

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGÍA
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD



TÍTULO.

**“EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR Y PREVALENCIA DE
MUTACIONES QUE CONFIEREN FARMACORRESISTENCIA AL VIH
EN PACIENTES INFECTADOS EN LA CIUDAD DE TIJUANA”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

PRESENTA:

QFB. CAROLINA CARRIÓN CHÁVEZ

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. HORACIO EUSEBIO ALMANZA REYES

CO-DIRECTOR DE TESIS:

Mtro. JOSÉ ROMÁN CHAVEZ MÉNDEZ

Dra. NINA BOGDSNCHIKOVA

TIJUANA, B.C., MÉXICO

SEPTIEMBRE, 2016

Tijuana Baja California, a 19 de Septiembre del 2016.

**COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD
FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGÍA**

ASUNTO: Voto Aprobatorio

Habiendo fungido como Presidente en el examen de la Tesis titulada **“EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR Y PREVALENCIA DE MUTACIONES QUE CONFIEREN FARMACORRESISTENCIA AL VIH EN PACIENTES INFECTADOS EN LA CIUDAD DE TIJUANA”** elaborada por la C. **Carolina Carrión Chávez**, manifiesto a ustedes que reúne los requisitos académicos establecidos para ser considerada por el jurado de examen.

ATENTAMENTE

Presidente

Tijuana Baja California, a 19 de Septiembre del 2016.

**COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD
FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGÍA**

ASUNTO: Voto Aprobatorio

Habiendo fungido como Presidente en el examen de la Tesis titulada **“EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR Y PREVALENCIA DE MUTACIONES QUE CONFIEREN FARMACORRESISTENCIA AL VIH EN PACIENTES INFECTADOS EN LA CIUDAD DE TIJUANA”** elaborada por la C. **Carolina Carrión Chávez**, manifiesto a ustedes que reúne los requisitos académicos establecidos para ser considerada por el jurado de examen.

ATENTAMENTE

Sinodal

C.c.p. Archivo

Tijuana Baja California, a 19 de Septiembre del 2016.

**COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD
FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGÍA**

ASUNTO: Voto Aprobatorio

Habiendo fungido como Presidente en el examen de la Tesis titulada **“EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR Y PREVALENCIA DE MUTACIONES QUE CONFIEREN FARMACORRESISTENCIA AL VIH EN PACIENTES INFECTADOS EN LA CIUDAD DE TIJUANA”** elaborada por la C. **Carolina Carrión Chávez**, manifiesto a ustedes que reúne los requisitos académicos establecidos para ser considerada por el jurado de examen.

ATENTAMENTE

Secretario

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGÍA
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD**



TÍTULO.

**“EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR Y PREVALENCIA DE
MUTACIONES QUE CONFIEREN FARMACORRESISTENCIA AL VIH
EN PACIENTES INFECTADOS EN LA CIUDAD DE TIJUANA”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD**

PRESENTA:

QFB. CAROLINA CARRIÓN CHÁVEZ

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. HORACIO EUSEBIO ALMANZA REYES

CO-DIRECTOR DE TESIS:

Mtro. JOSÉ ROMÁN CHAVEZ MÉNDEZ

Dra. NINA BOGDSNCHIKOVA

TIJUANA, B.C., MÉXICO

SEPTIEMBRE, 2016

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a mi familia, padres y hermanos, y a mi esposo que con su ejemplo me han motivado a ser cada día mejor persona y a seguir en el camino de la superación profesional.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a las personas que hicieron posible la realización de este proyecto, al Dr. Horacio Almanza, mi director de tesis, gracias por el apoyo incondicional y la paciencia brindada, por estar siempre disponible con la mejor actitud para sus alumnos.

Al MSP Román Chávez, gracias por darme la oportunidad de integrarme a este proyecto que con mucho esfuerzo y dedicación comenzaste y sacaste adelante frente a cualquier dificultad, gracias a tu dedicación y perseverancia estos resultados son posibles, agradezco la confianza, los conocimientos y la amistad que me has ofrecido.

A todo el personal de CAPASITS encabezados por el Dr. Mario Lam, por habernos permitido la entrada a la clínica y las facilidades para la realización de esta tesis, espero que los resultados obtenidos sean de gran utilidad para la comunidad a la que atienden.

A las personas en UCSD que nos apoyaron con recursos y metodológicamente para la realización de esta investigación.

A mi familia, a mis padres Carmen y Eduardo, gracias por ser los primeros en apoyarme en cada decisión a lo largo de la vida, por tener siempre el mejor consejo y palabras de aliento que me motivan a seguir, por ser siempre los más orgullosos de mis logros y por ser mi mejor ejemplo. También quiero agradecer a mis hermanos, Livi y Eduardo, por su cariño y por mis compañeros de vida, por estar presentes en mis alegrías y tristezas, los quiero mucho.

A mi esposo, Carlos, gracias por ser quien siempre cree en mí y me recuerda mis propias capacidades cuando estoy en momentos de desesperación, por siempre alentarme a ver hacia adelante y mostrarme con el ejemplo que las metas se pueden lograr, gracias por estar siempre apoyándome, del mismo modo estaré yo siempre para ti.

ABREVIATURAS

μl	Microlitro
3TC	Lamivudina
ABC	Abacavir
ADN	Acido desoxirribonucleico
ARN m	Ácido ribonucleico mensajero
ARN	Ácido ribonucleico
ARV	Antirretroviral
AZT	Zidovudina
BD	Beckton Dickinson
cADN	Ácido desoxirribonucleico complementario
CAPASITS	Centro Ambulatorio para la Prevención y Atención en SIDA e Infecciones de Transmisión Sexual
CENSIDA	Centro Nacional para la Prevención y el Control del VIH y el SIDA
d4T	Estavudina
ddC	Zalcitabina
ddI	Didanosina
DEPC	Dietilpirocarbonato
DLV	Delavirdina
dNTP	Deoxinucleósido trifosfato
DTT	Ditroteitol
EDTA	Acido etilendiamino tetraacético
EFV	Efavirenz
ENF	Enfuvirtida
ERT	Etravirina
ETC	Emtricitabina
FDA	Food and Drugs Administration
HCl	Ácido Clorhídrico
HLA	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
IN	Integrasa
IN	Integrasa
Kb	Kilobase
KCl	Cloruro de Potasio
kDa	KiloDalton
LTR	Repeticiones largas terminales
MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
ml	Mililitro
mM	Milimolar
mV	Milivoltio
NNRTI	Inhibidores No Nucleósidos de la Retro Transcriptasa
NRTI	Inhibidores Nucleósidos de la Retro Transcriptasa
NVP	Neviparina
OMS	Organización Mundial de la Salud
ONUSIDA	Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/sida
pb	Pares de bases
PBS	Phosphate Buffered Saline

PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PI	Inhibidores de la Proteasa
PR	Proteasa
RPV	Rilpivirina
RT	Retro-transcriptasa
SALVAR	Sistema de Administración, Logística y Vigilancia de ARV
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Humana
SSA	Secretaría de Salud
TAM	Thymidin-associated mutations
TARGA	Tratamiento Antirretroviral de Gran Actividad
TARV	Tratamiento Antirretroviral
TDF	Tenofovir
Tm	Temperatura de fusión
TR	Transcriptasa reversa
UV	Ultravioleta
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana

RESUMEN

Se realizó un estudio analítico de tipo descriptivo de corte transversal observacional entre agosto del 2012 a agosto del 2014, para evaluar la prevalencia de mutaciones que confieren farmacorresistencia antirretroviral y las variantes génicas del VIH en pacientes infectados en la ciudad de Tijuana Baja California. Se presentan los resultados del análisis de las secuencias del gen de la proteasa y transcriptasa inversa del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 extraído de 73 plasmas de pacientes infectados. Se realizó la toma de muestra en tubo de EDTA y se extrajo el RNA de linfocitos obtenidos de sangre periférica y fue retrotranscrito, posteriormente se realizaron las PCR y revelado en geles de agarosa al 1%, usando como control positivo un control de RNA cedido por la unidad de VIH en UCSD. Se realizó secuenciación nucleotídica por el método de Sanger y se determinó la resistencia a los diferentes antirretrovirales según la base de datos de Stanford. Se determinaron las variantes genéticas según los algoritmos de la base de datos BioÁfrica. Posteriormente se realizó el análisis filogenéticos del segmento del gen de la polimerasa del VIH-1 amplificado, buscamos posible asociación de las formas genéticas del virus más representativas con la región. Así mismo, determinamos el porcentaje de mutaciones asociadas a resistencias a los inhibidores de la transcriptasa inversa y la proteasa. En el análisis filogenético encontramos los subtipos: B, 89%; y entre las formas recombinantes: CRF03, 1.4%; recombinantes CRF17, 1.4%; CRF28, 2.7% y el recombinante CRF29, 5.5%. La frecuencia de mutaciones asociadas con resistencia a los NRTI fue de 5.5% (4/73) siendo las mutaciones encontradas: D67G, D67N, K70R, L74I, M184V, K219E y T215C; las mutaciones encontradas asociadas a los NNRTI Y181C, G190S, Y188L y K103N equivalentes a fueron 6.84% (5/73); a los inhibidores de la proteasa no se encontraron mutaciones génicas. Los resultados corroboraron la gran diversidad genética del VIH-1 y el porcentaje de 9.6% en mutaciones de resistencia en Tijuana Baja California.

ÍNDICE

CAPITULO I.....	15
1.1 ANTECEDENTES.....	15
1.1.1. Retrovirus.....	15
1.1.2. Morfología del VIH.....	16
1.1.3. Estructura genética del VIH.....	17
1.1.4. Ciclo de Vida del VIH.....	22
1.1.5. Patogenia de la infección por VIH.....	24
1.1.6. Clasificación del VIH.....	26
1.1.7. Epidemiología del VIH.....	26
1.1.8. Tratamientos antiretrovirales.....	28
1.1.8.1 Inhibidores Nucleosidos de la Transcriptasa Reversa.....	29
1.1.8.2. Inhibidores no Nucleosidos de la Transcriptasa Reversa.....	29
1.1.8.3. Inhibidores de la Proteasa.....	29
1.1.8.4. Inhibidores de la integrasa.....	30
1.1.8.5. Inhibidores de la fusión.....	30
1.1.8.6. Combinaciones multiclase.....	30
1.1.8.7. Adherencia a los antiretrovirales.....	31
1.1.8.8. Toxicidad de los tratamientos antiretrovirales.....	33
1.1.9. Farmacoresistencia en el VIH.....	34
1.1.9.1 Cambios genéticos en el VIH que confieren farmacoresistencia.....	34
1.1.9.2. Selección del virus resistente.....	34
1.1.9.3. Mecanismos de resistencia.....	36
1.1.9.4. Resistencia a los inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos (NRTI).....	36
1.1.9.5. Resistencia a los inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos (NNRTI).....	39
1.1.9.6. Resistencia a los inhibidores de la fusión.....	41
1.1.9.7. Interpretación de las pruebas de resistencia.....	42
1.1.9.8. Transmisión de la farmacoresistencia en el VIH.....	43
1.2 JUSTIFICACIÓN.....	43
1.3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	44
1.4 PREGUNTA DE INVESTIGACION.....	45
1.5 OBJETIVOS.....	45
CAPITULO II.....	46
2.1 METODOLOGÍA.....	46
2.1.1 Población.....	46

2.1.3. VARIABLES	47
2.1.4. Toma de muestra.....	50
2.1.5. Transporte de muestra.....	51
2.1.6. Aislamiento de leucocitos	51
2.1.7. Separación de plasma y precipitación viral	52
2.1.8. Extracción de ARN viral	52
2.1.9. Extracción de ADN de leucocitos.....	53
2.1.11. Cuantificación de ADN.....	54
2.1.12. Retrotranscripción.....	55
2.1.13. Reacción en Cadena de la Polimerasa	57
2.1.14. Análisis de productos en gel de agarosa.....	59
2.1.15 Extracción del producto de PCR del gel de agarosa	60
2.1.16 Purificación de los productos de PCR	60
2.1.17. Secuenciación Sanger	61
2.1.18. Análisis de datos.....	61
2.1.18.1 Análisis demográfico.....	61
2.1.18.2 Análisis de farmacorresistencia	61
2.1.18.3 Análisis de subtipos	62
CAPITULO III	62
3.1 RESULTADOS.....	62
3.1.1 Análisis de variables demográficas y factores de riesgo	62
3.1.2 Análisis de farmacorresistencia	68
3.1.3 Análisis de subtipos	69
CAPITULO IV	71
4.1 DISCUSIÓN	71
CAPITULO V.....	74
5.1 CONCLUSIONES	74
CAPITULO VI	75
6.1 BIBLIOGRAFIA.....	75

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Estructura del VIH-1.
- Figura 2. Organización genómica del VIH-1 y procesamiento de las proteínas víricas.
- Figura 3. Ciclo replicativo del VIH.
- Figura 4. Representación esquemática del curso de la infección por VIH-1 en adultos.
- Figura 5. Distribución de Estados de Nacimiento.
- Figura 6. Clasificación de prevalencia por clase de farmacorresistencia.
- Figura 7. Prevalencia de Subtipos de VIH.
- Figura 8. Análisis Filogenético.

