: individuos con tratamiento previo 118 (54%) e individuos *naïve* al tratamiento 100 (46%).

Para el grupo de individuos con tratamiento previo, 102 (87.4%) presentaron resistencia a por lo menos un antirretroviral; 47 (39.5%) presentaron resistencia tanto a los IP como a los IT; 55 (46.2%) tuvieron resistencia solo a los IT, mientras que solo 2 (1.7%) presentaron resistencia exclusiva a los IP. Del grupo de individuos *naïve* al tratamiento, 18 (18%) presentaron resistencia para al menos un antirretroviral; 10 (10%) presentaron resistencia tanto a los IP como a los IT; 8 (8%) fueron exclusivamente resistente a los IT y ninguno presentó resistencia única a los IP. Estos resultados se detallan en el cuadro 7.

La resistencia a los ARV y la carga viral fueron diferentes y estadísticamente significativas entre los dos grupos analizados. No hubo diferencias significativas en la cuenta de linfocitos CD4+ (Cuadro 7).

Cuadro 7. Características generales de la población estudiada			
	Individuos con tratamiento n=119	Individuos sin tratamiento n=99	Significancia P<0.05
Hombres	88%	90%	NS
Mujeres	12 %	10%	NS
Media Linfocitos CD4+ cél/mm ³	219.5	209.3	NS
Carga Viral copias/mL	241223.9	337336	<0.0001
Resistencia a los IP	42.0%	10%	<0.0001
Resistencia a los IT	85.7%	18%	<0.0001
Resistencia a los ITRAN	32.2%	15%	<0.003
Resistencia a los ITRANN	50%	9%	<0.0001
Resistencia a ambos IT	3.5%	6%	NS

8.2 Regiones centro y occidente.

Para el análisis por regiones, se formaron 4 subgrupos; individuos con tratamiento y sin tratamiento, residentes durante los últimos cinco años en el occidente de México; e individuos con y sin tratamiento, residentes durante los últimos cinco años en la región centro de México.

De las muestras analizadas, 140 (64%) pertenecían a individuos residentes de la región Centro, mientras que 78 (36%) a personas residentes del Occidente.

Los resultados arrojados por el análisis de los subgrupos con la prueba de X^2 respecto a la prevalencia de resistencia a los Inhibidores de Proteasa e Inhibidores de la Transcriptasa reversa, mostraron que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los residentes de las regiones Centro y Occidente de México para ninguno de los antirretrovirales analizados (Cuadro 8).

Cuadro 8. Comparación de la prevalencia de resistencia a los Antirretrovirales Inhibidores de Transcriptasa reversa (IT) e Inhibidores de Proteasa (IP) entre las regiones Centro y Occidente de México.

	ARV	Centro	Occidente	Significancia P<0.05
<i>Naive</i>	IP	5.7%	16.7%	NS
	IT	15.7%	23.3%	NS
Tratados	IP	48.8%	53.3%	NS
	IT	83.3%	76.6%	NS

8.3 Individuos con tratamiento

Mutaciones mayores en el gen de la proteasa

Las mutaciones mayores en el gen de la proteasa en pacientes con tratamiento tuvieron una prevalencia que fluctuó entre 17.9% y 1.7%, afectando la susceptibilidad a todos los Inhibidores de la Proteasa. El Atazanavir (ATV) resultó ser el antirretroviral con más prevalencia de mutaciones de resistencia (Cuadro 9).

La mutación L90M, que provoca multi-resistencia a todos los ARV del grupo de los IP fue la más prevalente.

Cuadro 9. Mutaciones mayores en el gen de la proteasa		
Prevalencia (%)	Mutación asociada con resistencia	Antirretroviral al que provoca resistencia
17.9	L90M	ATV, DRV, FPV, IDV, LPV, NFV, SQV, TPV
15.4	V82A	ATV, FPV, ADV, LPV, NFV, SQV, TPV
13.7	M46I	ATV, FPV, ADV, LPV, NFV, TPV
12.8	I 84V	ATV, DRV, FPV, IDV, LPV, NFV, SQV, TPV
11.1	I54V	ATV, FPV, IDV, LPV, NFV, SQV, TPV
4.3	M46L	ATV, FPV, IDV, LPV, NFV, TPV
3.4	V32I	ATV, DRV, FPV, IDV, LPV
2.6	G73T	ATV (IAS)
1.7	D30N,	NFV
	I47V	ATV, DRV, FPV, IDV, LPV, NFV, TPV
	G48V,	ATV, LPV, NFV, SQV
	G73S,	ATV, DRV, FPV, IDV, LPV, SQV
	V82T,	ATV, FPV, IDV, LPV, NFV, SQV, TPV
	V82F	ATV, FPV, IDV, LPV, NFV, SQV
	N88D	ATV, NFV
	F53L,	ATV, IDV, NFV, SQV, LPV(IAS)
	I54L,	ATV, DRV, FPV, IDV, LPV, NFV, SQV
	V82L,	TPV
	V82S	ATV, FPV, IDV, LPV, NFV, TPV

Mutaciones menores en el gen de la proteasa

En relación a las mutaciones menores en la proteasa en pacientes con tratamiento, la prevalencia más alta fue de la mutación A71V con el 26% y la menor fue del 1.7% (Cuadro 10).

Al igual que las mutaciones mayores de la proteasa, el Atazanavir (ATV) fue el antirretroviral con mayor número de mutaciones de resistencia, seguido del Indinavir (IDV) (Cuadro 10).

Cuadro 10. Mutaciones menores en el gen de la proteasa		
Prevalencia (%)	Mutación asociada con resistencia	Antirretroviral al que provoca resistencia
26.0	A71V	ATV, IDV, LPV, NFV, SQV
14.0	L10I,	ATV, FPV, IDV, LPV, SQV
13.8	M36I	ATV, IDV, NFV, TPV
10.3	A71T	ATV, IDV, LPV, NFV, SQV
5.1	L24I	ATV, IDV, LPV, SQV
3.4	L10F	ATV, FPV, LPV, NFV
	L10V	ATV, FPV, IDV, LPV, SQV, TPV
2.6	K20R	ATV, IDV, LPV, TPV
	Q58E	TPV
1.7	K20I	ATV
	L33F	ATV, DRV, LPV, TPV
	L33V	ATV
	A71L	ATV
	K20T	ATV
	F53L	ATV, LPV

Otras mutaciones en el gen de la proteasa

Se detectaron otras mutaciones en esta región genómica del virus cuyas prevalencias fluctúan desde 71.6% hasta 0.86%. Aunque algunas de estas mutaciones son consideradas por la Sociedad Internacional de SIDA (IAS por sus siglas en inglés) como mutaciones secundarias, en su mayoría son codones no asociados a resistencia y marcadores de subtipo viral como la

mutación más prevalente de este grupo, la L63P, que se asocia con el subtipo B (Cuadro 11).

Cuadro 11. Otras mutaciones en el gen de la proteasa		
Prevalencia (%)	Mutación	Antirretroviral al que provoque posible resistencia
71.6	L63P	LPV
51.7	I93L	ATV
40.5	V77I	IDV, NFV, SQV
29.3	I62V	ATV, SQV,
26.7	R41K	No asociada con resistencia
18.1	E35D	No asociada con resistencia
17.2	R57K	No asociada con resistencia
15.5	I15V	No asociada con resistencia
13.8	I13V	TPV
	N37S	No asociada con resistencia
	I64V	ATV
	I72V	No asociada con resistencia
12.1	N37D	No asociada con resistencia
10.3	I72T	No asociada con resistencia
9.48	K14R, L19I	No asociada con resistencia
8.62	W6R, F99L	No asociada con resistencia
6.03	Q58E	TPV
	G68E, H69Y	No asociada con resistencia
5.17	D60E	ATV
	I85V	ATV
	L89I/M	No asociada con resistencia
	Q92K	No asociada con resistencia
4.31	Q18E, K45R, I72E	No asociada con resistencia
3.45	G16E	ATV
	D29V, T31I, Q61E, L63T	No asociada con resistencia
2.59	T12K, T12S, G16A, L19Q, T26I, N37C, N37I, V56I, Y59F, T74A, T91V,	
1.7	Q7E, V11D, T12P, I15L, G16R, L19V, E21K, E34PQR, N37E, N37T, N37Y, L38F, L38M, W42D, K43R, P44L, I64V, C67F, G68D, K70E, K70R, K70T, I72L, I72M, P79ADH, L97Q	
0.86	T4I, Q7H, Q7K, R8Q, R8T, P9L, T12A, T12I, T12Q, I13M, I15R, G16X, G17D, G17E, Q18H, Q18K, Q18R, E21D, A22E/D, A22V, L23I, L23S, L23V, L24L, G27, A28G, A28P, D29A, D29E, T31K, L33V, E34A, N37G, N37H, N37T, N37Y, N37K, N37P, N37Q, L38I, P39E, P39Q, P39S, R41S, K34E, K43Q, P44T, K45D, G52V, K55R, Q58P, Q61H, Q61K, Q61P, L63Q, C67S, H69Q, K70I, K70V, T74CF, T74S, V75L, L76V, P79NY, T80S, P81L, V82I, N83D, I85F, G86E, Q92H	

Prevalencia de resistencia a los Inhibidores de la Proteasa

De los resultados arrojados por el programa de análisis de resistencia de la Universidad de Stanford, se obtuvieron los niveles de susceptibilidad y resistencia para cada uno de los ARV Inhibidores de la Proteasa. El Atazanavir (ATV) e Indinavir (IDV) fueron los fármacos a los que se presentó mayor resistencia (40.2%). El Darunavir (DRV), Nelfinavir (NFV) y Tipanavir (TPV) son los antirretrovirales con mayor susceptibilidad (62.4%) de este grupo de medicamentos.

Cuadro 12. Prevalencia (%) de resistencia a los Inhibidores de la Proteasa					
Antirretroviral	Prevalencia de Susceptibilidad	Prevalencia de Resistencia			
		Total	Baja	Media	Alta
ATV	59.8	40.2	12	15.4	12.8
DRV	62.4	37.6	6	14.5	17.1
FPV	60.7	39.3	15.4	16.2	7.7
IDV	59.8	40.2	2.6	12	25.6
LPV	61.5	38.5	6	15.4	17.1
NFV	62.4	37.6	8.5	13.7	15.4
SQV	61.5	38.5	6.8	14.5	17.1
TPV	62.4	37.6	9.4	13.7	14.5

Mutaciones en el gen de la Transcriptasa reversa asociadas con resistencia a los ITRAN

Al analizar las mutaciones asociadas con resistencia a los inhibidores de la transcriptasa reversa análogos de los nucleósidos, se identificó el complejo de inserción 69, representado por la mutación mas prevalente T215Y, presente en más de un tercio de la población estudiada. Para este mismo grupo de ARV se observaron TAMS de multi-resistencia, representados en mayor proporción por la mutación D67N presente en una cuarta parte de

nuestra población. La mayoría de las mutaciones encontradas en este grupo forma parte de alguno de los complejos de multi-resistencia (Cuadro 13).

Cuadro 13. Mutaciones en el gen de la Transcriptasa reversa asociadas con resistencia a los ITRAN		
Prevalencia (%)	Mutación asociada con resistencia	Antirretroviral al que provoca resistencia
35.6	T215Y	Complejo inserción 69 Multi-resistencia a todos los NRTI aprobados por la FDA. TAMS Multi-resistencia a todos los NRTI aprobados por la FDA
25.4	D67N	TAMS Multi-resistencia a todos los NRTI aprobados por la FDA
23.7	M41L	Complejo inserción 69 Multi-resistencia a todos los NRTI aprobados por la FDA
	M184V	ABC
	L210W	TAMS Multi-resistencia a todos los NRTI aprobados por la FDA
16.1	V118E	
13.6	K70R	TAMS Multi-resistencia a todos los NRTI aprobados por la FDA
8.5	L74V	ABC, DDI
	K219Q	Complejo inserción 69 Multi-resistencia a todos los NRTI aprobados por la FDA
7.6	E44D	
5.9	T215F	Complejo inserción 69 Multi-resistencia a todos los NRTI aprobados por la FDA
5.1	F77F/L	Complejo 151 de Multiresistencia a todos los NRTIs aprobados por la FDA excepto Tenofovir
4.2	K219N	
3.4	T69D	Complejo inserción 69 Multi-resistencia a todos los NRTI aprobados por la FDA
	I74I	
	K219E	Complejo inserción 69 Multi-resistencia a todos los NRTI aprobados por la FDA
2.5	K65N, F116D	
1.7	A62K, A62V, K65R, T69A, T69S, K70N, V75I, V75L, V75M, Q151M, T215C, K219R	No asociadas con resistencia
0.8	M41I, M41S, M41T, E44EG, A62D, D67E, T69G, K70S, L74D, L74Y, V75A, F77S, F77W, Y115D, Y115IM, Y155F, V118D, Q151R, M184I, T215D, T215I, T215S, T15V, K219H	No asociadas con resistencia

Mutaciones en el gen de la Transcriptasa reversa asociadas con resistencia a los ITRANN

Los susceptible a los ITRANN se ve afectada por mutaciones de multi-resistencia; en el caso de nuestra población, presenta al menos un 20% de riesgo de tener resistencia a cualquiera de los fármacos que pertenecen a este grupo de ARV, ya que las mutaciones K103N y Y181C se presentan en alrededor del 20% de las muestras analizadas (Cuadro 14).

Al igual que las mutaciones asociadas con resistencia a los ITRAN, la mayoría de las mutaciones que se encontraron, pueden provocar resistencia a todos los ITRANN aprobados por la FDA.

Cuadro 14. Mutaciones en el gen de la transcriptasa reversa asociadas con resistencia a los ITRANN		
Prevalencia (%)	Mutación asociada con resistencia	Antirretroviral al que provoca resistencia
20.3	K103N	EFV, NVP, DLV
18.6	Y181C	EFV, ETR, NVP, DLV
11.9	G190A	AFV, ETR, NVP
6.8	A98G	EFV, ETR, NVP, DLV
5.9	V108I	EFV, NVP, DLF
5.1	K101E	EFV, ETR, NVP, DLV
4.2	L100I	EFV, ETR, NVP, DLV
3.4	V179D	EFV, ETR, NVP, DLV
2.5	K103R	No asociada con resistencia
	K103S	EFV, NVP, DLV
	Y188L	EFV, ETR, NVP, DLV
1.7	V106A	EFV, NVP, DLV
	V108D	No asociada con resistencia
	F227L	NVP
0.8	L100D, L100S, K101D, K101P, K103, K103EK, K103IL, K103Q, K103V, V179T, Y181FIN, G190S, P225H, P236F, K238I	No asociadas con resistencia

Prevalencia de resistencia a los Inhibidores de la Transcriptasa reversa

Los resultados observados al realizar el análisis de resistencia para el grupo de inhibidores de la transcriptasa reversa muestran que la susceptibilidad a estos fármacos es menor que la de los inhibidores de la proteasa. Además, los ITRANN presentan una mayor prevalencia en el nivel alto de resistencia.

El fármaco con mayor resistencia es el Didanosine (DDI), con un 73.7% de la población afectada; sin embargo, el Etravirine (ETR) y el Nevirapine (NVP) son los medicamentos con mayor resistencia en nivel alto, con 41.5% y 42.4% respectivamente (Cuadro15).

Los IT con mayor susceptibilidad son Lamivudine (3TC) y Emtricitabine (FTC) con un 62.7% de la población sensible a estos antirretrovirales (Cuadro 15).

Cuadro 15. Prevalencia (%) de resistencia a los Inhibidores de la Transcriptasa Reversa					
Antirretroviral	Prevalencia de Susceptibilidad	Prevalencia de Resistencia			Total
		Baja	Media	Alta	
3TC	62.7	10.2	3.4	23.7	37.3
ABC	31.4	28	27	13.6	68.6
AZT	37.3	12.7	26.3	23.7	62.7
D4T	31.4	30.5	21.2	16.9	68.6
DDI	26.3	31.4	26.3	16.1	73.7
FTC	62.7	10.2	3.4	23.7	37.3
TDF	40.7	29.7	28.8	0.8	59.3
DLV	48.3	12.7	0.8	38.1	51.7
EFV	47.5	14.4	5.1	33.1	52.5
ETR	47.5	9.3	1.7	41.5	52.5
NVP	45.8	11	0.08	42.4	54.2

8.4 Individuos *naïve* al tratamiento

Mutaciones mayores de la proteasa

Como se mencionó anteriormente, la frecuencia de las mutaciones mayores de la proteasa es menor en los individuos sin tratamiento, con una prevalencia máxima de 2%, asociada a L90M que confiere resistencia a todos de los IP (Cuadro 16).

Cuadro 16. Mutaciones mayores en el gen de la proteasa		
Prevalencia (%)	Mutación asociada a resistencia	Antirretrovirales a los que provoca resistencia
2	L90M	ATV, DRV, FPV, IDV, LPV, NFV, SQV, TPV
1	L24I	ATV, FPV, IDV, LPV, SQV, NFV
	D30N	NFV
	M46L	ATV, FPV, IDV, LPV, NFV, TPV
	I47M	
	G48V	ATV, DRV, FPV, LPV, NFV, SQV
	I54L	ATV, DRV, FPV, LPV, NFV, SQV
	I54V	ATV, FPV, IDV, LPV, NFV, SQV, TPV
	I84V	ATV, DRV, FPV, IDV, LPV, NFV, SQV, TPV
	N88D	ATV, NFV

Mutaciones menores en el gen de la proteasa

El número de mutaciones menores es considerablemente menor en el grupo de los pacientes sin tratamiento y fluctúa entre el 15.3% y el 1%; la mutación A71T es la más frecuente. Todos los IP están representados por las mutaciones encontradas en esta población (Cuadro 17).

Cuadro 17. Mutaciones menores en el gen de la proteasa		
Prevalencia (%)	Mutación asociada a resistencia	Antirretrovirales a los que provoca resistencia
15.3	A71T	ATV, IDV, LPV, NFV, SQV
12.2	A71V	ATV, IDV, LPV, NFV, SQV
8.2	L10I	ATV, FPV, IDV, LPV, NFV, SQV
1	V77I	IDV, NFV, SQV

Otras mutaciones en el gen de la proteasa

A diferencia del grupo con tratamiento, la mutación más común fue la I93L con el 84.7% de prevalencia, esta mutación es también un marcador de subtipo B al igual que L63P.

Cuadro 18. Otras mutaciones en el gen de la proteasa		
Prevalencia (%)	Mutación asociada a resistencia	Antirretrovirales a los que podría provocar resistencia
84.7	I93L	ATV
57	L63P	LPV
34.7	V77I	IDV, NFV, SQV
28.6	I62V	ATV, SQV
27.6	R41K	No asociada con resistencia
23.5	R57K	No asociada con resistencia
21.4	E35D	No asociada con resistencia
19.4	N37D	No asociada con resistencia
18.4	I13V	TPV
17	M36I	ATV, IDV, NFV, TPV
16.3	I64V	ATV
13.3	W6R, I15V	No asociada con resistencia
12.2	N37S, I72V	No asociada con resistencia
11.2	L19I, I72R	No asociada con resistencia
10.2	K14R	No asociada con resistencia
8.2	T12A	No asociada con resistencia
	G16E	ATV
	K70R	No asociada con resistencia
6.1	T12P, N37E, P39S, L63H, E65D	No asociada con resistencia
5.1	K43R, L63S, I64L, F99L	No asociada con resistencia
4.1	K20KR, H69Y	No asociada con resistencia
3.1	L19V, N37T, L63A, L63T, I72E, I72T	No asociada con resistencia
	V82I	ATV
2.0	T12I, L19T, L33LV, M36KR, Q61E, I66V, C67S, K70E, G78E, P79S, L89M, T91V, L97F	No asociada con resistencia
1	L5P, Q7E, L10S, T12K, T12Q, T12S, I13M, I15M, G17D, G17E, Q18E, Q18H, L19M, L19Q, L19S, L24, T26I, D29G, TT31I, E35Q, N37C, N37P, L38I, L38M, P39T, P44L	No asociada con resistencia
	D60E	ATV
	Q61H, L6C, I64M	No asociada con resistencia
	I64R, G68E, H69Q, K70I, I72M, I85V, Q92E, Q92K, L92R, L97S, N98K	No asociada con resistencia

Prevalencia de resistencia a los Inhibidores de la Proteasa.

Todos los IP aprobados por la FDA presentan algún grado de resistencia en el grupo de pacientes naive al tratamiento. El fármaco que presenta mayor resistencia es el Tipranavir con un 9%, el Nelfinavir presenta un 3% de resistencia en un nivel alto, así como Atazanavir y Saquinavir con un 2% (Cuadro 19).