INDICE DE TABLAS

- Tabla I. Familia Retroviridae.
- Tabla II. Proteínas del VIH.
- Tabla III. Mutaciones de resistencia a los Inhibidores de la Transcriptasa Inversa Análogos de Nucleósidos (NRTI).
- Tabla IV. Mutaciones de la región gp41 de la envuelta asociada con resistencia a los inhibidores de enfuvirtida.
- Tabla V. Mutaciones de resistencia a los Inhibidores de la Transcriptasa Inversa No Análogos de Nucleósidos (NNRTI).
- Tabla VI. Operacionalización de las variables.
- Tabla VII. Mezcla de hibridación de retrotranscripción.
- Tabla VIII. Oligonucleótidos usados en la PCR.
- Tabla IX. Componentes de reacción para amplificación de genes.
- Tabla X. Temperaturas y ciclos de reacción para PCR.
- Tabla XI. Resultados variables demográficas.
- Tabla XII. Resultados factores de riesgo.
- Tabla XIII. Resultados residencia fronteriza.
- Tabla XIV. Datos carga viral y linfocitos T CD4.
- Tabla XV. Información de TARV.
- Tabla XVI. Resultados mutaciones de farmacorresistencia.

CAPITULO I

1.1 ANTECEDENTES

1.1.1. Retrovirus

La familia Retroviridae engloba un conjunto de virus con ARN como material genético, y una característica específica fundamental: poseen un mecanismo para integrar establemente su información genética dentro del genoma de la célula que infectan. Para lo cual llevan incorporado un conjunto de enzimas que les permite traducir su ARN genómico en ADN de doble cadena, e incorporarlo al ADN celular¹. La información genética se organiza de una forma común para toda la familia *Retroviridae*: tres genes denominados gag, pol y env, codifican las proteínas estructurales, enzimáticas y de la envoltura, respectivamente. Estos tres genes están flanqueados por dos secuencias iguales de varios cientos de nucleótidos, llamadas repeticiones largas terminales o LTRs. El VIH pertenece a la familia de los retrovirus y, dentro de éstos, a la familia *Retroviridae*. La familia *Retroviridae* engloba un gran número de especies virales que infectan a vertebrados (**Tabla I**).

Esta familia, a su vez, se ha subdividido en tres géneros: *Oncovirinae*, *Lentivirinae* y *Spumavirinae*. Las dos primeras provocan numerosas enfermedades contagiosas en animales, desde tumores a enfermedades neuronales e inmunodeficiencias. El género *Oncovirinae* comprende cinco grupos, y todos presentan la propiedad de inducir la formación de tumores. El género *Spumavirinae* posee la capacidad de inducir vacuolas, y las células infectadas presentan un aspecto espumoso. El género *Lentivirinae* se caracteriza por producir infecciones de evolución lenta. Los retrovirus contienen ácido ribonucleico (ARN) de cadena sencilla y positiva como material genético. Poseen dos copias de ARN por partícula viral y son diploides^{2,3}. Una característica distintiva es que codifican una transcriptasa reversa (TR). Es una enzima que sintetiza ácido dextrorribonucleico (ADN) utilizando como molde el ARN genómico⁴. Otra característica de este género lentivirus es que han desarrollado una estrategia que les permite transportar su genoma en forma de ADN a través de la membrana nuclear de la célula huésped.

Esta característica es responsable de su capacidad única para replicar eficazmente en células que no se están dividiendo⁵.

Tabla I. Familia *Retroviridae*

Género	Grupo	Especie Representativa	Patología
<i>Oncovirinae</i>	-Virus sarcoma de la leucosis aviar. -Virus tipo C de los mamíferos. -Virus tipo B de los mamíferos. -Virus tipo D. -Virus de la leucemia de linfocitos T humanos.	-RSV. Virus del sarcoma de Rous -ALV. Virus de la leucosis aviar -MuLV. Virus de la leucemia murina de Moloney -MMTV. Virus del tumor mamario del ratón -SRV. Retrovirus de simios -HTLV-1. Virus de la leucemia de linfocitos T humanos -HTLV-2. Virus de la leucemia de linfocitos T humanos.	-Oncogén sm Linfoma de linfocitos B -Linfoma de linfocitos T -Linfoma de linfocitos T -Linfomas de linfocitos T y trastornos neurológicos
<i>Lentivirinae</i>	Lentivirus	-VIH-1. Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1. -VIH-2. Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 2. -VIS. Virus de la inmunodeficiencia en simios. -VIF. Virus de la inmunodeficiencia en felinos. -VIB. Virus de la inmunodeficiencia en bovinos. -VISNA. Virus de la inmunodeficiencia ovina caprina.	-Inmunodeficiencia en humanos -Inmunodeficiencia en humanos -Inmunodeficiencia en simios - Inmunodeficiencia felina - Inmunodeficiencia bovina - Inmunodeficiencia ovina y caprina
<i>Spumavirinae</i>		Virus de humanos y primates	Poco conocida

Se presentan los diferentes los diferentes géneros, grupos, especies y patología que producen dentro de la Familia *Retroviridae*.

1.1.2. Morfología del VIH

El virión del VIH consiste en una partícula esférica, de aproximadamente 100 nm de diámetro, constituida por tres capas concéntricas (**Figura 1**). La capa interna (nucleoide o core), constituida por la proteína de la cápside (p24), tiene forma de cono truncado y contiene dos copias del ARN genómico formando un complejo ribonucleoproteico con las enzimas y las proteínas de la nucleocápside⁶. Ésta

contiene dos copias del genoma viral que están recubiertas por la proteína p9, una molécula de ARN transferente que actúa como cebador en la iniciación de las síntesis del ADN viral, la retro-transcriptasa, la proteasa y la proteína p6⁷. La capa intermedia está constituida por la proteína matriz (p17). La capa más externa está constituida por una membrana lipídica derivada de la célula infectada, donde se insertan espículas constituidas por las glicoproteínas de la membrana, gp120 y gp41. En la membrana existe, además, una gran concentración de proteínas celulares íntimamente asociadas como la β -2-microglobulina y las cadenas α y β de los antígenos HLA DR, en una concentración mayor que la de gp120. Esta riqueza de proteínas celulares en la membrana viral condiciona aspectos de la patogenicia.

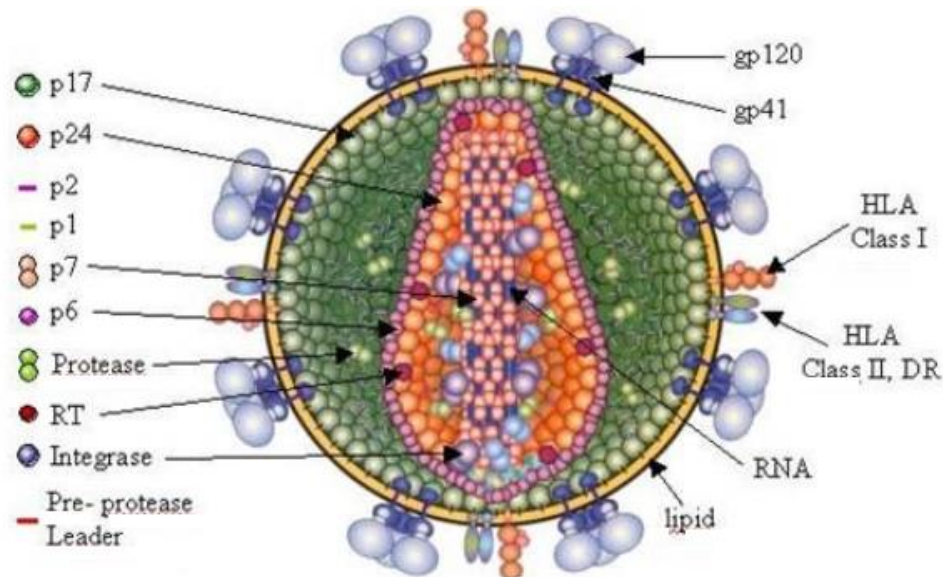


Figura 1. Estructura del VIH-1.

(Tomada de: <http://epidemiologiamolecular.com/wp-content/uploads/2009/02/clip-image0022.jpg>).

1.1.3. Estructura genética del VIH

El genoma del VIH está constituido por dos copias de ARN de cadena sencilla y polaridad positiva⁸. Su genoma tiene una longitud de 9,8 Kb y está formado por tres genes estructurales y siete genes reguladores. Además, en su forma de provirus, el genoma viral se encuentra flanqueado por unas secuencias repetidas largas (LTR Long Terminal Repeat) que le permiten la integración en el

genoma celular, y en las que se localizan los elementos reguladores de iniciación de la transcripción viral⁹ (**Figura 2**). Los tres genes estructurales del VIH se denominan *gag*, *pol* y *env*, que codifican para las proteínas respectivas correspondientes a los antígenos internos, las enzimas (polimerasas) y la membrana (**Tabla II**). Los genes reguladores, entre otras funciones regulan la latencia o expresión del material genético viral integrado en el material celular (provirus) y se denominan: *tat*, *rev*, *vpr*, *vif*, *vpu*, *nef* y *vpt*.

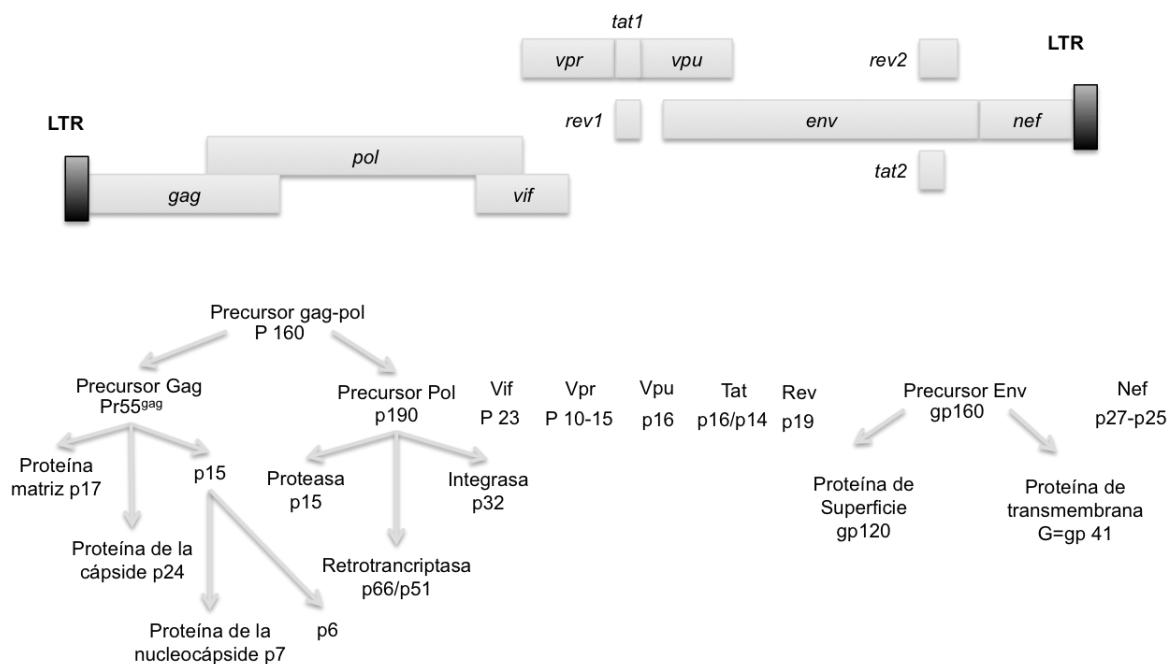


Figura 2. Organización genómica del VIH-1 y procesamiento de las proteínas víricas.

El VIH-1 presenta tres genes estructurales: *gag*, *pol* y *env*. Las regiones *gag* y *pol* del genoma se traducen en un precursor *gag-pol* (p160), procesado por la proteasa viral en un precursor de *gag* (Pr55^{gag}) que da origen a las cuatro proteínas que contribuyen a la formación del virión: la proteína matriz (MA, p17), la proteína de la cápside (CA, p24), y un precursor (p15) de las proteínas de la nucleocápside (NC, p7) y p6¹⁰. La proteína MA procede del extremo N-terminal miristilado de Pr55^{gag}. La mayoría de las moléculas MA están asociadas a la cara interna de la bicapa lipídica, estabilizando la partícula, y un pequeño porcentaje se une a la

integrasa en el complejo de preintegración, facilitando la localización nuclear del ácido nucleico viral en ausencia de mitosis.

Este fenómeno le permite al VIH infectar células que no se están dividiendo, una característica inusual para un retrovirus¹⁹. Las mutaciones que impiden la miristilación interfieren en la asociación estable de esta proteína a la membrana, así como en la infectividad del virión^{20, 21}. La proteína de la cápside forma el core de las partículas virales y es el antígeno mayoritario. Su dominio N-terminal, comprendiendo los residuos 1 al 45, contiene funciones en la maduración del virión y en la incorporación de la proteína celular cyclophilina A (CypA), la cual juega un papel importante en los primeros pasos post-infección. El dominio c-terminal (residuos 151-231) incluye la secuencia encargada de la dimerización CA-CA, e interviene en las interacciones Gag-Gag. La región NC de gag juega un papel fundamental en varios pasos del ciclo viral: dimerización del ARN, ensamblaje de proteínas gag, encapsidación del ARN y en la síntesis del ADN proviral por la RT. La región p6 media las interacciones entre Pr55^{gag} y la proteína vpr, permitiendo la incorporación de vpr a los viriones. Estas proteínas son vitales para la integridad y estructura del virión²².

El gen *pol* codifica las enzimas víricas proteasa (p15), retrotranscriptasa (RT) (p66/p51) e integrasa (p32). La proteasa cataliza el procesamiento postraducciona de los precursores a las proteínas estructurales y los enzimas. La RT presenta dos dominios, uno con actividad polimerasa ARN y ADN dependiente²³ y otro con actividad endonucleolítica de ribonucleasa H (RNasaH). La integrasa presenta las actividades enzimáticas requeridas para catalizar la reacción de integración del ADN viral en el cromosoma de la célula huésped, las mutaciones que afectan a su estructura bloquean la replicación viral afectando a la integración pero no a la síntesis del ADN. Usando IN purificada a partir de viriones, o preparada por sistemas de expresión, se vió que poseía dos funciones enzimáticas: Primero reconoce y se une a ADN de doble cadena, en la secuencia ATT en el extremo de la LTR, catalizando la separación de dos bases en el extremo 3'; posteriormente une este sustrato por el grupo OH 3' libre al extremo 5' del ADN "diana", generando un provirus integrado flanqueado por dos secuencias

repetidas de 5 pares de bases²⁴. Las proteínas codificadas por el gen *env* se originan a partir de un precursor (gp160), que es modificado posteriormente por glicosilación.

Tras el procesamiento proteolítico por enzimas celulares se originan las dos proteínas de la envuelta, la proteína de superficie (SU, gp120) y la proteína transmembrana (TM, gp41). Estas dos proteínas se mantienen asociadas y ancladas a la membrana celular por un dominio hidrofóbico cercano al extremo C-terminal. La delección de esta secuencia hidrofóbica hace que estas proteínas sean liberadas en su forma soluble. La proteína de superficie contiene los sitios de unión a los receptores celulares y los epítomos principales de neutralización por anticuerpos. La proteína transmembrana es la responsable de la fusión de la envoltura del virus con la superficie de la célula, a través de una región hidrofóbica amino terminal, una vez que se ha producido la interacción del virus con los receptores de quimioquinas. Una diferencia fundamental de los lentivirus con respecto a otros retrovirus es la existencia de varios genes reguladores. En el caso del VIH las proteínas reguladoras son *tat*, *rev*, *nef*, *vpr*, *vif* y *vpu*. La proteína *tat* (p16/p14) se une a la región TAR, localizada en la región R de la LTR del ADN viral^{25,26,27} y junto con otros transactivadores de origen celular (como SP1 y NFκβ), activa el inicio de la transcripción y la elongación de los transcritos formados durante la transcripción temprana^{28,29}. *Rev* (p19) interacciona con su secuencia diana “Rev response element” (RRE), localizada en la región *env*, y regula el transporte de los ARN mensajeros (ARNm) al citoplasma, así como su procesamiento³⁰.

Los productos de los genes *tat* y *rev* requieren localización nuclear para ejercer su función³¹. *Nef* (p27-p25) es una proteína miristilada. *Nef* tiene múltiples acciones: disminución de la expresión de CD4 en la superficie celular³², perturbación de la activación de células T y estimulación de la infectividad. Se la puede considerar un factor de virulencia en la patogenia de la infección por VIH, ya que se han encontrado virus con delecciones en *nef*³³ o con mutaciones puntuales³⁴ en pacientes no progresores (LTS). La proteína *Vpr* (p10-15) es incorporada al virión por la proteína p6 y facilita la localización nuclear del complejo preintegración

en ausencia de mitosis³⁵, bloquea a las células en fase G2 del ciclo celular³⁶ y además, es un transactivador débil. Vif (p23) está asociada a la infectividad y vpu (p16) facilita la salida de los viriones de la célula³⁷. El genoma viral, en su forma de provirus, se encuentra flanqueado por secuencias denominadas LTR (repeticiones terminales largas) que le permiten la replicación e integración en el genoma celular. Las LTRs contienen sitios de unión para proteínas celulares que activan la transcripción y están, a su vez, bajo el control de señales virales.

Tabla II. Proteínas del virus de la inmunodeficiencia humana.

Proteínas	Tamaño (Kda)	Función
Proteínas estructurales		
Precursor Gag	Pr55	Precursora de otras de menos peso molecular p17,p24,p6,p1
MA	P17	Proteína miristilada de la matriz
CA	P25(p24)	Proteína de la cápside
NC	pg	Proteína de la unión a nucleótidos
NC	pg	Rica en prolinas
Precursos Gag-pol	Pr170	Maduración de nuevos viriones
Proteasa (Pro)	P10	Procesamiento postraducciona
Pol (TR)	P66	Transcriptasa reversa y actividad ARNasa H
Integrasa	P51	Transcriptasa en reverso
	P31	Integración del ADNbc Viral
Precursor Env	Gp160	Dirige las glucoproteínas a la membrana
SU	Gp120	Glucoproteína de superficie
TM	Gp41	Glucoproteína transmembrana
Proteínas Regulatoras		
Tat	P14	Transactividad de transcripción de todos los ARNm del VIH
Rev	P19	Regulación del transporte y expresión del ARNm
Nef	P27	Aumenta la infectividad del virión, función pleiotrópica, interacciones intracelulares.
Proteínas Accesorias		
Vif	P23	Aumenta la infectividad del virión y ayuda a la síntesis del ADN proviral y al ensamblaje Facilita la entrada al núcleo del complejo de

Vpr	P15	preintegración
Vpu	P16	Aumenta la liberación de viriones Interviene en la degradación del CD4
Tev	P26	Activa el tat y el rev

Fuente. Modificado de Peirado, 1995; Carrasco, 1996; Medrano y otros, 2002.

1.1.4. Ciclo de Vida del VIH

El ciclo de replicación de los lentivirus se divide en dos fases: fase temprana y fase tardía. La fase temprana comienza con la unión del virus a la célula y continúa con la retrotranscripción del genoma viral y formación del provirus integrado en el genoma celular. La fase tardía comienza después de un período de latencia con la transcripción del ARN viral a partir del ADN proviral y finaliza con la liberación de los viriones al exterior de la célula. El ciclo biológico del VIH se inicia con su entrada en la célula diana mediante la interacción entre la gp120 con un receptor y un correceptor celulares. El receptor es la molécula CD4, localizada en la superficie de los linfocitos T colaboradores y en células de la estirpe monocito-macrófago, lo que determina el tropismo viral por estos tipos celulares^{38,39}. Además se requiere la interacción del VIH con algún receptor de quimiocinas: CXCR4, que es el receptor de la quimoquina SDF-1, y el CCR5 o receptor fusina que es el receptor de las quimoquinas RANTES, MIP-1 α y MIP-1 β ^{40,41}.

Se han descrito también variantes virales capaces de unirse a CCR2, CCR3 o capaces de entrar en la célula a través de múltiples correceptores⁴². La unión del VIH se inicia mediante la interacción específica de la glicoproteína Gp120 de la envuelta viral y el dominio amino-terminal del receptor CD4⁴³, provocando cambios conformacionales en la envuelta viral que permitirían la exposición del dominio de interacción de la gp120 con los receptores de quimiocinas CCR5 o CXCR4. La interacción con estos correceptores provocaría nuevos cambios conformacionales que expondrían el dominio N-terminal de la gp41, conduciendo a la fusión de membranas e internalización de la nucleocápside viral.

Después de la fusión, la nucleocápsida del virus se libera al citoplasma y se inicia el proceso de transcripción inversa de una de las hebras de ARN viral por la

enzima retro-transcriptasa (RT) transportada por el propio virión⁴⁴. Durante este proceso, la enzima RT se une al ARN viral y a una molécula de ARN de transferencia (ARNt) específico del aminoácido Lisina, que se une a una secuencia complementaria en el ARN viral y es usado como cebador por la RT. Primero se sintetiza una hebra de ADN de polaridad negativa y después la hebra positiva, para formar la molécula de ADN lineal de doble cadena, debido a la actividad ADN polimerasa y RNAsa de la RT, genera una doble hebra de DNA duplicando los LTR, que se sitúan en ambos extremos del genoma viral. Este ADN es transportado al interior del núcleo de la célula, mediante un proceso activo que depende de la presencia de señales de localización celular en algunas proteínas virales que forman parte del complejo de preintegración.

Una vez en el núcleo el ADN lineal se integra de forma estable en el genoma de la célula huésped mediante la integrasa viral, y se forma el provirus. El provirus integrado en el genoma de la célula diana puede permanecer latente durante largos periodos de tiempo, puede replicarse de forma controlada, o bien experimentar una replicación masiva con el consiguiente efecto citopático sobre la célula infectada. La replicación del VIH se inicia con la síntesis del ARN mensajero a partir del ADN proviral integrado. La iniciación de la transcripción del provirus, depende de factores celulares y virales que interaccionan con las secuencias reguladoras localizadas en la región U3 de la LTR⁴⁵.

Estos elementos celulares se unen al promotor viral y aumentan la expresión genética del VIH-1 en respuesta a la estimulación celular por diferentes mecanismos, como citoquinas exógenas, y permiten la formación y activación del complejo transcripcional primario con la ARN polimerasa II celular. El ARN se sintetiza en forma de un único transcrito en el núcleo, y es transportado al citoplasma y procesado en transcritos de distintos tamaños, que utilizando la maquinaria celular dan lugar a la formación de las proteínas virales en un proceso en el que es necesaria la acción de la proteína viral Rev⁴⁶. Posteriormente se produce la maduración del virión con ayuda de la proteasa viral. Estas partículas maduras son capaces de infectar nuevos linfocitos T CD4+. La mayor parte del virus ($\geq 99\%$) que se detecta en el plasma en cualquier momento de la infección

procede de células T CD4⁺ activadas, infectadas recientemente⁴⁷. La vida media de estas células productivamente infectadas es muy corta (1 a 2 días) y se estima que cada día se destruyen entre 10^7 y 10^8 de estas células⁴⁸.

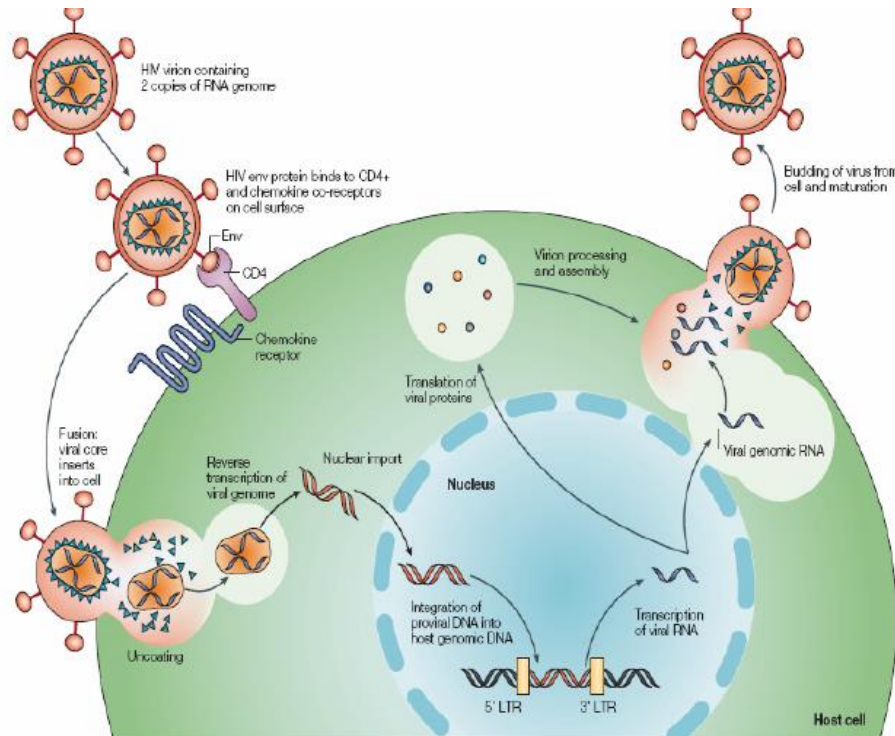


Figura 3. Ciclo replicativo del VIH (Tomada de Rambaut et al., 2004).

1.1.5. Patogenia de la infección por VIH

El curso clínico de la infección por el VIH incluye por lo general tres fases: a) infección primaria, b) fase asintomática, y c) la enfermedad de sida propiamente dicha. Durante la infección primaria, la alta replicación viral inicial conduce a una rápida diseminación del virus en órganos linfoides y otros tejidos del paciente infectado⁴⁹, en donde aparece un síndrome similar a una mononucleosis aproximadamente de 3 a 6 semanas después de la infección⁵⁰. Entre 2 ó 3 semanas post-infección y asociado con el desarrollo de una fuerte respuesta celular T citotóxica, que precede a la aparición de anticuerpos específicos⁵¹, se produce una drástica caída en los niveles de ARN vírico en plasma y un restablecimiento del número de células T CD4⁺⁵². Este nivel basal de replicación viral varía de un individuo a otro constituyendo un importante marcador virológico de progresión de la enfermedad^{53,54}.