Cuadro 19. Prevalencia (%) de resistencia a los Inhibidores de la Proteasa					
Antirretroviral	Prevalencia de Susceptibilidad	Prevalencia de Resistencia			Total
		Baja	Media	Alta	
ATV	97	1	0	2	3
DRV	98	1	1	0	2
FPV	98	0	1	1	2
IDV	98	0	1	1	2
LPV	98	0	2	0	2
NFV	97	0	0	3	3
SQV	97	1	0	2	3
TPV	91	8	1	0	9

Mutaciones en el gen de la transcriptasa reversa asociadas con resistencia a los ITRAN

La prevalencia de las mutaciones asociadas con resistencia a los ITRAN se encuentra entre el 4% y 1%, siendo la mutación M41L la más prevalente, provocando resistencia a todos los ITRAN ya que pertenece al complejo de inserción 69 y a los TAMS de multi-resistencia (Cuadro 20).

A diferencia del grupo con tratamiento, se encontró la mutación F77L, que forma parte del complejo 151 de multi-resistencia y está presente en un 3% de la población estudiada. Se encontraron además, en menor

prevalencia otras mutaciones no asociadas con resistencia (Cuadro 20).

Cuadro 20. Mutaciones en el gen de la Transcriptasa reversa asociadas con resistencia a los ITRAN		
Prevalencia (%)	Mutación asociada a resistencia	Antirretrovirales a los que provoca resistencia
4	M41L	Complejo inserción 69 y TAMS Multi-resistencia a todos los NRTI aprobados por la FDA
3	F77L	Complejo 151 de Multiresistencia a todos los NRTIs aprobados por la FDA excepto tenofovir
2	V88I	No asociada con resistencia
	M184V	ABC, FTC, 3TC
	L210W	Complejo inserción 69 y TAMS Multi-resistencia a todos los NRTI aprobados por la FDA
1	T215Y	Complejo inserción 69 y TAMS Multi-resistencia a todos los NRTI aprobados por la FDA
	M41I	No asociada con resistencia
	M41K	No asociada con resistencia
	A62P	No asociada con resistencia
	D67N	TAMS Multi-resistencia a todos los NRTI aprobados por la FDA
	D67S	No asociada con resistencia
	T69A	No asociada con resistencia
	T69N	No asociada con resistencia
	K70R	Complejo inserción 69 y TAMS Multi-resistencia a todos los NRTI aprobados por la FDA
	L74F	No asociada con resistencia
	V75A	No asociada con resistencia
	F77I	No asociada con resistencia
	F77S	No asociada con resistencia
	Q151D	No asociada con resistencia
	T215A	No asociada con resistencia
T215C	No asociada con resistencia	
F116S	No asociada con resistencia	
K219N	No asociada con resistencia	

Mutaciones en el gen de la Transcriptasa Reversa asociadas con resistencia a los ITRANN

Para las mutaciones de resistencia de los ITRANN, la prevalencia también fluctúa entre el 4% y 1%, siendo la mutación Y181C la que provoca resistencia a todos los ITRANN con una prevalencia del 3% (Cuadro 21).

Prevalencia (%)	Mutación asociada a resistencia	Antirretrovirales a los que provoca resistencia
4	K103N	EFV, NVP, DLV
3	Y181C	EFV, ETR, NVP, ETR
2	K103R	
1	L100F, K103Q, V119D, G190A	EFV, ETR, NVP

Prevalencia de resistencia a los Inhibidores de la Transcriptasa

El inhibidor de transcriptasa que presentó la mayor resistencia es el Estavudine (D4T), con una susceptibilidad de solamente el 85%, mientras que el Lamivudine (3TC) es el más susceptible en un 97% de la población (Cuadro 22).

Antirretroviral	Prevalencia de Susceptibilidad	Total	Prevalencia de Resistencia		
			Baja	Media	Alta
ABC	87	13	12	1	0
3TC	97	3	1	0	2
AZT	88	12	9	0	2
D4T	85	15	12	1	1
DDI	87	13	11	1	0
FTC	95	5	2	0	2
TDF	92	8	4	2	0
DLV	90	10	2	0	6
EFV	90	10	4	1	3
ETR	91	9	4	3	0
NVP	90	10	2	0	6

9. DISCUSIÓN

9. DISCUSIÓN

Las mutaciones de resistencia tienen implicaciones importantes para el éxito en el manejo de la terapia antirretroviral. En este estudio, se determinó con un grado del 95% de confianza la prevalencia de éstas mutaciones en individuos con y sin tratamiento de las regiones Centro y Occidente del país.

En virtud de que la resistencia es dinámica y multifactorial, se consideraron los siguientes aspectos previamente descritos en la literatura: el tamaño y la fecha de toma de muestra, las técnicas de laboratorio utilizadas para la extracción y análisis de la misma, el algoritmo de interpretación de resistencia y desde luego, el estado de la población con respecto al tratamiento. Por lo anterior, para fines de este estudio, se utilizó la prueba genotípica de la resistencia; ya que permite detectar mutaciones tempranas y de baja prevalencia (20%-30%). El análisis e interpretación de los resultados se llevó a cabo con el programa de la Universidad de Stanford, debido a que es una base de datos que actualiza los algoritmos para el análisis de resistencia con mayor frecuencia que los otros programas disponibles y que además tiene la bondad de permitir el estudio a partir de dos fuentes de información primaria; las secuencias genómicas y los codones de resistencia. Estos aspectos metodológicos aseguraron que nuestros resultados fuesen homogéneos bajo los criterios previamente definidos con el objeto de disminuir el error de muestreo y, de esta manera, aumentar la certeza.

De acuerdo a lo esperado, el número de mutaciones en los individuos tratados fue mayor que entre las personas *naïve* al tratamiento para todos los antirretrovirales incluidos en el estudio. Esto se debe, principalmente, a la

presión selectiva de los fármacos sobre las cuasi-especies virales que presentan resistencia.

Al analizar la carga viral de los pacientes con y sin tratamiento, se observó una diferencia estadísticamente significativa, lo que demuestra un efecto inhibitorio de la replicación del VIH por el tratamiento antirretroviral, a pesar del número de mutaciones acumuladas.

De manera general, la resistencia a los ARV es 4 veces mayor en los individuos con tratamiento que en los *naïve*, exceptuando los ITRANN, que es 2 veces mayor, lo anterior nos permite inferir que hay una reversión hacia la cepa silvestre durante el curso de la infección⁶⁶.

Aunque no se observó una correlación significativa entre la carga viral, el número de linfocitos CD4+ y la frecuencia de mutaciones de resistencia, sí se observó una tendencia hacia una correlación negativa, lo que significa que a mayor número de mutaciones hay un decremento en la carga viral y un aumento en el número de linfocitos CD4+. Este resultado es corroborado por otros estudios y se explica como una reducción en la citopatogenicidad del virus mutante⁶⁶.

Grupo con tratamiento

La prevalencia de mutaciones de resistencia encontrada en las personas tratadas fue de 87.4%; mayor a la reportada para Estados Unidos, Canadá⁸⁰, India⁸¹, Chile⁷¹ y países europeos, y más cercana a la observada en países africanos de 85.7%⁹³. No fue posible hacer una comparación con otros estudios, debido a que no existen publicaciones científicas sobre

mutaciones de resistencia en individuos tratados de nuestro país.

Con respecto a las mutaciones mayores de la proteasa, es interesante notar que la mutación más común en la población tratada: L90M con dieciocho por ciento de prevalencia, se ha reportado en la literatura como la más frecuente para los subtipos C, F, G, y FRC01_AE, mientras que la mutación descrita como la más prevalente para el subtipo B, D30N, solo estuvo representada con el dos por ciento del total de la muestra. En el caso de las mutaciones menores de la proteasa, las mutaciones más frecuentes, A71V y L10I concuerdan con lo reportado en la literatura para el subtipo B, aunque también hay una importante prevalencia de la mutación M36I, K20I y L33F que son mutaciones frecuentes para los subtipos A y FRC01_AE. En menor grado, se presentaron también las mutaciones T74S y V82I que se relacionan con los subtipos C y G respectivamente⁹¹.

En relación a las mutaciones de la transcriptasa reversa asociadas con resistencia a los ITRAN, nuestra población se ubicó en el patrón de resistencia I, que incluye a las mutaciones M41L, L210W y T215Y. La literatura cita la mutación M184V como la más prevalente; en nuestro estudio, ésta se encuentra en cuarto lugar con el 23.7% de la población afectada.

La mutación más frecuente fue la T215Y, que prevaleció en más de un tercio de la población estudiada; ésta mutación es la más frecuentemente reportada en los casos de resistencia antirretroviral transmitida⁶⁵. Se encontró también la mutación T215F en el seis por ciento de los individuos, esta mutación es una reversión sencilla y se presenta en pacientes que no se

encuentran bajo una presión farmacológica, por lo que se puede inferir que quienes presentaron esta mutación fueron infectados con una cepa mutante en T215Y o en algún momento estuvieron expuestos a un fármaco selectivo como el AZT y se realizó un cambio de tratamiento, lo que propició que en ausencia de la presión selectiva del medicamento, el virus aumentara su estado adaptativo al colocarse en un fase intermedia entre la cepa mutante y la cepa silvestre⁶⁵.

En el caso de las mutaciones en la transcriptasa reversa asociadas con los ITRANN se encontró que las tres más prevalentes pertenecen al complejo de resistencias primarias, las cuales causan una resistencia directa a todos los ARV sin asociarse con otras mutaciones.

Grupo *naïve* al tratamiento

Para este grupo, nuestros resultados revelaron una resistencia del dieciocho por ciento, esta prevalencia es similar a la reportada en el Reino Unido (19.2%)⁹⁶, menor a la observada en ciudades grandes de los Estados Unidos (25%)⁷⁶ y Río de Janeiro en Brasil⁷³; sin embargo, fue superior, de manera significativa, a la reportada en otros países de América Latina^{71,72}.

La resistencia fue superior al promedio esperado para México, este resultado puede deberse a diferentes factores. El primero es la localización geográfica de la población analizada; estudios al respecto han demostrado que existen diferencias significativas en la prevalencia de mutaciones transmitidas y desarrolladas dependiendo del sitio en donde se realiza el estudio, presentándose la mayor prevalencia en las grandes ciudades, esto

debido principalmente, a que en las ciudades se concentra un mayor número de personas VIH positivas, se tiene acceso más fácilmente al tratamiento antirretroviral y existe un flujo migratorio superior, razones que aumentan la diversidad viral^{70,71,72,73}. La fecha de toma de muestra así como del análisis e interpretación de resistencia son también factores importantes, ya que se ha reportado en la literatura diferencia en la ocurrencia de mutaciones debido al aumento o disminución en el número de personas bajo tratamiento antirretroviral o a migraciones masivas en un corto periodo de tiempo⁹⁴. Otra situación que puede influir en los resultados es la selección de la muestra, ya que en países de escasos recursos, los análisis de resistencia solo se llevan a cabo en personas que han tenido falla al tratamiento, por lo que es de esperarse, tengan un mayor número de mutaciones que aquellas que no han experimentado la falla⁹⁵.

Al igual que en los pacientes con tratamiento, la mutación más frecuente en las personas *naïve* fue la L90M, la cual provoca una resistencia a todos los IP. En el caso de las mutaciones menores, la literatura reporta una prevalencia entre el 5%-10% para A71T, A71V y L10I, en nuestro estudio, la prevalencia fue mayor, con 15.3%, 12.2% y 8.2% respectivamente. Para las mutaciones no asociadas con resistencia, se observó la reversión K70R con una frecuencia del 8.2%, lo que demuestra la resistencia antirretroviral transmitida; con el 3.1% se encontró la mutación V82I asociada con el subtipo G, lo que refuerza estudios recientes en los que se ha detectado la Forma Recombinante Intersubtipo BG en México⁹⁷.

Entre las mutaciones de la transcriptasa reversa asociadas con los

ITRAN se identificó la mutación revertante T215C en el 1% de la población. Para las mutaciones asociadas con los ITRANN, se encontró una mutación primaria de resistencia, K103N que sugiere que al menos 4 de cada 100 individuos serán resistentes al tratamiento con IT.

El hecho de que la prevalencia presentada en nuestra población sea más alta que la observada en países con un largo historial de tratamiento antirretroviral sugiere fallas en el sistema de salud pública y un mal manejo de los pacientes, por lo que será de vital importancia, ahora que el Gobierno de México ha decretado acceso universal al tratamiento ARV para las personas que viven con VIH/SIDA, que se establezcan medidas preventivas para evitar el aumento incontrolado de la resistencia. Para esto será necesario que se lleven a cabo pruebas de resistencia de manera rutinaria para favorecer el correcto uso de los fármacos, ya que está demostrado que una detección oportuna de la resistencia es una inversión en salud y tiene un impacto socio-económico sobre el país.

10. CONCLUSIONES

10. CONCLUSIONES

Existen diferencias estadísticamente significativas en la prevalencia de resistencia y número de mutaciones entre los individuos *naïve* y con tratamiento previo, dónde ambos parámetros son superiores al promedio esperado.

La prevalencia de resistencia a los antirretrovirales inhibidores de la proteasa y de la transcriptasa reversa análogos y no análogos de los nucleótidos en pacientes *naïve* y con tratamiento fue superior a la observada en países con largo historial de tratamiento así como en países con reciente incorporación de la terapia antirretroviral.

Los inhibidores de la transcriptasa reversa presentaron la mayor resistencia en todos los grupos estudiados, de éstos, los no análogos de los nucleótidos mostraron la menor susceptibilidad, seguidos de los análogos de los nucleótidos y de los inhibidores de la proteasa.

Se observó evidencia de mutaciones revertantes en los pacientes *naïve*, lo que confirma la resistencia antirretroviral transmitida en este grupo.

No se observó una correlación significativa entre la frecuencia de mutaciones, la carga viral y el número de linfocitos CD4+.

No existen diferencias estadísticamente significativas en el número de mutaciones y resistencia a los antirretrovirales entre los individuos de las regiones Centro y Occidente de México y por el momento es posible utilizar los mismos esquemas de tratamiento en ambas regiones.

11. PERSPECTIVAS

11. PERSPECTIVAS

Aunque estos datos son representativos de un estudio exploratorio en una muestra de la población, para establecer los patrones de resistencia de nuestra región será necesario aumentar el tamaño de muestra y secuenciar algunos otros sitios del genoma viral para probar la resistencia a los inhibidores de la integrasa, inhibidores de fusión e inhibidores de entrada, los cuales no fueron tomados en cuenta en este estudio debido a que no forman parte del tratamiento inicial contra el VIH/SIDA, a que su uso no es generalizado en nuestro país y a que su análisis implica altos costos de realización.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Centers for Disease Control and Prevention. (1981-06-05) Pneumocystis Pneumonia - Los Angeles. Morbidity and Mortality Weekly Report. 1981; 30: 250-2.
2. Centers for Disease Control and Prevention. (1981-07-04) Kaposi's Sarcoma and Pneumocystis Pneumonia Among Homosexual Men - New York City and California . Morbidity and Mortality Weekly Report. 1981; 30: 305-8.
3. Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Montagnier L, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science. 1983; 220:868-71.
4. Gallo RC, Sarin PS, Gelmann EP, Robert-Guroff M, Richardson E, Kalyanaraman VS, et al. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science. 1983; 220:865-7.
5. Biberfeld G, Brown F, Esparza J, Essex M, Gallo RC, Montagnier L, et al. WHO Working Group on Characterization of HIV-Related Retroviruses: Criteria for characterization and proposal for a nomenclature system. AIDS 1987; 1: 189-190.
6. Hanh B, Shaw G, De Cock KM y Sharp P M. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. Science. 2000; 287:607-14.

7. Sharp P, Bailes E, Chaudhuri R, Rodenburg C, Santiago M, Hanh B. The origins of acquired immune deficiency syndrome viruses: where and when?. *Phil. Trans. R. Soc. Land. B.* 2001; 356:867-76.
8. Yusim K, Peeters M, Pybus OG, Bhattacharya T, Delaporte E, Mulanga C, et al. Using human immunodeficiency virus type 1 sequences to infer historical features of the acquired immune deficiency syndrome epidemic and human immunodeficiency virus evolution. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2001; 356:855-66.
9. Korber B, Muldoon M, Theiler J. Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. *Science* 2000; 288:1789-96.
10. Salemi M, Strimmer K, Hall W. Dating the common ancestor of SIVcpz and HIV group M and the origins of HIV-1 subtypes using a new method to uncover clock-like molecular evolution. *FASEB J.* 2001; 15: 276-78
11. Hills DM. Origins of HIV. *Science.* 2000; 288:1757-59.
12. Arien K, Vanham G, Arts EJ. Is HIV-1 evolving to a less virulent form in humans?. *Nature Rev Microb.* 2007; 5:141-51.
13. Papathanasopoulos MA, Hunt GM y Tiemessen CT. Evolution and diversity of HIV-1 in Africa – a Review. *Virus genes.* 2003; 26:151-63.
14. Van Heuverswyn F, Peeters M. The Origins of HIV and Implications for the Global Epidemic. *Curr Infect Dis Rep.* 2007; 9:338–46.
15. Peeters M. The genetic variability of HIV-1 and its implications. *Transfus Clin Biol.* 2001; 8:222-5.

16. Yirell DL, Shaw L, Campbell E, Burns SM, Cameron SO, Goldberg D. HIV subtypes in Scotland, 2000-2006. *Epidemiol Infect.* 2008; 136:1069-75.
17. Lal RB, Chakrabarti S, Yang C. Impact of genetic diversity of HIV-1 on diagnosis, antiretroviral therapy & vaccine development. *Indian J Med Res.* 2005;121:287-314
18. UNAIDS/WHO. AIDS Epidemic Update 2008. Disponible en <http://www.unaids.org/en/HIVdata/epi2008>. Acceso: 18 de julio de 2008.
19. Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA y Organización Mundial de la Salud. Situación de la Epidemia de SIDA, diciembre de 2007. Disponible en <http://www.unaids.org>. Acceso: 28 de junio de 2008.
20. Centro Nacional para la Prevención y Control del VIH/SIDA. El sida en cifras 2007. Disponible en <http://www.salud.gob.mx/conasida>. Acceso: 28 de junio de 2008.
21. Sierra S, Kupfer B, Kaiser R. Basics of the virology of HIV-1 and its replication. *Journal of Clinical Virology.* 2005; 34:233-44
22. Leitner T, Folry B, Hahn B, Marx P, McCutchan F, Mellor J, Wolinsky S y Korber B, editores. HIV Sequence Compendium 2003. Estados Unidos de América: Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory; 2004. p. iv-viii
23. Levy J. HIV and the pathogenesis of AIDS. Second Edition. ASM Press. San Francisco, California, USA. 1998.

24. Clapham PR, McKnight A. Cell surface receptors, virus entry and tropism of primate lentiviruses. *J Gen Virol.* 2002; 83:1809–29.
25. Weiss RA. Cellular receptors and viral glycoproteins involved in retrovirus entry. In: Levy JA, editor. *The retroviridae*. New York: Plenum Press; 1993. p. 1–108.
26. Doms RW, Moore JP. HIV-1 membrane fusion: targets of opportunity. *J Cell Biol.* 2000; 151:9–14.
27. Nisole S, Saïb A. Early steps of retrovirus replicative cycle. *Retrovirology* 2004; 1: 9- 28.
28. Zack JA, Arrigo SJ, Weitsman SR, Go AS, Haislip A, Chen ISY. HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes: molecular analysis reveals a labile, latent viral structure. *Cell.* 1990; 61:213-22.
29. Jordan A, Defechereux P, Verdin E. The site of HIV-1 integration in the human genome determines basal transcriptional activity and response to Tat transactivation. *EMBO J.* 2001; 20:1726–38.
30. Pollard VW, Malim MH. The HIV-1 Rev protein. *Annu Rev Microbiol.* 1998; 52:491–532.
31. Briggs JA, Wilk T, Welker R, Krausslich HG, Fuller SD. Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores. *Embo J.* 2003; 22:1707–15.
32. Zimmerman C, Klein KC, Kiser PK, Singh AR, Firestein BL, Riba SC, et al. Identification of a host protein essential for assembly of immature HIV-1 capsids. *Nature.* 2002; 415:88–92.

33. Freed EO, Mouland AJ. The cell biology of HIV-1 and other retroviruses. *Retrovirology*. 2006; 3:77.
34. French R, Stewart G, Penny R, Levy J. How HIV produces immunodeficiency. *MJA*. 1996; 164: 166-170.
35. Martin LS, Cougar S, Loskoski SL. Disinfection and inactivation of HTLV-III. *J Infect Dis*. 1985; 152: 400-03.
36. Mastro TD, Kitaya D. HIV Type 1 Transmission probabilities: estimates from epidemiological studies. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1988; 14: 223 -27.
37. Barclay, L. Noncoital sexual activity may not be "safe" sex. *Obstet Gynecol*. 2008; 112:735-738.
38. Organización mundial de la salud. Manual de capacitación en el manejo integral de personas adultas que viven con VIH/SIDA para equipos de atención primaria y comunitaria en Latinoamérica y el Caribe. 2004.
39. Mocroft A, Ledergerber B, Katlama C. Decline in the AIDS and death rates in the Euro SIDA study: an observational study. *Lancet*. 2003; 362:22-29.
40. Palella FJ, Delaney KM, Moorman AC. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med*. 1998; 338:853-60.
41. Hammer SM. Management of newly diagnosed HIV infection. *N Engl J Med*. 2005; 353:1701-10.