Después de la primoinfección, se inicia la fase clínicamente asintomática, de duración variable, entre la infección primaria y el desarrollo del SIDA. Durante el período asintomático de la infección, la replicación del virus es continua^{55, 56}, pero el individuo mantiene una fuerte respuesta inmune frente al virus, estableciéndose un estado de equilibrio, en el cual la producción y eliminación del virus alcanza valores semejantes⁵⁷. Como resultado, los niveles de ARN vírico en plasma permanecen estables⁵⁸. Pero el número de células T CD4+ disminuye lentamente con una tasa media estimada de 25-60 células/ μ l/año⁵⁹ y el virus invariablemente escapa al control inmune.

La última etapa de la enfermedad, en ausencia de tratamiento antirretroviral, se caracteriza por un aumento de la replicación del VIH-1 y coincide clínicamente con una marcada disminución en el número de células T CD4+ (< 300 células/ μ l)^{60, 61} y una profunda alteración del estado general del paciente, caracterizada por la aparición de infecciones oportunistas graves, ciertas neoplasias y alteraciones neurológicas (Fig. 4).

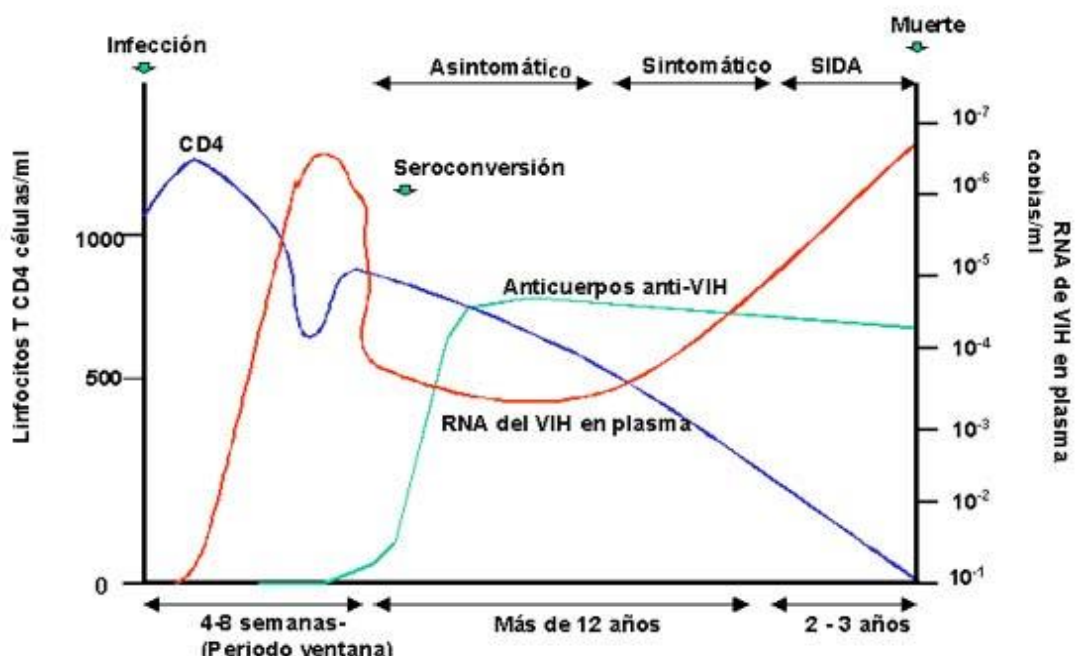


Figura 4. Representación esquemática del curso de la infección por VIH-1 en adultos.

(Tomada de: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/virologia/sida-vih.html>)

1.1.6. Clasificación del VIH

El VIH se clasifica en VIH-1 y VIH-2. El VIH-1 es el causante de la pandemia mundial de SIDA mientras que el VIH-2, aunque también puede producir SIDA, se considera menos patogénico y menos transmisible. Actualmente predomina el VIH-1 en la mayor parte del mundo, mientras que el VIH-2 se ha localizado en ciertas regiones del África occidental ^(13, 14). El VIH-1 se ha clasificado en tres grupos según su homología genética: M, O y N; el grupo M es el que mejor se ha adaptado al humano y se ha diseminado a nivel mundial, dentro de él se han identificado 9 subtipos (A,B,C,D,F,G,H,J,K), además de numerosas cepas recombinantes, se cree que estas se cepas se formaron en África Occidental ⁽¹⁴⁾.

Según análisis de secuencias se puede establecer que la variación genética entre subtipos es de un 20 a 35%. En cambio los grupos O y N son menos infectivos y se consideran, hasta la fecha, endémicos de Camerún y países que lo rodean, estos grupos se encuentran en 1 al 5% de infecciones por VIH en esta región. En África coexisten prácticamente todos los subtipos con predominio del C. En Europa y en el continente americano predomina el subtipo B y en la antigua Unión Soviética el subtipo A. En el sureste de Asia predomina la forma recombinante AE, mientras que en el sur de ese continente existe preponderancia del subtipo C y formas recombinantes BC ⁽¹⁵⁾. El VIH-2 cuenta con ocho subgrupos caracterizados que van desde el A al H. Las infecciones por VIH-2 se encuentran restringidas a África occidental. En esta zona se encuentran todos los sub grupos conocidos, siendo los más comunes el A y el B.

1.1.7. Epidemiología del VIH

La prevalencia a nivel mundial de VIH para el año 2012 era del 0.8% según la Organización de las Naciones Unidas y SIDA (ONUSIDA) en ese año hubo un aumento en el total de personas viviendo con infección por VIH en comparación con años anteriores, esto se justifica probablemente por el incremento al acceso a terapia antirretroviral, para entonces eran alrededor de 35.3 millones de personas infectadas, de los cuales 32.1 millones corresponden a población adulta y

aproximadamente 3.3 millones menores de 15 años de edad. Sin embargo el número de nuevas infecciones y muertes por SIDA disminuyó en comparación de años anteriores, a 2.3 y 1.6 millones respectivamente. La epidemia se encuentra en mayor índice en el África Subsahariana, siendo esta la zona más afectada con 4.7% de prevalencia y concentrando a alrededor de 25 millones de personas viviendo con VIH.

Con fines epidemiológicos la ONUSIDA considera al continente americano en grupos: Norte América, el Caribe y Latinoamérica. En la región de norteamericana la epidemia se ha mantenido estable con una prevalencia del 0.5%, para 2012 se reportaban una media de 1.2 millones de personas viviendo con infección por VIH, casi en su totalidad en los Estados Unidos. En el Caribe la prevalencia de VIH es un poco mayor de 1.0% y es la única región, además de África Subsahariana, en la que el número de mujeres adultas infectadas supera al de hombres, en 2010 se estimaba que el 53% de las personas adultas viviendo con VIH pertenecían al sexo femenino. En esta área de las Américas se estima que un total de 250,000 personas viven con VIH.

En la región de América Latina la prevalencia es del 0.4% y se considera que la epidemia se ha mantenido concentrada a grupos poblacionales de riesgo y estable, para 2012 se reportó que alrededor de 1.5 millones de personas viviendo con VIH, Brasil es el país más afectado en esta área del continente con aproximadamente un tercio del total de casos en América central y Sudamérica. En el caso de México, con una prevalencia relativamente baja del 0.3% ocupa el tercer lugar en el continente americano en cuanto a los casos registrados de SIDA, después de Estados Unidos y Brasil. El primer caso en el país fue diagnosticado en 1983, y desde entonces hasta el primer trimestre de 2014 se contaban más de 170,000 casos notificados de SIDA, alrededor de 65,000 personas viviendo con SIDA y aproximadamente 50,000 personas viviendo con VIH. De los casos acumulados de SIDA el 82.1 % de los casos corresponden a hombres y el 17.9% a mujeres.

En México la epidemia continúa siendo concentrada en hombres que tienen sexo con hombres, personas que usan drogas inyectables, hombres trabajadores sexuales y en menor medida en mujeres trabajadoras sexuales y personas privadas de la libertad. A nivel nacional Baja California se encuentra en el lugar número 8 en casos notificados de VIH, por debajo del estado de Veracruz, el Estado de México, el Distrito Federal, Chiapas, Jalisco, Guerrero y Puebla. En este estado se han reportado aproximadamente 1,400 casos de VIH desde el primer caso diagnosticado en el país, 4.3% de casos con respecto al total nacional. De los cuales el 81% corresponde a personas del género masculino y el 19% a población femenina.

1.1.8. Tratamientos antiretrovirales

A la fecha no se ha logrado establecer una terapia dirigida a pacientes infectados con VIH que sea curativa, pero el desarrollo de los antirretrovirales (ARV) a través de los años, desde el descubrimiento del virus, ha brindado grandes logros en la reducción de la morbilidad y mortalidad por esta causa. En 1984 ya se disponía del primer inhibidor nucleosídico de la reverso transcriptasa (NRTI), la zidovudina. Durante una década se aceptaron para su uso nuevos fármacos de la misma familia y es hasta 1996 cuando se comercializa el primer inhibidor de la proteasa (PI) y se instaura el tratamiento de combinación con tres fármacos, Tratamiento Antirretroviral de Gran Actividad (TARGA). Es hasta 1997 cuando se implementan a la terapia los Inhibidores no nucleosídicos de la reverso transcriptasa (NNRTI)^(5, 16). Actualmente hay más de 30 fármacos que han sido aprobados por la FDA (Food and Drugs Administration) dirigidos a cinco de los pasos de replicación del virus, acoplamiento, fusión, transcripción reversa, integración y maduración mediada por proteasa. Los propósitos de la terapia antiretroviral son lograr y mantener la supresión viral en pacientes infectados, reducir la morbilidad y mortalidad asociadas al VIH y disminuir el riesgo de nuevas infecciones por vía sexual.

1.1.8.1 Inhibidores Nucleosidos de la Transcriptasa Reversa

Los NRTI, como su nombre los dice, alteran la función de la enzima reverso transcriptasa del VIH evitando la inserción del material genético viral al de la célula huésped. Los NRTI, requieren de un proceso de fosforilación previo a competir con los nucleósidos naturales en su incorporación a la cadena de ADN naciente generada por la reverso transcriptasa, de esta forma detienen elongación de la cadena de ADN, de esta forma terminando la cadena. Existen ocho antivirales de esta clase aprobados por la FDA: abacavir, didanosina, emtricitabina, lamivudina, stavudina, zalcitabina, zidovudina y tenofovir.

1.1.8.2. Inhibidores no Nucleosidos de la Transcriptasa Reversa

Los NNRTI no necesitan de ningún cambio metabólico para realizar su acción actúan directamente uniéndose a una zona cercana al sitio catalítico de la retro transcriptasa formando un complejo hidrofóbico. Esta unión cambia la conformación espacial del sitio de unión al sustrato y reduce la actividad de la enzima. A diferencia de los NRTI esta familia de antivirales solo es activo anti en VIH-1, ya que no inhibe a la transcriptasa reversa de otros lentivirus como el VIH-2 o en virus de inmunodeficiencia de los simios. Actualmente existen cuatro NNRTI aprobados para su uso: nevirapina, efavirenz, delavirdina y etravirina.

1.1.8.3. Inhibidores de la Proteasa

La proteasa es una enzima del virus encargada de la escisión de las poliproteínas Gag y Gag-Pol que dan lugar a la producción de proteínas funcionales indispensables para la maduración de los nuevos viriones. El rompimiento de Gag origina tres importantes proteínas: p24, p17 p7 que conforman parte del centro del virus, y otras tres pequeñas proteínas: p6, p2 y p1 funcionales en el proceso de exportación viral. La poliproteína Gag-Pol da origen a las enzimas: transcriptasa reversa, integrasa y proteasa. Los inhibidores de la proteasa son diseñados para unirse al sitio activo de esta enzima y se consideran los fármacos antivirales más potentes hasta el momento. Son diez los fármacos aprobados para

su uso dentro de esta clase: amprenavir, atazanavir, darunavir, fosamprenavir, indinavir, lopinavir, nelfinavir, ritonavir, saquinavir y tipranavir.

1.1.8.4. Inhibidores de la integrasa

La integrasa es la enzima encargada de integrar el ADN sintetizado por la transcriptasa reversa al material genético de la célula hospedera. La acción de los inhibidores de la integrasa es posible por dos mecanismos de acción distintos: la unión al complejo entre la integrasa y el ADN viral, o interactuando con los cofactores de ion magnesio en el sitio de acción de la integrasa y también en el ADN. Raltegravir es el primer medicamento de este grupo aprobado para su administración.

1.1.8.5. Inhibidores de la fusión

Son tres los mecanismos que permiten la entrada del VIH a la célula huésped: la unión del virus con el receptor CD4, la unión a co-receptores y la fusión. Los inhibidores de fusión actúan sobre el último paso de entrada del virus a la célula. Enfuvirtida es el primer antoretroviral que ha sido aprobado, es un péptido de 36 aminoácidos que se une a un sitio específico de la glicoproteína transmembrana gp41 evitando los cambios conformacionales necesarios para la entrada del virus a la célula huésped.