42. Kakuda TN, Struble KA, Pisticelli SC. Protease inhibitors for the treatment of human immunodeficiency virus infection. *Am J Health-Syst Pharm.* 1998; 55: 233-54.
43. Loveday C. Nucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance. *JAIDS.* 2001; 26: 10-24.
44. Waters L, John L, Nelson M. non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors: a review. *Int J Clin Pract.* 2007; 61:105-18.
45. Pommier Y, Johnson AA, Marchand C. Integrase inhibitors to treat HIV/AIDS. *Nat Rev Drug Discov.* 2005; 4:236-48.
46. Castagna A, Biswas P, Beretta A, Lazzarin A. The appealing story of HIV entry inhibitors: from discovery of biological mechanisms to drug development. *Drugs.* 2005; 65:879-904.
47. Kilby, M., Eron, J. Novel Therapies Based on Mechanisms of HIV-1 Cell Entry. *N Engl J Med.* 2003; 348: 2228-38.
48. Shaneen F, Ronald C. Co-receptor antagonists as HIV-1 entry inhibitors. *Curr Opin Infect Dis.* 2004; 17:7-16.
49. Idemiyor C. Human immunodeficiency virus (HIV) entry inhibitors (CCR5 specific blockers) in development: are they the next novel therapies?. *HIV Clin Trials.* 2005; 6:272-77.
50. Savarino A. A historical sketch of the discovery and development of HIV-1 integrase inhibitors. *Expert Opin Investig Drugs.* 2006; 15:1507-22.
51. Pace P, Rowley M. Integrase inhibitors for the treatment of HIV infection. *Curr Opin in Drug Disc & Devel.* 2008; 11:471-79.

52. Steigbigel RT, Cooper DA, Kumar PN, Eron JE, Schechter M, Markowitz M, et al. Raltegravir with Optimized Background therapy for Resistant HIV-1 Infection. *N Engl J Med.* 2008; 359:339-54.
53. U. S. Food and Drug Administration. US Department of Health and Human Services. Drugs used in the treatment of HIV infection. Disponible en www.fda.gov/oashi/aids/virals.html. Acceso: 30 de Julio de 2008.
54. U. S. Food and Drug Administration. US Department of Health and Human Services. Guidance for Industry. Role of HIV resistance testing in Antirretroviral Drug Development. Disponible en www.fda.gov/eder/guidance/index.htm. Acceso: 18 de Agosto de 2008.
55. Hanna GJ, Caliendo AM. Testing for HIV-1 Drug Resistance. *Mol Diagn.* 2001; 6:253-63.
56. Douglas DR. Benefits and limitations of testing for resistance to HIV drugs. *J Antimicrob Chemother.* 2004; 53: 555–57.
57. Clavel F, Hance AJ. Medical progress: HIV drug resistance. *N Engl J Med.* 2004; 350:1023–35.
58. Wesing A., Boucher, C. Worldwide Transmission of Drug-resistant HIV. *AIDS Rev.* 2003; 5:140-55.
59. Cunningham P., Smith D., Satchell C., Cooper D., Brew B. Evidence for independent development of resistance to HIV-1 reverse transcriptase inhibitors in the cerebrospinal fluid. *AIDS.* 2000; 14:1949-54.
60. Haddad D., Birch C., Middleton T., Dwyer D., Cunningham A., Saksena N. Evidence for late stage compartmentalization of HIV-1 resistance

- mutations between lymph node and peripheral blood mononuclear cells. *AIDS*. 2000; 14:2273-81.
61. Saag MS. HIV resistance testing in clinical practice: A QALY-fied success. *Ann Intern Med*. 2001; 134: 475-77.
62. Boucher C., O'Sullivan E., Mulder J. Ordered appearance of zidovudine resistance mutation during treatment of 18 HIV-positive subjects. *J Infect Dis*. 1992; 165:105-10.
63. Kuritzkes DR. Preventing and managing antiretroviral drug resistance. *AIDS Patient Care STDs*. 2004; 18:259-73.
64. Liuzzi G. Genotypic resistance test for the management of the patients failing highly active antiretroviral therapy: the resistance pattern in different biological compartments. *Scand J Infect Dis*. 2003; 35: 90-93.
65. Shafer RW, Schapiro JM. HIV-1 Drug Resistance Mutations: an Updated Framework for the Second Decade of HAART. *AIDS Rev*. 2008; 10:67-84.
66. Booth CL, Geretti AM. Prevalence and determinants of transmitted antiretroviral drug resistance in HIV-1 infection. *J Antimicrob Chemother*. 2007; 59:1047-56.
67. Van de Vijver DA, Wensing AM, Angarano G, Asjö B, Balotta E, Boucher CA, et al. The calculated genetic barrier for antiretroviral drug resistance substitutions is largely similar for different HIV-1 subtypes. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2006; 41:352-60.

68. Brooks JI, Pilon RG, Merks HW. Regional variation in HIV strain and drug resistance: the Canadian experience with a national surveillance program. *Antivir Ther.* 2006; 11:111-19.
69. Ross LL, Florance A, Wine B et al. Prevalence of HIV-1 drug resistance-associated mutations in a large cohort of antiretroviral therapy ART naïve HIV-infected individuals in the United States from 200-2004. *Antivir Ther.* 2006; 11:120-31.
70. Smith D, Moini M, Pesano R. Clinical utility of HIV standard genotyping among antiretroviral- naïve individuals with unknown duration of infection. *Clin Infect Dis.* 2007; 44:456-58.
71. Ríos M, Delgado E, Pérez-Alvarez L, Fernández J, Gálvez P, de Parga EV, Yung V, et al. Antiretroviral drug resistance and phylogenetic diversity of HIV-1 in Chile. *J Med Virol.* 2007; 79:647-56.
72. Lama JR, Sanchez J, Suarez L et al. Linking HIV and antiretroviral drug resistance surveillance in Peru: a model for a third-generation HIV sentinel surveillance. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2006; 42:501-5.
73. Rodriguez R, Scherer LC, Oliveira CM. Low prevalence of primary antiretroviral resistance mutations and predominance of HIV-1 clade C at the polymerase gene in newly diagnosed individuals from south Brazil. *Virus Res* 2006; 116:201-7.
74. Maia Teixeira SL, Bastos F, Hacker MA et al. Trends in drug resistance mutations in antiretroviral-naïve intravenous drug users of Rio de Janeiro. *J Med Virol.* 2006; 78:764-69.

75. Valle-Bahena OM, Ramos-Jiménez J, Ortiz-López R, Revol A, Lugo-Trampe A, Barrera-Saldaña HA, Rojas-Martínez A. Frequency of protease and reverse transcriptase drug resistance mutations in naïve HIV-infected patients. *Arch Med Res.* 2006;37:1022-7.
76. Bertagnolio S, Soto-Ramírez L, Pilon R, Rodríguez R, Viveros M, Fuentes L, et al. HIV-1 drug resistance surveillance using dried whole blood spots. *Antivir Ther.* 2007; 12:107-13.
77. Soto-Ramírez LE, Rodríguez-Díaz R, Durán AS, Losso MH, Salomón H, Gómez-Carrillo M, et al; NISDI Perinatal Study Group. Antiretroviral resistance among HIV type 1-infected women first exposed to antiretrovirals during pregnancy: plasma versus PBMCs. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2008; 24:797-804.
78. Espinosa E, Ormsby CE, Peña-Jimenez A, Cantoral M.-T, Peralta A Prado, Reyes-Teran G. Predictive value of stage-specific risk factors for immune reconstitution inflammatory syndrome. XVII International AIDS Conference, Abstract THPE0181. México 2008.
79. Escoto-Delgadillo M, Vázquez-Valls E, Ramírez-Rodríguez M, Corona-Nakamura A, Amaya-Tapia G, Quintero-Pérez N, et al. Drug-resistance mutations in antiretroviral-naive patients with established HIV-1 infection in Mexico. *HIV Med.* 2005; 6:403–9.
80. Richman DD, Bozzette S, Morton S. The prevalence of antiretroviral drug resistance in the US. Program and abstracts of the 41st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, December 16–19, 2001, Chicago, IL, abstract LB-17.

81. Sen S, Tripathy SP, Patil AA, Chimanpure VM, Paranjape RS. High Prevalence of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Drug Resistance Mutations in Antiretroviral Treatment-Experienced Patients from Pune, India. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 2007; 23:1303-8.
82. Heungsup Sung, You S. Jung, Moon W. Kang, In G. Bae, Hyun-Ha Chang, Jun H. Woo, Young K. Cho. High Frequency of Drug Resistance Mutations in Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Korean Patients Treated with HAART. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 2007: 1223-29.
83. Kuritzkes DR. Preventing and managing antiretroviral drug resistance. *AIDS Patient Care STDs*. 2004; 18: 259–73.
84. Strategies for Management of Antiretroviral Therapy (SMART) Study Group, Emery S, Neuhaus JA, Phillips AN, Babiker A, Cohen CJ, Gatell JM, et al. Major clinical outcomes in antiretroviral therapy (ART)-naive participants and in those not receiving ART at baseline in the SMART study. *J Infect Dis*. 2008; 197:1133-44.
85. The body. A guide to HIV drug resistance 2008. Disponible en www.thebody.com. Acceso: 30 de julio de 2008.
86. Clotet B, Vandamme AM, Tural C, Moreno S, Gatell JM, Ruiz L. Implicaciones terapéuticas de los test de resistencia: su utilidad en la elección del régimen inicial y en el cambio de tratamiento. In: Clotet B, Menéndez-Arias L, Ruiz L, Tural C, Brun-Vecinet F, Loveday C et al editores. Guía para el manejo de las resistencias en la infección por el

- VIH y de la farmacocinética de los antirretrovirales. 2a ed. Barcelona:Editorial Taisa, S.L.; 2002. p.19-36
87. Petropoulos CJ, Parkin NT, Limoli KL, Lie YS, Wrin T, Huang W, et al. A novel phenotypic drug susceptibility assay for human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44:920–28.
88. Krowicka H, Robinson J E, Clark R , Hager S , Broyles S , Pincus SH. Use of Tissue Culture Cell Lines to Evaluate HIV Antiviral Resistance. *AIDS Research and Human Retroviruses.* 2008, 24: 957-67.
89. Aceti A. Genotypic resistance test in the management of the HIV-infected patient at virological failure. *Scand J Infect Dis.* 2003; 35: 61-104.
90. The EuroGuidelines Group for HIV Resistance. Clinical and laboratory guidelines for the use of HIV-1 drug resistance testing as part of treatment management: recommendations for the European setting. *AIDS* 2001; 15: 309–20.
91. Stanford University. HIV Drug Resistance Database 2008. Disponible en <http://hivdb.stanford.edu>. Acceso: 1-30 de Julio de 2008.
92. Statistical Package for the Social Sciences. SPSS Inc. Chicago III.
93. Tebit DM, Sangaré L, Makamtse A, Yameogo S, Somlare H, Bado G, et al. HIV drug resistance pattern among HAART-exposed patients with suboptimal virological response in Ouagadougou, Burkina Faso. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2008; 49:17-25.
94. Shet A, Berry L, Mohr H. Tracking the prevalence of transmitted antiretroviral drug-resistant HIV-1: a decade of experience. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2006; 41: 439-46.

95. De Mendoza C, Rodriguez C, Eiros JM. Antiretroviral recommendations may influence the rate of transmission of drug-resistant HIV type 1. *Clin Infect Dis*. 2005; 41:227-32.
96. Booth C, García-Díaz A, Youle M, Johnson M, Phillips A, Geretti AM. Prevalence and predictors of antiretroviral drug resistance in newly diagnosed HIV-1 infection. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59:517–24.
97. Vázquez-Valls E, Escoto-Delgadillo M, Gómez-Flores-Ramos L, Vázquez-Torres BM, Torres-Mendoza BM. Antiretroviral drug resistance and intersubtype recombinants diversity of HIV-1 in Mexico. XVII International AIDS Conference, Abstract WEPE0024. México 2008.

REFERENCIAS DE FIGURAS

- I. Hills DM. Origins of HIV. Science. 2000; 288:1757-59.
- II. Sharp P, Bailes E, Chaudhuri R, Rodenburg C, Santiago M, Hanh B. The origins of acquired immune deficiency syndrome viruses: where and when?. Phil. Trans. R. Soc. Land. B. 2001; 356:867-76.
- III. Arien K, Vanham G, Arts EJ. Is HIV-1 evolving to a less virulent form in humans?. Nature Rev Microb. 2007; 5:141-51.
- IV. UNAIDS/WHO. AIDS Epidemic Update 2008. Disponible en http://www.unaids.org/en/HIV_data/epi2008. Acceso: 18 de julio de 2008.
- V. The body. A guide to HIV drug resistance 2008. Disponible en www.thebody.com. Acceso: 30 de julio de 2008.
- VI. Stanford University. Disponible en <http://hivdb.stanford.edu/cgi-bin/mutPrevBySubtypeRx.cgi>. Acceso: 12 de septiembre de 2008.
- VII. Embo Journal. Disponible en <http://www.nature.com/embor/journal/> Acceso: 15 de septiembre de 2008.
- VIII. Farmacología médica. Disponible en <http://medicin.unmsm.edu.pe>. Acceso: 10 de Agosto de 2008
- IX. International AIDS Society. Disponible en www.iasociety.org. Acceso: 24 de julio de 2008.

13. ABREVIATURAS

13. ABREVIATURAS.

ADN. Ácido desoxirribonucleico

Aminoácidos (código)

A	Alanina
C	Cisteína
D	Ácido Aspártico
E	Ácido glutámico
F	Fenilalanina
G	Glicina
H	Histidina
I	Isoleucina
K	Lisina
L	Leucina
M	Metionina
N	Asparagina
P	Prolina
Q	Glutamina
R	Arginina
S	Serina
T	Treonina
V	Valina
W	Triptofano
Y	Tirosina

ARN. Ácido ribonucleico

ARV. Antirretroviral

CV. Carga viral

gp. Glucoproteína

IE. Inhibidor de entrada

IF. Inhibidor de fusión

IN. Inhibidor de integrasa

IP. Inhibidor de proteasa

ITRAN. Inhibidor de la Transcriptasa Reversa Análogo de los Nucleósidos

ITRANN. Inhibidor de la Transcriptasa Reversa No-análogo de los Nucleósidos

kb. Kilobase.

nm. Nanómetro

PCR. Reacción en Cadena de la Polimerasa

SIDA. Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida

TAMs. Mutaciones Análogas de la Timidina

TARAA. Terapia Antirretroviral Altamente Activa

TR. Transcriptasa Reversa

VIH. Virus de la Inmunodeficiencia Humana

VIS. Virus de la Inmunodeficiencia en Simios

LCD4+. Linfocito que expresa el cúmulo de diferenciación o coreceptor de superficie CD4

14. GLOSARIO

14. GLOSARIO.

Ácido Desoxirribonucleico (ADN). Cadena de nucleótidos que se forma al unirse el azúcar desoxirribosa y una de cuatro bases nitrogenadas: adenina, timina, citosina y guanina a través de un enlace fosfodiéster.

Ácido Ribonucleico (ARN). Cadena sencilla de nucleótidos unidos a un azúcar ribosa. Cuatro bases nitrogenadas en las que la timina es sustituida por el uracilo.

ADN polimerasa. Enzima que cataliza la síntesis de ADN a partir de desoxirribonucleótidos y una molécula de ADN molde.

Aminoácidos. Son los monómeros de las proteínas. Se unen mediante un enlace peptídico para formar un polipéptido, que al superar 50 aminoácidos será llamado proteína.

Antirretroviral. Sustancia que bloquea o suprime la actividad de un retrovirus.

Barrera genética. Es el número de mutaciones necesarias para reducir la actividad antiviral de un fármaco.

Carga viral. Medición de la cantidad de virus presente en una muestra.

Cebadores o iniciadores. Es una secuencia corta de ácido nucleico que contiene un grupo 3'hidroxilo libre que forma pares de bases con una hebra molde complementaria y actúa como punto de inicio para la adición de nucleótidos con del fin de copiar la hebra molde.

Cepa. Variante viral caracterizada por un genotipo específico.

Codón. Secuencia de tres nucleótidos del ARNm que codifica para un aminoácido

Cuasiespecies. Diferentes variantes que se generan a partir de una cepa inicial del virus.

Gen. Unidad de información genética. Cada gen es una secuencia de ácidos nucleicos que llevan la información para un polipéptido determinado.

Genotipo. Conjunto de genes.

Fenotipo. Características resultantes de la expresión de los genes.

Mutación. Alteración en la secuencia de nucleótidos de un gen.

Mutación mayor o primaria. Mutación que afecta directamente la sensibilidad al antirretroviral.

Mutación menor o secundaria. Mutación que incrementa la resistencia mejorando la capacidad de replicación de los virus que tienen una mutación primaria.

Naïve. Persona que no ha recibido tratamiento farmacológico con antirretrovirales.

Nucleósido. Combinación de un azúcar pentosa con una base nitrogenada púrica o pirimidínica.

Nucleótido. Moléculas orgánicas formadas por la unión covalente de un monosacárido de cinco carbonos pentosa, una base nitrogenada y un grupo fosfato.

PCR (Polymerase Chain Reaction). Técnica de biología molecular que mediante desnaturalizaciones repetitivas y renaturalizaciones del ADN en presencia de la enzima ADN polimerasa y oligonucleótidos sintéticos complementarios, permite replicar de manera cíclica y exponencial un fragmento de ADN.

Pruebas de resistencia genotípica. Prueba dirigida a determinar la secuencia de nucleótidos del genoma viral para identificar mutaciones que estén relacionadas con resistencia.

Prueba de resistencia fenotípica. Prueba dirigida a determinar la susceptibilidad del virus a un fármaco mediante el cultivo de la cepa viral.

Provirus. Genoma viral integrado al ADN de la célula de la hospedera.

Resistencia. Pérdida de la susceptibilidad a los efectos de uno o más fármacos ARV.

Resistencia genotípica. Mutaciones en el genoma viral que provocan una reducción de la sensibilidad a uno o más fármacos.

Resistencia fenotípica. Capacidad de un virus de replicarse en presencia de una concentración de fármaco superior a la que es capaz de inhibir la replicación viral de una cepa silvestre de referencia.

RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction). Técnica de biología molecular en la que un fragmento definido de ARN es amplificado. La hebra de ARN es primero transcrita en ADN complementario, para después seguir con la amplificación de ese ADN por PCR.

Secuencia consenso. Secuencia en la que constan las bases mas frecuentes encontradas en distintas secuencias comparadas.

Susceptibilidad. Grado de inhibición de la replicación de un virus por un fármaco.

Virus mutante. Variante genética menos frecuente en una población natural.

Virus silvestre. Variante viral con la constitución genética más frecuente en una población natural.

15. ANEXOS

15. ANEXOS

ANEXO 1.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

TITULO DEL ESTUDIO: "Evaluación de la resistencia del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) a los antirretrovirales a partir del análisis genómico de las regiones de la proteasa y retrotranscriptasa en individuos del Centro y Occidente de México"

NO. DE PROTOCOLO IMSS: 992490034

NO. DE PROTOCOLO SECRETARÍA DE SALUD: 28/2000

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Dr. Eduardo Vázquez Valls, Centro de Investigación Biomédica de Occidente, I. M. S. S. Jalisco.

INTRODUCCIÓN:

Usted ha sido invitado a participar en un estudio de investigación. Usted necesita decidir si desea participar o no. Por favor, tome su tiempo para tomar la decisión. Sírvase leerlo cuidadosamente y siéntase libre de preguntar al médico del estudio acerca de la información que se proporcionará más adelante. Este estudio es patrocinado por el IMSS, COESIDA Jal. Merck & Co. y FUNSALUD Cap. Jal. A. C.

¿Por qué se lleva a cabo este estudio?

El propósito de este estudio, es identificar mutaciones del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) que inducen resistencia a los medicamentos utilizados en pacientes infectados por este virus y su forma de transmisión en pacientes naïve a tratamiento antirretroviral con el objeto de establecer un banco de datos de resistencia en la región. Merck Sharp and Dohme de México no proporcionará ningún medicamento y solo dará apoyo exclusivamente para la realización de las pruebas genéticas de laboratorio.

¿Quién no debe participar en este estudio?