1.1.8.6. Combinaciones multiclase

El esquema de tratamiento antirretroviral combinado o TARGA consiste en la administración de tres ARV simultáneamente, con dos mecanismos de acción distintos. Inicialmente la terapia utilizaba dos NRTI y un PI, sin embargo, actualmente los esquemas evolucionan combinando fármacos de cualquiera de las clases antes descritas. El principal objetivo de esta estrategia es reducir la carga viral de los pacientes a niveles indetectables y reestablecer su sistema inmunológico, gracias a ello se disminuye la probabilidad de infecciones

oportunistas o padecimientos asociado a inmunosupresión. La calidad y expectativa de vida también se ve beneficiada ya que a diferencia de la época en los inicios del descubrimiento del SIDA, la mayoría de las personas infectadas morían en cortos periodos de tiempo y en condiciones deplorables, este tipo de tratamiento ha permitido tratar la enfermedad como una infección crónica, generalmente asintomática, con una expectativa de vida similar a la de una persona no infectada. Con el paso de los años se han desarrollado formulaciones farmacéuticas que combinan varios ARV de una misma o de distinta clase en una sola píldora, lo que facilita su administración y mejora el apego a la terapia, ya que en el mejor de los casos la persona solo tiene que tomar una capsula diariamente. Ejemplos de esas presentaciones son: Atripla (tenofovir+emtricitabina+efavirenz), Combivir (zidovudina+lamivudina), Kivexa (lamivudina+abacavir), Truvada (tenofovir+emtricitabina), entre otras.

1.1.8.7. Adherencia a los antiretrovirales

La efectividad del tratamiento antiviral requiere de un alto nivel de adherencia, es decir un alto cumplimiento del régimen farmacológico por parte del paciente. Algunos estudios realizados demuestran que debido a la alta tasa de replicación y mutación del virus es necesaria una adherencia del 95% para mantener la supresión de la replicación viral. Según datos de la OMS solo una tercera parte de las personas bajo TARV lo toman adecuadamente, el incumplimiento del mismo depende de varios factores relacionados con el individuo, la enfermedad, el régimen terapéutico y con el mismo equipo médico.

Algunos investigadores relacionan la edad, sexo, nivel cultural, situación socioeconómica y estado psicológico del individuo como variables para el cumplimiento o no de la terapia. Está comprobado que una persona que cuenta con un hogar establecido reflejará mejores resultados en la terapia que otra en situación de calle, la adicción al alcohol o drogas también es considerada como factores predisponentes para el abandono terapéutico. En relación al estado psicológico del paciente, es importante considerar la percepción y creencias que

éste tenga acerca de la medicación, mientras éste consiente de la necesidad del tratamiento el paciente obtendrá mejores resultados, por otro lado si tiene dudas o se siente bajo situaciones de estrés, depresión o ansiedad muy probablemente habrá fallas en la administración del mismo. La enfermedad también es una variante importante para el cumplimiento de la medicación, ya que se ha probado que pacientes sintomáticos en estadio B o C presentan mayor adherencia que aquellos que se encuentran asintomáticos en estadio A.

En cuanto al régimen terapéutico los efectos adversos y tóxicos, el número de tabletas a consumir diariamente y la frecuencia, tamaño y sabor de ellas, son algunas de las principales causas de incumplimiento. También es importante que el médico tratante antes de implementar cualquier esquema, tome en cuenta los hábitos y horarios del paciente con el propósito de que el régimen sea lo menos intrusivo para su vida cotidiana, con el afán de lograr el mejor cumplimiento. Por ejemplo, para la absorción y efectividad de algunos medicamentos se deben seguir algunos requerimientos nutricionales, es decir, la presencia o ausencia de alimentos junto con la ingesta del fármaco, por lo que es importante considerar los horarios de trabajo y actividades de la persona, en la menor medida que el régimen interfiera con sus rutinas menor será la probabilidad de incumplimiento terapéutico.

La última variable a considerar, no menos importante, es el equipo médico o asistencial encargado de dar seguimiento a la terapia, su deber es brindar confianza y accesibilidad a la persona, al igual que mantener al paciente informando en todo momento de la importancia de la adherencia por medio de talleres, cursos, pláticas, folletos, etc, incluso antes de iniciar cualquier esquema, con la finalidad de concientizar a la persona en cuanto a los beneficios y la responsabilidad que representa la TARV. Resulta de gran importancia manejar todos estos factores en conjunto para lograr el éxito en el uso de la TARV, ya que la falta de adherencia conlleva consecuencias negativas no solo para la persona que vive con VIH, sino también a nivel de salud pública. Una persona que no cumple cabalmente con el esquema terapéutico asignado, que no toma sus medicamentos en los horarios y dosis prescritas o que abandona la terapia por días

completos o meses provoca niveles séricos subóptimos, lo que contribuye a la transmisión, reinfección y aparición de resistencias en el VIH.

1.1.8.8. Toxicidad de los tratamientos antiretrovirales

Al igual que en todos los tratamientos para enfermedades crónicas, como diabetes o hipertensión, el uso de antirretrovirales también produce efectos adversos y toxicidades a largo o corto plazo, y debido a que una vez comenzado el tratamiento debe continuar de por vida sin interrupciones es necesario conocerlas consecuencias más comunes relacionadas a su uso. Entre las complicaciones agudas que pueden presentarse la más frecuente es la toxicidad hepática que aparece en pacientes con factores concomitantes tales como infección por otros virus (p.ej. virus de la hepatitis), alcoholismo, uso de drogas o de otros fármacos, la nevirapina y abacavir son los ARV que presentan toxicidad hepática más comúnmente.

La acidosis láctica es otra reacción aguda grave que puede presentarse con la ingesta de inhibidores de la transcriptasa reversa análogos de nucleósidos, principalmente zidovudina, se caracteriza por la sensación de náusea, vómito, fatiga, dolor abdominal, mialgias, choque y al realizar análisis de laboratorio se encuentra elevación de las enzimas hepáticas y de los niveles de ácido láctico, en caso de presentarse esta complicación se debe suspender por completo el uso del ARV que lo ocasiona. La acidosis láctica es tal vez el efecto adverso más grave que puede aparecer, se ha reportado una mortalidad mayor al 55% en pacientes que la padecen. Otro, tal vez el menos común, de los efectos agudos graves de los medicamentos es la pancreatitis, que aparece en el 2 a 3% de los pacientes, ésta se asocia también al uso de inhibidores de la transcriptasa reversa análogos de nucleósidos.

Algunos otros efectos pueden presentarse a largo plazo tal es el caso de las dislipidemias que se manifiestan en pacientes con otros factores predisponentes como tabaquismo, hipertensión arterial, antecedentes cardiovasculares, diabetes, entre otros; el efecto de los inhibidores de la transcriptasa reversa no nucleósidos y

los inhibidores de la proteasa, excepto atazanavir, incrementa los niveles de triglicéridos y lipoproteínas de baja densidad en sangre, al mismo tiempo que disminuye las de alta densidad, de esta forma provocando un riesgo cardiovascular alto en el paciente.

1.1.9. Farmacoresistencia en el VIH

1.1.9.1 Cambios genéticos en el VIH que confieren farmacoresistencia

El tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA) ha permitido disminuir la progresión a SIDA y aumentar la supervivencia de los pacientes infectados con VIH¹¹⁸, pero estos beneficios pueden verse comprometidos por el desarrollo de una pérdida de susceptibilidad a los antirretrovirales¹¹⁹. La TARGA ha permitido disminuir la progresión a SIDA y aumentar la supervivencia de los pacientes VIH positivo, pero estos beneficios pueden verse comprometidos por el desarrollo de una pérdida de susceptibilidad a los antirretrovirales. La resistencia es consecuencia del desarrollo de mutaciones que aparecen en los genes del VIH que codifican las proteínas virales ya que son la diana de los antirretrovirales. Como resultado, se produce una pérdida total o parcial de la susceptibilidad al inhibidor, invalidando su empleo con fines terapéuticos¹²⁰.

En alrededor el 50% de los pacientes que están tomando tratamiento antirretroviral y presentan viremia detectable se detectan virus con mutaciones de resistencia al menos a una familia de fármacos^{121, 122}. Puesto que los virus con estas mutaciones a menudo muestran resistencia a más de un fármaco, presentan una resistencia cruzada entre familias muy elevado^{123, 124}, la aparición de resistencias compromete la respuesta a muchas opciones futuras de tratamiento. Es importante revisar los mecanismos de resistencias a los antirretrovirales y cómo esta información puede ayudarnos en el manejo de los pacientes con VIH, así como en el diseño del tratamiento antirretroviral.

1.1.9.2. Selección del virus resistente

El VIH, al igual que otros virus con genoma de ARN, presenta una gran variabilidad genética, que se debe fundamentalmente a que la retro-transcriptasa (RT), enzima clave en la replicación del material genético viral, carece de actividad exonucleasa 3'→5', correctora de errores¹²⁵. Por otra parte, puesto que la tasa de replicación del VIH es extraordinaria, del orden de 10×10^{10} partículas virales nuevas cada día, el resultado combinado de ambos fenómenos, junto con la elevada tasa de recombinación de estos virus, hacen posible que en un determinado momento puedan existir en cada sujeto infectado todas y cada una de las posibles variantes del virus, lo que se conoce como estructura genética de quasispecies. Entre el espectro de mutantes presentes de manera natural se encuentran aquellas que causan resistencia a los fármacos antivirales, y su proporción respecto al total de la población viral (del orden de 10×10^{12} partículas virales en cada sujeto infectado) dependerá del grado relativo de capacidad de replicación (fitness) que cada variante tenga en ese ambiente y momento concretos.

Cuando se administra un fármaco, tiene lugar la selección de la variante con una menor susceptibilidad al mismo, que con el tiempo podrá llegar a constituirse como población mayoritaria en el huésped. Cada antirretroviral muestra un mayor o menor grado de susceptibilidad para desarrollar mutaciones de resistencia. De este modo, algunos se definen como fármacos de barrera genética baja para la resistencia, puesto que la presencia de una o dos mutaciones confiere resistencia de alto grado a dicho fármaco, mientras que otros requieren la acumulación de varias mutaciones para presentar cierto grado de resistencia. A estos últimos se les denomina fármacos de barrera genética alta. La TARGA, sin embargo, puede prevenir la aparición de virus resistentes, puesto que es, por lo general, lo suficientemente potente como para suprimir hasta niveles indetectables la replicación del virus¹²⁶. Su administración previene, por lo tanto, la acumulación de mutaciones y el desarrollo de resistencias. Además de la barrera genética, factores como eficacia, seguridad, tolerabilidad, conveniencia y adherencia deben tenerse en cuenta a la hora de diseñar el tratamiento antirretroviral.

1.1.9.3. Mecanismos de resistencia

La mayoría de las mutaciones de resistencia son simples sustituciones de aminoácidos, pero otras se caracterizan por la inserción o delección de uno o más aminoácidos en la secuencia normal de la proteína (RT o proteasa)¹²⁸. Normalmente, las mutaciones de resistencia alteran la forma y las propiedades bioquímicas de las proteínas virales y son capaces de reducir su actividad farmacológica mediante distintos mecanismos. Éstos varían según la familia de antirretrovirales o incluso según fármacos concretos.

1.1.9.4. Resistencia a los inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos (NRTI)

Los NRTI necesitan ser fosforilados por las enzimas celulares, y de esta forma compiten con los dideoxinucleósidos naturales en su incorporación para la síntesis de la nueva cadena de ADN pro viral, provocando su terminación anticipadamente.

Tabla III. Mutaciones de resistencia a los inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos(NRTI).

Fármaco	AZT	d4T	ddl	ABC	TDF	3TC	FTC
Grupo 3 (3 puntos)	T215F/Y	V75M/T T215F/Y	L74I/V K65R	K65R L74I/V Y115F	K65R	M184I/V K65R	M184I/V K65R
Grupo 2 (2 puntos)	M41L K70R L210W T215C/D/E/I/S/V	M41L K65R V75S L210W	T69D/G K70E/G V75M/T T215F/Y	K70E/G M184I/V T215F/Y	K65N K70E/G Y115F T215F/Y		
Grupo 1 (1 punto)	D67E/G/N K219E/N/Q/R/T/W	K65N D67E/G/N T69D/G/N K70R V75A/I/S T215C/D/E/I/S/V K219E/N/Q/R/T/W	M41L K65N D67E/G/N T69N V75A/I/S M184I/V L210W T215C/D/E/I/S/V	M41L K65N D67G/N K70R L210W T215C/D/E/I/S/V	M41L D67E/G/N K70R L210W T215C/D/E/I/S/V	K65N K70E/G T215F/Y	K65N K70E/G T215F/Y
Hipersusceptibilidad (-1 punto)	K65R K70E/G L74V V75I Y181C M184I/V	M184I/V			Y181C M184I/V		
Multiresistencia: Del 66-71 Ins66-71 Q151L/M (complejo) ≥ 5 TAM K65R + M184I/V	I R R R S	I R R R S	I R R R R	I R R R R	I R I R I	I R I R R	I R I I R
Interpretación	≥ 5 = Resistente (R) 4-3 = Resistencia intermedia (I) ≤ 2 = Sensible (S)						

Rojo: aquellas mutaciones que por sí solas comprometen la respuesta al fármaco. **Verde:** mutaciones que producen hipersusceptibilidad y restan 1 punto al cómputo total. Complejo Q151M: A62V, V75I, F77L, F116Y, Q151L/M. TAM: M41L, D67N, K70R, L210W, T215F/Y, K219E/Q. ITIAN:

inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleos(t)idos; AZT: zidovudina; d4T: estavudina; ddI: didanosina; ABC: abacavir; TDF: tenofovir; 3TC: lamivudina; FTC: emtricitabina.

Existen varias mutaciones individuales o grupos de ellas involucradas en la resistencia a los análogos de nucleósidos, y que originan resistencia principalmente a través de dos mecanismos (**Tabla III**). El primero está producido por mutaciones que aumentan el grado de retirada de los terminadores de cadena (p. ej. pirofosforolisis), permitiendo así que continúe la síntesis de la cadena de ADN¹²⁹. El segundo está mediado por mutaciones que permiten a la RT discriminar entre nucleósidos naturales y sintéticos, impidiendo la incorporación del inhibidor¹²⁸. Cada uno de ellos actúa con combinaciones de mutaciones diferentes. Las mutaciones más frecuentes que aparecen en muestras clínicas de pacientes en tratamiento con NRTI son aquellas implicadas en la resistencia al AZT. Aparecen en seis codones (M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y/F y K219Q/E). Aunque inicialmente se pensó que eran específicas del AZT, posteriormente se observaron en pacientes que fracasaban en primera línea al d4T¹³⁰. Son responsables del mecanismo de resistencia mediado por la pirofosforolisis, y comprometen no sólo la actividad de AZT y d4T sino, en grado diverso, la de otros NRTI, como ddI, TDF, ABC e incluso 3TC^{129,130,131}.

Aunque estas mutaciones (TAM, thymidin- associated mutations) no se seleccionan apenas durante la monoterapia con ddI o ABC, si están presentes disminuyen la sensibilidad a estos inhibidores. Excepto para AZT, ninguna TAM individual basta para producir resistencia significativa a otros análogos de nucleósidos. Por lo tanto, la resistencia a través de las TAM requiere la acumulación gradual de las mutaciones que conducen a niveles crecientes de resistencia y a la producción de resistencia cruzada a más análogos de nucleósidos (**Tabla IV**). El cambio M->V en la posición 184 de la RT produce alto nivel de resistencia (> 100 veces) al 3TC (barrera genética baja)¹³². Ésta es la mutación que se selecciona prioritariamente en pacientes que reciben una terapia insuficiente con 3TC o FTC. Aunque M184V puede participar en la resistencia al ABC, no induce una resistencia cruzada significativa a otros nucleósidos. Además, M184V revierte en parte el efecto de las mutaciones del AZT, es decir, los aislados que presentan una pérdida de sensibilidad al AZT por la presencia de M41L + T215Y (u otras) muestran una

recuperación parcial de la sensibilidad al AZT cuando está presente M184V. Este mismo efecto puede observarse para d4T y TDF. Por el contrario, la presencia de M184V incrementa el nivel de resistencia al ABC, ddl, ddC adquirido con las TAM (Tabla IV).

Las mutaciones K65R y L74V se han descrito también en casos de fracaso a tratamientos de primera línea con ddl y ddC. La mutación L74V es particularmente frecuente en pacientes con fracaso a ddl en monoterapia, pero se observa ocasionalmente en pacientes que han recibido este fármaco junto con otros análogos de nucleósidos¹³³. Por otra parte, la principal mutación de resistencia en caso de fracaso de regímenes de primera línea con TDF es ^{K65R}¹³¹. En pacientes pre tratados, la aparición de esta mutación en el fracaso con TDF es < 3%, aunque su pre- valencia va en aumento^{132,133}. Por una parte, la presencia previa de TAM compromete la respuesta al TDF y, por otra, la mutación K65R y las TAM son mutaciones antagónicas, por lo que es difícil encontrarlas simultáneamente. En regímenes que incluyen combinaciones de tres nucleósidos, entre los que se encuentran TDF y 3TC, alrededor de un 66% de los fracasos desarrollan las mutaciones K65R + M184V¹³⁴. La presencia de estas dos mutaciones de manera conjunta compromete la respuesta a todos los nucleósidos, excepto al AZT¹³³.

Tabla IV. Mutaciones de la región gp41 de la envuelta asociada con resistencia a los inhibidores de Enfuvirtida.

HR1										HR2		
G	I	V	Q	Q	Q	N	N	L	L	N	N	S
36	37	38	39	40		42	43	44	45	126	137	138
D	V	A	H	H		T	D	V	M	K	K	A
V		E	R			K	K	M	W			
S		M							S			
E												

*Las mutaciones señaladas en **rojo** en la región HR1 de gp41 producen alto grado de resistencia a ENF (> 10 veces). El resto de mutaciones han sido seleccionadas en fracasos a ENF, aunque por si solas se desconoce su impacto específico en la resistencia. Las mutaciones N126K, N137K y S138A son secundarias y se seleccionan en la región HR2 en combinación con mutaciones en la región HR1 (posiciones 36-45) incrementando el *fitness* viral. N42S es un polimorfismo y no confiere resistencia. S138A es un polimorfismo natural en variantes del grupo O y N del VIH-1. IF: inhibidores de fusión; ENF: enfuvirtida.

Existen, además, diferentes mecanismos de multirresistencia a nucleósidos. El primero de ellos está mediado por el complejo Q151M junto con una serie de mutaciones secundarias: F116Y, A62V, V75I, F77L. Las mutaciones secundarias compensan la pérdida de capacidad de replicación viral que induce la presencia de Q151M¹³⁵. Este complejo puede conferir un elevado grado de resistencia a varios análogos de nucleósidos, salvo al 3TC y al TDF. El segundo genotipo de multirresistencia consiste en la inserción de dos cerinas en la posición 69 de la transcriptasa reversa. Estas inserciones nunca se observan solas, siempre aparecen tras la acumulación de TAM, disparando a niveles muy altos la resistencia a NRTI¹³⁷. La presencia de estos genotipos de multirresistencia en la población pre tratada es < 5%. Sin embargo, entre los genotipos que confieren resistencia cruzada a los NRTI, la combinación de M184V junto con K65R, L74V o más de tres TAM (incluyendo siempre T215Y/F) son los más frecuentes^{136,137}.

1.1.9.5. Resistencia a los inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos (NNRTI)

Los NNRTI se unen a un lugar próximo al centro catalítico de la enzima RT, inhibiendo la replicación del VIH por un desplazamiento de los residuos aspárticos relacionados con el sitio de unión de la polimerasa. Las mutaciones responsables de resistencia a los NNRTI se producen en el bolsillo hidrofóbico (pocket) de unión. Una única mutación puede producir un alto nivel de resistencia a uno o más fármacos de esta familia (barrera genética baja) (**Tabla V**).

La resistencia aparece rápidamente cuando uno de los NNRTI es administrado en monoterapia, o si la supresión viral no es completa. En la mayoría de los ensayos fenotípicos la pérdida de sensibilidad para cada uno de los inhibidores comercializados es de varias decenas a cientos de veces.

Tabla V. Mutaciones de resistencia a los inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos (NNRTI).

Fármaco	NVP	EFV	ETR	RPV
Grupo 3 (3 puntos)	L100I K101P K103N/S/T V106A/M Y181C/I/S/V Y188C/H/L G190A/C/E/Q/S/T/V M230L	L100I K101P K103N/S/T V106A/M Y181C/I/S/V Y188C/H/L G190A/C/E/Q/S/T/V M230L		K101P Y181I/V Y188L
Grupo 2 (2 puntos)	K101E V179F F227C K238N/T Y318F	P225H F227C	L100I K101P E138K F227C Y181C/I/V M230L	K101E* E138K* Y181C F227C M230L
Grupo 1 (1 punto)	A98G K101H/N K103R V108I E138K/Q V179D/E/M P225H F227L/Y	A98G K101E/H/N K103R V108I E138K/Q V179D/E/F/M K238N/T Y318F	A98G K101E/H V106A/I/M E138A/G/Q V179D/E/F/I/L/M/T Y181S Y188L G190A/C/E/Q/S/T/V P225H K238N/T	V90I L100I E138A/G/R/Q V179F/L G190E H221Y M230I
Interpretación	≥ 3 puntos = Resistente (R) ≤ 2 puntos = Sensible (S)			

*M184I incrementa la resistencia a RPV cuando aparece en combinación con E138K o K101E. Polimorfismos frecuentes en subtipos no B en posiciones de resistencia: V90I, A98S; V179I. ITINAN: inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleosidos; NVP: nevirapina; EFV: efavirenz; ETR: etravirina; RPV: rilpivirina.

Las mutaciones que confieren resistencia a NNRTI comprometen en mayor o menor grado la respuesta a todos ellos. El cambio K103N es el más frecuente y produce una pérdida de sensibilidad de 20-50 veces a los tres NNRTI. El cambio en el codón 181 compromete, sobre todo, la sensibilidad a NVP. Otra mutación importante es M230L, que disminuye la sensibilidad a EFV alrededor de 20 veces, 40 a NVP y 60 a DLV3. Actualmente se encuentran en fases avanzadas de estudio nuevos NNRTI que presentan actividad frente a aislados altamente resistentes a NVP y EFV. El TMC125 es un nuevo NNRTI que ha sido diseñado con una elevada barrera genética y es activo frente a virus que contienen hasta tres mutaciones asociadas con resistencia a NNRTI incluyendo Y181C/I33.

1.1.9.6. Resistencia a los inhibidores de la fusión

La entrada del virus en la célula es un proceso que requiere varios pasos. Cada uno de ellos representa una nueva diana para el diseño de antirretrovirales. Así, pues, tendremos inhibidores de la unión del virus al CD4, antagonistas de CCR5 o CXCR4, e inhibidores de la fusión del virus con la membrana celular. Los únicos comercializados hasta el momento son los inhibidores de fusión. Los antagonistas de CCR5 se encuentran en fases avanzadas de estudio en ensayos clínicos^{141, 142}. Nuestro conocimiento sobre la resistencia clínica de los inhibidores de la fusión se limita a la enfuvirtida (ENF), el único fármaco de este tipo utilizado en la actualidad. ENF se ha administrado a pacientes con fracaso a casi todos los antirretrovirales. En estos pacientes, ejerce una fuerte actividad antiviral, pero dado que el resto de antirretrovirales empleados en la misma combinación suelen haber perdido una parte importante de su actividad, la respuesta al fármaco es a menudo transitoria¹⁴³.

Las mutaciones de resistencia a ENF surgen en la subunidad gp41 de la glicoproteína de la envoltura (**Fig. 1**). Las principales mutaciones de resistencia a ENF abarcan del aminoácido 36 al 45 de la gp41, en el dominio HR1, pero conforme avanza la investigación en este campo se están descubriendo nuevas mutaciones. Concretamente, es de esperar que las mutaciones en HR1 se acompañen de otras en HR2 para compensar la reducción de la eficacia del plegamiento HR1/HR2 que se produce como consecuencia de las mutaciones en HR1. Se ha observado un amplio rango de susceptibilidad a ENF en aislados virales de pacientes *naïve* así como en individuos que ya han acumulado mutaciones de resistencia a ENF44. Los determinantes de esta variabilidad parecen ser independientes de polimorfismos en la región HR143. Estudios *in vitro* sugieren que la afinidad de la envuelta del virus por el correceptor, así como el nivel de expresión de los correceptores en la célula diana son, respectivamente, determinantes virales y celulares de la eficacia de los inhibidores de la entrada¹⁴⁴.

De este modo, altos niveles de expresión del correceptor CCR5 en la célula pueden inducir un mayor grado de resistencia a ENF. En cuanto a los antagonistas

de CCR5, poco conocemos de la aparición de resistencias a los mismos. Se han propuesto dos mecanismos posibles: 1) desarrollo de mutaciones en el loop V3 del gen de la envuelta, y 2) cambios en el tropismo del virus de CCR5 a CXCR4. Sin embargo, los estudios in vitro llevados a cabo sugieren que la aparición de resistencias en la región V3 podría ser el mecanismo más frecuente sin observarse hasta ahora resistencia cruzada entre los distintos antagonistas en estudio^{143,145}. En cuanto al cambio de tropismo, estaría más bien mediado por la presencia de poblaciones minoritarias de virus con tropismo CXCR4 en el conjunto de las quasispecies. Éstas emergerían tras la administración de los antagonistas de CCR5 y no por un cambio en el tropismo de los virus que son R5 trópicos^{146,147}.