Si usted está incluido en alguno de los puntos siguientes, no deberá participar en el estudio:

- Ser menor de 18 años o mayor de 60 años de edad.
- Tener menos de 18 meses de estar recibiendo tratamiento con antirretrovirales.

¿Qué se me solicitará que haga y cuáles son los requisitos que debo cumplir?

El médico del estudio o su equipo, le harán una historia clínica completa al inicio. Se asignará en forma indistinta y ciega hacia alguno de los cuatro grupos que incluyen 2 grupos de utilizarán además de los marcadores subrogados (carga viral del VIH-1 y cuenta de linfocitos CD4/CD8), el criterio de GART (Pruebas de Genotipificación de Resistencia a los Antirretrovirales) en la decisión del tratamiento a seguir; los otros 2 grupos, únicamente se establecerá el tratamiento en función de los resultados de los marcadores subrogados con que actualmente se cuenta en la institución que le están atendiendo. Será necesario que acepte firmar esta carta y tomarle aproximadamente 15 ml de sangre, (durante éste el procedimiento, es probable que al momento de la extracción de la muestra de sangre, quede un

pequeño moretón en el lugar de la punción), la preservación de la misma y de sus subproductos por tiempo indefinido y se realicen las pruebas de laboratorio para la obtención de DNA y RNA, identificación de segmentos genómicos y anticuerpos contra el Virus de la Inmunodeficiencia Humana.

¿Qué se sabe de estas pruebas?

Que son útiles y un apoyo para definir el tratamiento a elegir en el control del VIH y sus complicaciones. Los resultados de estas pruebas de laboratorio pueden proporcionar al médico tratante información valiosa para decidir su tratamiento.

¿Cuánto tiempo estaré en el estudio?

Usted estará en el estudio por un lapso aproximado de 18 meses.

¿Cuántas personas participarán en el estudio?

40 personas participarán en este estudio.

¿Qué eventos adversos (malos) me pueden suceder por participar en el estudio?

Es necesario que se le tomen muestras de sangre para realizar pruebas de laboratorio. Los posibles efectos adversos de este procedimiento son: desmayo (no es frecuente), inflamación de la vena, dolor, moretones o sangrado en el lugar donde se hace la punción. Existe también la ligera posibilidad de que aparezca una infección en el sitio de la punción.

Si sufro un efecto adverso. ¿Quién pagará los gastos del hospital y los honorarios del médico?

Si durante el curso del estudio, usted sufre cualquier experiencia adversa de las ya mencionadas, se le brindará atención especializada en el IMSS si es derechohabiente, o en el hospital del Sector Salud, donde le hubiesen invitado y usted haya aceptado participar en el estudio. No existe ninguna otra forma de compensación.

¿Qué beneficio puedo esperar?

Usted no recibirá ningún beneficio, pero seguirá recibiendo el mismo medicamento si Usted decide no participar en el estudio.

¿Quién tendrá Acceso: a mi registro y sabrá que estoy en el estudio?

A menos que se requiera por la ley, sólo el investigador principal, Merck Sharp and Dohme de México, Merck & Co., Inc., COESIDA, Jal., FUNDSALUD, Cap. Jal., Secretaría de Salud y las agencias mundiales gubernamentales regulatorias tendrán Acceso: a los datos confidenciales que lo identifican a usted por nombre. Usted no será identificado en ningún reporte o publicación que resulte de este estudio.

¿A quién puedo llamar si quiero formular alguna pregunta?

El investigador ó la persona por él designada, deben de contestar todas sus preguntas. Si surgen preguntas adicionales durante el transcurso de éste estudio, acerca de la investigación, comuníquese con el médico del estudio:

Dr. Eduardo Vázquez Valls.

Centro de Investigación Biomédica de Occidente
CMNO; IMSS
Tel 3668-3000 Ext. 31950

Dr. José Manuel Ramírez Rodríguez

Servicio de Infectología
Hospital de Especialidades del CMNO, IMSS.
Tel. 3668-3000 Ext. 31561 y 31320

Dr. Arturo Rodríguez Toledo.

Servicio de Infectología
Hospital General de Occidente
Secretaría de Salud
Tel. 3633-4893

Dra. Martha Escoto Delgadillo

Centro de Investigación Biomédica de Occidente
CMNO, IMSS
Tel 3668-3000 Ext. 31950

O sobre sus derechos como sujeto de estudio, podrá formularlos al Comité de Ética e Investigación del Hospital de Especialidades de CMNO:

Dr. Gabriel Ramírez López

Presidente del Comité de Ética,
Hospital de Especialidades del CMNO, IMSS.
Tel 3668-3000 Ext. 31338

O con:

Lic Jesús Martínez Serna

Subconsejo de Derechos Humanos del COESIDA, Jalisco
Tel. 38533724 y 8533665

¿Puedo rehusarme a participar en el estudio?

Su participación en este estudio es voluntaria. Usted se puede negar a participar ó puede discontinuar su participación en cualquier momento durante el estudio sin perjuicio o pérdida de los beneficios a los cuales usted de otra forma tiene derecho. Si usted termina su participación, usted puede recibir cuidado médico estándar y no se mostrará perjuicio hacia usted para su cuidado médico o su participación en estudios de investigación futuros.

SECCIÓN ADICIONAL

Con el fin de analizar la resistencia de los segmentos de ADN (ácido desoxirribonucleico) a los medicamentos antirretrovirales (medicamentos que actúan inhibiendo uno de los procesos de la conversión de ARN a ADN) necesitamos recolectar una muestra de su sangre para realizar este tipo de pruebas y el resultado podrá ser usado para ayudar a comprender la relación de la resistencia de los segmentos de genes, en este tipo de enfermedades. Los resultados de las pruebas serán mantenidos de manera confidencial de acuerdo a las leyes aplicables en México.

No hay beneficio directo para Usted con estas pruebas. Ninguno de los resultados de las pruebas serán dados a conocer ni a Usted ni a ningún otro médico que lo esté tratando o pueda tratarlo en el futuro. Los patrocinadores del estudio no tienen ninguna obligación de conducir pruebas adicionales o notificarle a Usted, al investigador, a su médico o a alguna tercera persona acerca de los resultados de la prueba, aún si esto pudiera beneficiarle ahora o en el futuro.

Las muestras de sangre recolectadas en el estudio, los resultados de cualquier prueba genética o cualquier secuencia genética, líneas celulares, patentes, pruebas de diagnóstico, medicamentos o productos biológicos desarrollados directa o indirectamente como resultado de este estudio, así como cualquiera información derivada directa o indirectamente de esas muestras, son propiedad única de los patrocinadores del estudio (y sus sucesores, licenciatarios y cesionarios) y pueden ser usados para propósitos comerciales. Usted no tiene derecho sobre esta propiedad ni a ninguna participación de cualquier ganancia económica que pueda ser obtenida directa o indirectamente como resultado del estudio.

Su colaboración en esta parte del estudio es opcional y enteramente voluntaria, Usted recibirá el mismo tratamiento y atención médica si decide no participar dando una muestra sanguínea para las pruebas genéticas como se ha descrito en esta sección.

He leído y comprendido esta sección

Acepto dar una muestra sanguínea bajo las condiciones descritas en esta sección

Firma del Paciente

No acepto dar una muestra sanguínea bajo las condiciones descritas en esta sección.

Firma del Paciente

He leído esta forma de consentimiento y confirmo que he sido informado sobre todos los aspectos de este estudio de investigación y he comprendido su explicación con respecto a mi participación en él.

Mis preguntas han sido respondidas y acepto voluntariamente participar en este estudio.

Firma del Paciente
Fecha

Nombre/Firma de la persona que conduce
La revisión del Consentimiento Informado

Fecha

Nombre/Firma del Investigador Principal
Fecha

Nombre del Testigo No. 1 _____
Dirección: _____
Relación que tiene con el paciente: _____

Firma del Testigo
Fecha

Nombre del Testigo No. 2 _____
Dirección: _____
Relación que tiene con el paciente: _____

Firma del Testigo
Fecha

Este consentimiento informado consta de 5 (cinco) páginas.
Recibí copia del original:

Nombre/Firma

Fecha

ANEXO 2.

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

REGIÓN OCCIDENTE PROGRAMA DE ATENCIÓN VII Fecha:		NOMBRE			
ADSCRIPCIÓN		AFILIACIÓN			
U.M.F.	Delegación	UNIDAD DE ATENCIÓN			
ENVÍO		Delegación Jalisco			
Servicio	Unidad Médica	C. Médico Nat. De Occidente- "IGT"			
		Hospital de Especialidades			
		Servicio de Infectología.			
ANTECEDENTES					
Edad	Género	Estado Civil	Ocupación		
Antecedentes Familiares					
Lugar de Residencia (años)		Residencia Previa (años)			
Toxicomanías		Combe	Inmunizaciones		
Animales Domésticos		Exposición Laboral	Exposición Recreativa		
Patologías previas o actuales		Ant. Quirúrgicos	Ant. Gineco/Obstétricos		
Hemotransfusiones		Alergias	E.T.S.		
Observaciones					
DATOS CLÍNICOS EPIDEMIOLÓGICOS					
F. de Transmisión	Sintomático	Fecha de Inicio	Fecha de Diagnóstico		
	No Sí				
Manifestaciones Clínicas					
Manifestación	Inicio (mm/aa)	Actual	Manifestación	Inicio (mm/aa)	Actual
Diarrea			Adenomegalia		
Pérdida de Peso			Alt. Neurológicas		
Fiebre					
Tos/ Disnea					

DOCUMENTO Estrictamente CONFIDENCIAL, PARA USO MÉDICO.

Complicaciones Detectadas					
Padecimiento	Fecha (mm/aa)	Dx*	Padecimiento	Fecha (mm/aa)	Dx*
Neumonia			Herpes Simple C./D.		
Tb. Pulmonar			Herpes Zoster		
Tb. Extrap. ()			Retinitis CMV		
Candidiasis Ora)			S. Demencia VIH		
Candidiasis Visceral			S. Desgaste		
Histoplasmosis disem.			S. de Kaposi		
Criptococcosis SNC			Linfoma ()		
Toxoplasmosis SNC					
Criptosporidiasis					

*Base Diagnóstica: C=clínica, M=microbiológica, T=respuesta terapéutica.