1.1.9.7. Interpretación de las pruebas de resistencia

Para que las pruebas genotípicas y fenotípicas orienten sobre el tratamiento idóneo en las personas VIH+, sus resultados deben ser sometidos a interpretación. Las empresas que fabrican u ofrecen métodos de análisis de resistencias incorporan métodos propios de interpretación de los datos y adjuntan informes fáciles de entender que ofrecen recomendaciones claras. Sin embargo, uno de los principales retos a los que se enfrentan los investigadores en este campo es el desarrollo de sistemas de interpretación con significado clínico. Un virus definido in vitro como susceptible a un fármaco puede no responder al mismo in vivo, donde muchos otros factores, tales como la concentración e interacciones farmacológicas y la eventual toxicidad, pueden comprometer su eficacia. Asimismo, el hecho de que se evidencie in vitro una reducción de susceptibilidad al mismo no significa necesariamente que se producirá un fracaso. Por último, debemos recordar que los ensayos de resistencias nos proporcionan información sobre las poblaciones virales mayoritarias al momento de practicar el estudio, que desde luego estarán influenciadas por el tratamiento antirretroviral al cual se ha presentado el fracaso, por lo que el hecho de no encontrar una mutación presente no debe interpretarse como que la misma no pueda hallarse en una quasispecies minoritaria y no documentada en el estudio.

1.1.9.8. Transmisión de la farmacoresistencia en el VIH

La transmisión de cepas resistentes a una o más clases de fármacos antirretrovirales es conocida como farmacoresistencia transmitida o resistencia primaria, y frecuentemente es el resultado de un mal control de la medicación del paciente VIH positivo (abandono o mal manejo de TARV) y una fallida campaña de prevención de nuevas infecciones. La OMS clasifica la resistencia transmitida a las clases farmacológicas como baja (<5%), intermedia (5-15%) y alta (>15%), obtenida de un número definido de sujetos con no más de tres años de haber contraído VIH y que no presenten antecedentes de haber recibido tratamiento antirretrovírico.

1.2 JUSTIFICACIÓN

El desarrollo de antirretrovirales representa un inmenso logro ante la lucha contra el VIH a nivel mundial, y actualmente México se encuentra en el proceso de lograr la cobertura universal del tratamiento para las personas viviendo con VIH en el país. Según datos de ONUSIDA, para 2010 México se encontraba en el grupo de países con cobertura antirretroviral entre el 60% y el 79%. Sin embargo la administración de la terapia ARV no asegura un decremento en la carga viral hasta niveles indetectables (menor a 50 copias/ml), factores tales como desapego a la terapia o la aparición de resistencias a los ARV pueden resultar en falla virológica ante el esquema terapéutico de primera línea ocasionando así el cambio a un esquema de rescate, generalmente más costoso.

Se han realizado diversos estudios para establecer la prevalencia de farmacoresistencia debida a mutaciones entre pacientes VIH positivos, sin embargo es escasa la información que se encuentra publicada referente a México, en la investigación que realizó Ávila Ríos y colaboradores en 2011 solo se analizaron muestras de pacientes vírgenes a tratamiento en la República Mexicana, por lo que es de vital importancia que se realicen estudios como este en el que se

involucre también a pacientes que ya se encuentran sometidos a los esquemas de tratamientos que establece la Secretaría de Salud para probar o descartar una diferencia en cuanto al tipo de mutaciones encontradas en pacientes tratados y sin tratamiento. Con la realización de este proyecto se pretende obtener datos epidemiológicos de farmacorresistencia al VIH en la ciudad de Tijuana Baja California, sobre las mutaciones más prevalentes que confieren resistencia a los ARV, con el fin de colaborar en el uso adecuado y racional de los mismos para reducir la necesidad de cambio de esquemas terapéuticos de primera línea por otros de segunda o tercera que resultan más costosos y su acceso es limitado, además de difundir información que pueda ser de utilidad para la Secretaría de Salud en futuras revisiones a los esquemas de tratamiento aplicados en nuestra región, finalmente buscando beneficiar directamente a pacientes bajo tratamiento o que necesitan iniciarlo.

1.3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Durante el 2011, la Organización de las Naciones Unidas y SIDA (ONUSIDA) reportó que para finales del año 2010, cerca de 34 millones de personas vivían con infección por el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) en el mundo. Para la región de América Latina, en la que se incluye a México, la prevalencia de VIH en población adulta se aproxima al 0.4%. En ésta región cerca de 1.5 millones de personas vivían con VIH y durante 2010 ocurrieron cerca de 100 mil nuevas infecciones.

En México la epidemia continúa siendo concentrada en hombres que tienen sexo con hombres, personas que usan drogas inyectables, hombres trabajadores sexuales y en menor medida en mujeres trabajadoras sexuales y personas privadas de la libertad. Al 30 de junio de 2012 se habían diagnosticado y registrado más de 157,000 casos acumulados de SIDA, y más de 41,000 casos acumulados de VIH, de los cuales el 73.5% corresponde a hombres y el 26.5% a mujeres. En Baja California la proporción de casos con respecto al total del país es de 4.1%, después del Distrito Federal (21.9%), Veracruz (13.1%), Edo. De México (5.9%) y Chihuahua (4.8%). Además según información del CENSIDA Baja California, en

conjunto con Veracruz y Tabasco eran hasta 2011 las entidades con mayor mortalidad asociada al SIDA. Debido a que la pandemia por VIH continua expandiéndose, los esfuerzos por abastecer las necesidades de fármacos antirretrovirales (ARV) cada vez son mayores. Para el 2010 México contaba con una cobertura antirretroviral entre 60% y 79%.

A pesar de los grandes beneficios que el implemento de las terapias antirretrovirales ha ofrecido, la mayoría de los pacientes presentan fallo en la terapia ya sea por falta o pérdida de supresión viral. Uno de los inconvenientes asociados a falla virológica, además de las toxicidades, es la resistencia a los fármacos antirretrovirales (ARVs). La resistencia a ARVs está definida por la aparición de mutaciones en el genoma del virus⁽⁴⁾. Estas mutaciones pueden presentarse durante el tratamiento o estar presentes en paciente que aún no han recibido terapia, esto sugiere que la transmisión de cepas resistentes del virus puede darse de un individuo a otro. Actualmente la terapia antirretroviral consiste en el uso de al menos tres fármacos ARV con dos mecanismos de acción diferentes, el mayor beneficio de ésta estrategia de terapia es reducir el tamaño de la población del virus y consecuentemente la probabilidad de que ocurran mutaciones. En México son muy pocos las investigaciones que se han realizado para establecer e identificar la prevalencia de éste tipo de mutaciones en las cepas del VIH circulante en la población. Es por eso que surge la pregunta: cuál es la prevalencia de mutaciones que confieren farmacorresistencia al VIH en pacientes infectados en la ciudad de Tijuana.

1.4 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es la epidemiología molecular y prevalencia de mutaciones que confieren farmacorresistencia al VIH en pacientes infectados en la ciudad de Tijuana Baja California?

1.5 OBJETIVOS

1.5.1. Objetivo General:

Describir la epidemiología molecular y prevalencia de mutaciones que confieren farmacorresistencia al VIH en pacientes infectados en la ciudad de Tijuana Baja California.

1.5.2. Objetivos Específicos:

- 1.- Estandarizar diferentes metodologías de biología molecular para la investigación en VIH.
- 2.-Identificar los diferentes subtipos y formas recombinantes del VIH en una población de Tijuana Baja California.
- 3.-Identificar mutaciones que confieren resistencia en el genes de la proteasa y retrotranscriptasa del VIH.
- 4.-Correlacionar las mutaciones encontradas con la resistencia a los antirretrovirales y su asociación a las variantes virales.

CAPITULO II

2.1 METODOLOGÍA

2.1.1 Población

Nuestra población de estudio será referida por los médicos que colaboran en el Centro Ambulatorio para la Prevención en SIDA e Infecciones de Transmisión Sexual, CAPASITS Tijuana. Se obtendrá un mínimo de 100 muestras sanguíneas provenientes de personas VIH positivas que cumplieron con los siguientes criterios.

- **Criterios de inclusión:**

Pacientes VIH positivos de ambos sexos, mayores de 17 años que den por escrito el consentimiento informado y que hayan presentado, en menos de tres meses atrás, una carga viral por encima de 1000 copias por ml.

- **Criterios de exclusión:**

Pacientes menores de edad y que no se conocía su carga viral a la toma muestra sanguínea.

- **Criterios de eliminación:**

Pacientes VIH positivos sin consentimiento firmado, así como a los pacientes a los cuales no se les haya podido realizar la toma de muestra.

2.1.2. Diseño del estudio

Este estudio es de tipo descriptivo transversal observacional, ya que se procesó una sola muestra de los pacientes con diagnóstico de VIH positivo y no se realizará un seguimiento posterior. El tamaño de la muestra fue calculado considerando un total en Tijuana Baja California de 1000 personas mayores de 18 años con diagnóstico VIH positivo, para el cálculo del tamaño de muestra se consideró un nivel de confianza de 95% ($z=1.96$) y un error muestral de 0.05, lo que nos revela una muestra de 100 participantes.

2.1.3. Variables

Las variables analizadas en la investigación, se definen a continuación (**Tabla VI**) y se obtuvieron mediante el cuestionario aplicado a los participantes, la revisión de expedientes electrónicos SALVAR y el análisis de los datos obtenidos a partir del trabajo experimental, amplificación y secuenciación de las muestras recolectadas.

Tabla VI. Operacionalización de las variables.

<i>Variable</i>	<i>Tipo de variable</i>	<i>Operacionalización</i>	<i>Categorización</i>
Edad	Cuantitativa discreta	Años cumplidos el día de la toma de muestra.	18, 19, 20, 21, 22, 23...años.
Género	Cualitativa dicotómica	Género biológico que pertenezca.	Femenino y Masculino.

Estado civil	Cualitativa nominal	Estado civil	Soltero, casado, viudo, divorciado, unión libre.
Ocupación	Cualitativa nominal	Trabajo que desempeña.	Profesionista, empleado, desempleado, estudiante, ama de casa, otro.
Grado de estudio	Cualitativa nominal	Nivel de estudios del participante.	Ninguno, primaria, secundaria, bachillerato, técnica, profesional.
Sabe leer y escribir	Cualitativa dicotómica	Conocimiento de lectura y escritura.	Si y No.
Estado de nacimiento	Cualitativa nominal	Estado de la república en que nació.	Baja California, Sonora, Michoacán, Estado de México...
Tiempo de radicar en Tijuana	Cuantitativa discreta	Tiempo en años de vivir en la ciudad de Tijuana.	1, 2, 3, 4, 5....
Residencia Fronteriza	Cualitativa dicotómica	Antecedente de radicar en alguna ciudad que sea frontera con México	Si y No
Idioma ingles	Cualitativa dicotómica	Conocimiento del idioma ingles	Si y No
Cruce legal a EU	Cualitativa dicotómica	Capacidad de entrar de forma legal a los Estados Unidos	Si y No
Cruce ilegal a EU	Cualitativa dicotómica	Antecedente de entrar a los Estados Unidos de forma ilegal	Si y No
Deportado	Cualitativa dicotómica	Antecedentes de haber sido deportado a México por el gobierno de los Estados Unidos	Si y No
Residencia en EU	Cualitativa dicotómica	Antecedentes de haber radicado en los Estados Unidos	Si y No
Trabajo en EU	Cualitativa dicotómica	Antecedentes de haber laborado en los Estados Unidos durante el tiempo de radicar en dicho país	Si y No
Atención para VIH en EU	Cualitativa	Antecedente de haber	Si y No

	dicotómica	recibido atención médica y tratamiento para VIH en Estados Unidos.	
Preferencia sexual	Cualitativa nominal	Género con el que el participante se identifica.	Heterosexual, homosexual o bisexual
Trabajador sexual	Cualitativa dicotómica	Antecedente de desempeñar o haber desempeñado el trabajo sexual	Si y No
Relaciones sexuales con sexoservidores	Cualitativa dicotómica	Referencia de haber intercambiado dinero por relaciones sexuales	Si y No
Uso de drogas ilegales	Cualitativa nominal	Uso actual o previo de drogas de abuso	Ninguna, Metanfetaminas, Heroína, Marihuana, Cocaína
Preso en reclusorio	Cualitativa dicotómica	Antecedente de haber sido recluso en algún centro penitenciario	Si y No
Año diagnóstico VIH+	Cuantitativa nominal	Año de la fecha de diagnóstico VIH positivo	1998, 1999, 2000, 2001, 2002...
Lugar de diagnóstico	Cualitativa nominal	Ciudad en la que se diagnosticó VIH positivo	Tijuana, Mexicali, Cd. De México...
CV al momento del diagnóstico	Cuantitativa continua	Primer Carga Viral reportada en SALVAR.	Número de copias de VIH por mililitro de sangre.
CD4 al momento del diagnóstico	Cuantitativa continua	Primer recuento de linfocitos CD4 en SALVAR.	Número de células por milímetro cúbico de sangre.
CV actual	Cuantitativa continua	Carga viral realizada no mayor a tres meses previos a la toma de muestra.	Número de copias de VIH por mililitro de sangre.
CD4 actual	Cuantitativa continua	Recuento de linfocitos CD4 reportado en Salvar no mayor a tres meses previos a la toma de muestra.	Número de células por milímetro cúbico de sangre.
Infecciones	Cualitativa	Co-Infecciones	Sífilis, Gonorrea,

concomitantes	nominal	diagnosticadas previo o al momento de la toma de muestra.	Chlamydia, Herpes, VPH, Tuberculosis, Otro
TARV	Cualitativa dicotómica	Consumo de Tratamiento antirretroviral	Si y No
Esquema de tratamiento	Cualitativa nominal	Número de esquema de tratamiento actual.	1er. a 4to. esquema ARV
Abandono de tratamiento	Cualitativa dicotómica	Antecedente de abandonar el uso de fármacos antirretrovirales	Si y No
Clasificación del VIH	Cualitativa nominal	Subtipo del VIH según se secuencia genética	Subtipos A, B, C, D, F, G, H, J, K y formas recombinantes
Mutaciones en el genoma del VIH	Cualitativa nominal	Cambios en los nucleótidos en los genes de la proteasas y la retro transcriptasa	Se nombran con una inicial que corresponde al nucleótido de la cepa referencia, el número de posición en el genoma y la inicial del nuevo nucleótido, p ej. K65R, M184W.
Farmacorresistencia	Cualitativa nominal	Definida por el análisis de las mutaciones encontradas en la base de datos de la Universidad de Stanford.	Prevalencia en número de pacientes farmacorresistentes por cien.