PARACLÍNICOS					
Hemoglobina	gr/dl	Glucosa	gr/dl	Albúmina	gr/dl
V.C.M.	IL	Creatinina	gr/dl	Globulina	gr/dl
Leucocitos	/uL	ALT (TGP)	U/L	Rx. PA Tórax	
Neutrófilos	% /uL	AST (TGO)	U/L	E.G.O.	
Linfocitos	% /uL	F. Alcalina	U/L		
Monocito	% /uL	D.H.L.	U/L	PPD	mm
Eosinófilos	% /uL	B. Directa	mg/dL	Ac.T. gondii	
Plaquetas	/uL	B. Indirecta	mg/dL	Ac.CMV	
		Amilasa	U/L	VDRL/FTA abs	

ELISA VIH(+)	/ /	Linfocito CD4	% /uL	Carga Viral VIH	
western blot +	/ /	Linfocito CD8	% /uL		
Clasificación VIH (OPS/OMS)				Clasificación VIH (CDC-93)	

TRATAMIENTO				
Medicamento	Dosis	Inicio	Fin	Eventos Adversos

COMENTARIOS Y RECOMENDACIONES	
Médico	(Nombre, Matrícula y Firma)

ANEXO 3.

EXTRACCIÓN DE ARN VIRAL

La extracción ARN viral se realizó con el kit comercial de extracción QIAmp ARN viral (Qiagen, Hilden, Germany) de acuerdo a las especificaciones del fabricante:

1. Añadir 560 μ L de buffer AVL en un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL
2. Agregar 140 μ L de plasma, mezclar en el vórtex por 15 segundos
3. Incubar por 10 minutos (15-25°C)
4. Agregar 560 μ L de etanol (96-100%), mezclar en el vórtex por 15 segundos
5. Pasar 630 μ L de la solución del paso 4 a un tubo con filtro, centrifugar a 8000 revoluciones por minuto (rpm) por 1.5 minutos, descartar el filtrado
6. Repetir el paso 5
7. Agregar al tubo con filtro 500 μ L de buffer AW1, centrifugar a 8000 rpm por 1.5 min., descartar el filtrado
8. Agregar 500 μ L de buffer AW2, centrifugar a 14000 rpm por 3.5 min, descartar el filtrado
9. Agregar 60 μ L de buffer AVE, incubar por 1 min y centrifugar a 8000 rpm por 1.5 min
10. Almacenar el ARN en ultracongelador a -70°C

ANEXO 4.**ANÁLISIS DE GENOTIPO (TrueGene)**

Se siguieron las instrucciones del fabricante del kit comercial de amplificación VIH-1 TruGene (Bayer HealthCare, Toronto, Ontario). Se recomienda como mínimo 1000 copias de ARN viral en plasma para la obtención de resultados bajo el siguiente protocolo:

RT-PCR

Mezcla I	Cantidad por Reacción (µL)
Oligonucleótidos RT-RCP	6
dNTP	1.5
DTT	1
Inhibidor de RNasas	0.5
Mezcla II	Cantidad por Reacción (µL)
Buffer I RT-RCP	10
Inhibidor de RNasas	1.5
Enzima TR	1
Enzima ADN polimerasa	2.5

Condiciones de amplificación

Un Ciclo	20 ciclos	17 ciclos	1 ciclo
90°C por 2 min	94°C por 30 seg	94°C por 30 seg	68°C
50°C por 60 min	57°C por 30 seg	60°C por 30 seg	por 7 min
94°C por 2 min	68°C por 2 min	68°C por 2.5 min	4°C

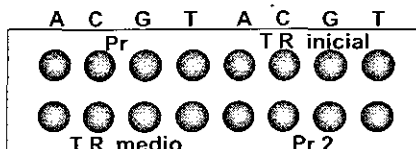
Procedimiento.

1. Colocar 9 μL de la mezcla I en el fondo de un tubo.
2. Agregar 17 μL ARN en el fondo del tubo, mezclar mediante pipeteo.
3. Poner los tubos en el termociclador precalentado e iniciar el programa.
4. Detener la reacción después de 5 minutos a 50°C .
5. Agregar 14 μL de la mezcla II al fondo del tubo sin sacar del termociclador mezclar por pipeteo.
6. Cerrar los tubos, y continuar el programa del RT-RCP del termociclador hasta su finalización.
7. Almacenar a $2-8^{\circ}\text{C}$ por un máximo de 24 horas o continuar con la reacción de secuenciación.

REACCIÓN DE SECUENCIACIÓN

Mezcla de secuenciación	Cantidad por Reacción (μL)
Agua	137
Buffer I CLIP	34.5
Amplitaq FS	6.5

Plan de acomodo



Condiciones de Amplificación

Un ciclo	30 ciclos	Un ciclo
	94°C por 20 seg	70°C por 5 min
94°C por 5 min	→ 56°C por 20 seg	→ 4°C hold
	70°C por 1.5 min	

Procedimiento.

1. Colocar 7 μL de la mezcla de terminación CLIP como se indica en el plan de acomodo, en el fondo del tubo.
2. Tomar una alícuota de 95 μL de la mezcla de secuenciación y ponerla en el fondo de un tubo de 0.5 mL.
3. Tomar 5 μL del producto de RT-RCP y agregarlo a la mezcla de secuenciación en el tubo de 0.5 mL, mezclar bien y centrifugar brevemente.
4. Agregar 5 μL de la mezcla del paso 3 a los 16 tubos que contienen las mezclas de terminación CLIP, evitando tocar el fondo.
5. Mezclar suavemente y recuperar la reacción.
6. Pasar los tubos al termociclador precalentado e iniciar el programa de amplificación.
7. Al terminar el programa de amplificación, agregar 14 μL de formamida con colorante por un lado del tubo para detener la reacción, mezclar suavemente.
8. Desnaturalizar las muestras a 85°C por 3 minutos y colocar inmediatamente en hielo.
9. Se puede almacenar la muestra a 2-8°C en oscuridad.

SECUENCIACIÓN

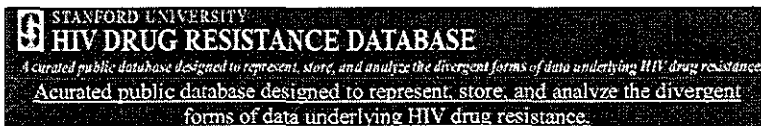
1. Preparar un gel de acrilamida al 6% y colocarlo en el Long Read Tower.
2. Agregar amortiguador de corrida TBE 1X, en ambos compartimentos.
3. Colocar 1.5 μ L de cada reacción de secuenciación en carriles independientes.
4. Comenzar la electroforesis inmediatamente después de cargar las muestras.

Condiciones de corrimiento del gel de poliacrilamida.

Temperatura del gel	60°C
Voltaje	2000V
Láser	50%
Reloj Intervalo de muestra	0.5 seg
Tiempo de corrimiento	50 min

ANEXO 5.

REPORTE DE RESISTENCIA.



HOME GENOTYPE-RX GENOTYPE-PHENOTYPE CLINICAL HIV-1 PROGRAM

HIVdb: Genotypic Resistance Interpretation Algorithm

SeqID: s001_1 SEQ_001 Date: 2/06/08

Summary Data

Subtype and % similarity to closest reference isolate:

Sequence includes PR: codons: 4 - 99
 Sequence includes RT: codons: 42 - 247

1. PR: B (95.1%)
2. RT: B (97.7%)

There are no insertions or deletions

Drug Resistance Interpretation

PI Major Resistance Mutations: None

PI Minor Resistance Mutations: None

Protease Inhibitors

atazanavir (ATV)	Susceptible
darunavir (DRV)	Susceptible
fosamprenavir (FPV)	Susceptible
indinavir (IDV)	Susceptible
lopinavir (LPV)	Susceptible
nelfinavir (NFV)	Susceptible
saquinavir (SQV)	Susceptible
tipranavir (TPV)	Susceptible

Other Mutations: M36M, R57K, L63P, V82I, I93L

Nucleoside RTI

lamivudine (3TC)	Susceptible
abacavir (ABC)	Susceptible
zidovudine (AZT)	Susceptible
stavudine (D4T)	Susceptible
didanosine (DDI)	Susceptible
emtricitabine (FTC)	Susceptible
tenofovir (TDF)	Susceptible

NRTI Resistance Mutations: None

NNRTI Resistance Mutations: None

Other Mutations: D123E, I178M, Q207E, R211K

Drug Resistance Interpretation**Non-Nucleoside RTI**

delavirdine (DLV)	Susceptible
efavirenz (EFV)	Susceptible
etravirine (ETR)	Susceptible
nevirapine (NVP)	Susceptible

ANEXO 6.

De acuerdo con el Panel Internacional de Expertos en los Antirretrovirales del VIH (<http://hivdb.stanford.edu/pages/asi/releaseNotes/>), la resistencia genotípica se clasificó en cuatro niveles: susceptible, resistencia baja, resistencia intermedia y resistencia alta.

Los niveles de resistencia para cada ARV son determinados de acuerdo a las publicaciones científicas, en donde se hace una correlación entre las mutaciones y los antirretrovirales. El análisis incluye la correlación entre el genotipo y el fenotipo; el genotipo y la historia de prescripción de ARV en el paciente y los datos del genotipo con la respuesta clínica del paciente.

La interpretación de la resistencia al medicamento se realiza por la adición simultánea de los puntajes de cada mutación asociada con resistencia a un ARV en particular. Con el rango de puntaje obtenido se infiere el nivel de resistencia generado por la mutación.

La resistencia se determina con el programa OpenGene®, GuideLines™ reglas 10.0 (Bayer HealthCare) y el programa HIVdb (Universidad de Stanford). Estos programas utilizan algoritmos de acuerdo al Panel Internacional de Expertos en los Antirretrovirales del VIH que incorporan las diferentes combinaciones de mutaciones que confieren los niveles de resistencia, agregando el puntaje de la mutación y el efecto de la combinación con otras mutaciones.

NIVELES DE RESISTENCIA

Susceptible. Los virus aislados no muestran reducción de la susceptibilidad al medicamento.

Baja. Los virus aislados tienen mutaciones que por sí mismas no generan resistencia o que muestran una reducción *in vitro* de la susceptibilidad al ARV y los pacientes que muestran este tipo de resistencia pueden no tener una buena respuesta al tratamiento.

Intermedia. El genotipo indica un grado más alto de resistencia que la baja, pero menor resistencia que la clasificada como alta. Incluye también aquellas mutaciones mutaciones que se asociaron a una menor respuesta virológica en algunos pacientes.

Alta. Las mutaciones detectadas se asociaron con una reducción máxima de la sensibilidad del ARV. El genotipo del paciente es similar a los encontrados en aislados *in vitro* con niveles altos de resistencia y/o en pacientes infectados con cepas de genotipos similares y tienen poca o nula respuesta al tratamiento con el ARV en estudio.