Variables utilizadas en el proyecto de investigación.

2.1.4. Toma de muestra

La toma de muestra sanguínea se realizó en un lugar perfectamente iluminado, privado y sin tránsito de personas para evitarle estrés a los pacientes. Se localizó una vena adecuada en alguno de los brazos y se desinfectó el área con un algodón humedecido con alcohol al 70%, se colocó el torniquete, y posteriormente se realizó la punción con uso de agujas de toma múltiple con broche de seguridad BD vacutainer.

Se recolectaron 8 ml de sangre total en tubos con anticoagulante EDTA de al completar el volumen requerido de muestra se retiró la aguja y se colocó una torunda con alcohol sobre el sitio de punción ejerciendo presión para detener la hemorragia. Las muestras se identificaron con un número clave consecutivo, iniciales del paciente y fecha. Un criterio para rechazo de muestras fue la presencia de hemolisis. Para asegurar su viabilidad las muestras fueron transportadas y almacenadas hasta su proceso en hieleras a 4°C.

2.1.5. Transporte de muestra

Las formas y procedimientos de embalaje, transporte y disposición final del material utilizado (muestras y desechos) en los procesos del análisis del estudio se elaboró tomando como referencia los siguientes documentos y normas oficiales mexicanas.

1. Organización Mundial de la Salud. Guía para el transporte seguro de sustancias infecciosas y especímenes diagnósticos de la OMS-División para la Vigilancia y el Control de Enfermedades Emergentes y otras Enfermedades Transmisibles, Ginebra, 1997.
2. Norma Oficial Mexicana NOM-051-SCT2/1995, Especificaciones especiales y adicionales para los envases y embalajes de las sustancias peligrosas de la división 6.2 agentes infecciosos.
3. Norma Oficial Mexicana NOM-003-SCT/2000, Características de las etiquetas de envases y embalajes destinadas al transporte de sustancias, materiales y residuos peligrosos.
4. Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.

2.1.6. Aislamiento de leucocitos

El mismo día de la toma las muestras se centrifugaron a 1500 rpm por 10 min para el aislamiento de glóbulos blancos y plasma. En un tubo falcón estéril de

15mL se vertió la banda de células blancas y el tubo se rellenó hasta 15mL con solución de lisis de eritrocitos (cloruro de amonio), el plasma se separó para la precipitación viral que se describe más adelante. Se dejó reposar por 10 minutos a temperatura ambiente, mezclando unas dos a tres veces durante ese reposo, y se centrifugó por 10 minutos a 1500 rpm. El sobrenadante se desechó absorbiendo con una pipeta transfer desechable y el pellet de leucocitos se lavó 2 veces con PBS a temperatura ambiente. Para los lavados se suspendió el pellet celular en 15 ml de PBS y se centrifugó de nuevo a temperatura ambiente por 10 minutos a 2,000 rpm. Después de la última lavada se suspendió el pellet en 1000 μ L de PBS. La extracción de ADN se realizó sobre 500 μ L de la suspensión final de leucocitos (el restante se congeló a -80°C para usos posteriores).

2.1.7. Separación de plasma y precipitación viral

El plasma separado por centrifugación en el paso anterior fue transferido a tubos eppendorf de 1.5 ml y centrifugado a 4°C a una velocidad de 15000 rpm por un lapso de 40 minutos. Se formó un pellet en el que se encuentra el VIH concentrado. El pellet fue directamente usado para la extracción de ARN viral.

2.1.8. Extracción de ARN viral

El pellet de los tubos eppendorf se combinó en un solo tubo, en los casos en que se concentró en más de un tubo. La combinación se realizó decantando con una pipeta pasteur de plástico estéril el plasma y solo dejando 200 μ L en cada uno de los tubos. Se homogeneizó el pellet con ese plasma y se pasó lo de todos los tubos de un mismo paciente a un solo tubo. Una vez con los concentrados virales en un solo tubo se le agregó 900 μ L de solución de lisis viral y 40 μ L de silica (captador viral) se mezcló el tubo en el vortex por 15 minutos y se dejó reposar por 10 minutos. Después del periodo de reposo el tubo se centrifugó a 4°C por 2 minutos a 15000 rpm, el sobrenadante se decantó y el pellet de silica con ARN viral se lavó dos veces con solución de lavado de ARN. El lavado se realizó adicionando 800 μ L de la solución y resuspendiendo el pellet para luego centrifugarlo a 4°C por

1 minuto a 15000 rpm. Posteriormente se lavó otras dos veces con etanol al 75% usando el mismo procedimiento. Tras las lavadas alcohólicas se lavó una última vez con acetona mediante el mismo procedimiento. Después de decantar la acetona se dejó secar por 10 minutos mediante incubación del tubo con la tapa abierta a 56°C, la silica no debe durar más de 1 minuto en incubación después de haberse secado. El pellet de silica se disolvió en 60 µL de agua tratada con DEPC e incubada por 10 minutos a 56°C (tubo tapado) tras la incubación se centrifugó el tubo por 2 minutos a 14000 rpm en temperatura de 4°C. Usando una micropipeta de 100 µL se extrajo la fase acuosa y se pasó a un tubo eppendorf estéril. El ARN extraído pudo ser congelado a -80°C o directamente usado para la retrotranscripción.

2.1.9. Extracción de ADN de leucocitos

A) Digestión proteica

A 500 µL del aislado de leucocitos se añadieron 100 µL de solución de lisis celular y 30 µL proteinasa K. El tubo se mezcló muy bien con el vórtex y se incubó a 37°C con agitación durante toda la noche.

B) Purificación de ADN

Al tubo (con la mezcla turbia digerida durante la noche) se añadieron 500 µL fenol:cloroformo:alcohol isoamilico. Se agitó con el vórtex y se centrifugó a 4°C por 15 minutos a 14000 rpm. Se traspasó cuidadosamente la fase acuosa superior a un tubo nuevo de 1.5 mL y se repitió el paso usando únicamente 400 µL de fenol:cloroformo:alcohol isoamilico. Se le añadió un volumen de cloroformo y se agitó manualmente. Posteriormente se centrifugó a 4°C durante 15 minutos a 14000 rpm. Se traspasó cuidadosamente la fase superior a otro tubo, poniendo atención en no llevarse por aspiración las fases intermedia e inferior.

C) Precipitación de ADN

Se añadieron 2 volúmenes de etanol absoluto. Se agitó suavemente hasta observar la aparición del ADN y se almacenó a -20°C por 15 minutos. Se centrifugó a 14000 rpm por 8 minutos a 4°C. Se decantó el etanol absoluto y el pellet se lavó con etanol al 75% resuspendiendo el pellet en 1 ml de alcohol al 75% y

centrifugando de nuevo a 4°C por 8 minutos a 14000 rpm. Se decantó por última vez el etanol y se dejó secar el pellet por espacio de 10 minutos con la tapa abierta dentro de la cámara de flujo laminar.

D) Elución de ADN

El pellet extraído se eluyó en 100 µL de agua libre de DNAsas adicionando el agua y dejando reposar por 4 horas a 4°C.

2.1.10. Cuantificación de ARN

Se cuantifica el ARN extraído mediante el uso del kit comercial RiboGreen (Invitrogen) el cual permite la cuantificación del ARN mediante una reacción que emite fluorescencia y la correlación con los datos de emisión de una curva de calibración previamente generada usando concentraciones de ARN establecidas. Se diluyeron 5 µL del ARN extraído en 95 µL de buffer TE (libre de nucleasas), al mismo tiempo se diluyó 1 µL del reactivo Ribogreen en 199 µL de buffer TE para usar como blanco. Ambas soluciones se mezclan y se deja incubar por 5 minutos a temperatura ambiente protegiendo la reacción de la luz, para luego detectar la fluorescencia emitida en el fluorospectrofotómetro nanodrop usando 2 µL de la solución final en la microcelda con una excitación a 500 nm y emisión a 525 nm.

2.1.11. Cuantificación de ADN

La cuantificación y comprobación de la calidad del ADN se realiza mediante la absorbancia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro de luz UV/Vis. Se mezclaron 20 µL del ADN extraído con 980 µL de agua libre de nucleasas y se realizó la lectura de absorbancia a ambas longitudes de onda. Se calculó la relación 260/280 para ver la presencia de contaminantes en la extracción y se utilizó la absorbancia a 260 nm para calcular la concentración del ADN usando los factores de dilución correspondientes.

2.1.12. Retrotranscripción

La retrotranscripción es una reacción química que permite la síntesis de una cadena complementaria de ADN (llamada cADN) para una muestra de ARN. El objetivo de este procedimiento es generar una cadena molde de cADN viral para hacer posible la amplificación de los segmentos genéticos del VIH de la Proteasa, Retrotranscriptasa y la tercera región variable (V3 loop) de la gp120 del VIH mediante la reacción en cadena de la polimerasa o PCR. Para la retrotranscripción se usó el kit comercial de Invitrogen, Super Script III. El procedimiento consta de dos pasos. El primer paso es la hibridación de los oligonucleótidos (diseñados al azar e hibridan sobre múltiples regiones del ARN viral) a la cadena blanco de ARN del VIH. La mezcla de reactivos que se utilizó para el paso de hibridación se presenta en la **Tabla VII**.

Tabla VII. Mezcla de hibridación de retrotranscripción.

<i>Reactivo</i>	<i>Volumen</i>
ARN extraído y suspendido en agua DEPC	8.8 μ L
dNTP's 10 mM	1 μ L
Oligonucleotido R 10 μ M	1 μ L
VOLUMEN FINAL	10.8 μ L

Descripción. La mezcla de hibridación para la reacción de retrotranscripción utiliza los siguientes reactivos. ARN: ácido ribonucleico del VIH extraído del plasma de cada paciente y diluido en agua DEPC, doble destilada, esterilizada y filtrada con membrana de 0.2 μ m (DEPC: el dietilpirocarbonato es usado para inhibir la acción de las ARNasas, proteínas capaces de degradar al ARN). dNTP's: los deoxiribonucleotidos son las moléculas usadas para la síntesis del cADN (ADN complementario). Oligonucleótidos: estos son sintetizados al azar con dNTP's se hibridan a multiples regiones del ARN viral lo que permite la amplificación de los 9kb del genoma del VIH.

La mezcla de reactivos que se muestra en la Tabla 1 se incubó en un termociclador a 75°C por un lapso de 5 minutos. Después de pasados los 5

minutos a dicha temperatura, el tubo de reacción se incubó en hielo por 1 minuto. Tras el lapso de incubación en hielo, se realizó el segundo paso de la reacción de retrotranscripción, la síntesis del cADN. Durante este paso se le adicionan los componentes químicos necesarios para que la enzima retrotranscriptasa sintetice una cadena molde de cADN por cada cadena de ARN presente en la muestra. La mezcla química de síntesis se presenta en la **Tabla VIII**.

Tabla VIII. Mezcla química de síntesis de cADN en la retrotranscripción

Reactivo	Volumen
Buffer 10X	2 μ L
25 mM MgCl ₂	4 μ L
0.1 M DTT	2 μ L
RNasa OUT	1 μ L
Retrotranscriptasa	0.2 μ L
VOLUMEN FINAL	9.8 μ L

Descripción. Buffer 10X: este compuesto es un amortiguador salino que consta de 200 mM Tris HCl pH 8.4 y 500 mM KCl y es usado para amortiguar el pH durante la reacción. MgCl₂: el cloruro de magnesio a una concentración final de 5 mM es necesaria para estabilizar los componentes de la reacción. DTT: el ditioneitol es usado para inhibir las ARnasas. RNasa OUT: este compuesto es un inhibidor recombinante que elimina la acción de las ribonucleasas.

La mezcla de síntesis que se muestra en la Tabla 2 se realizó y mantuvo en hielo todo el tiempo. Después de adicionada la mezcla química de síntesis de cADN el tubo se incubó en un termociclador a 25°C por 10 minutos, seguidos de 50 minutos a 55°C y 5 minutos más a 80°C. Después de este ciclo de temperaturas la reacción se congeló a -20°C o se prosiguió directamente a la PCR.

2.1.13. Reacción en Cadena de la Polimerasa

Los segmentos genéticos de la Proteasa, Retrotranscriptasa y el tercer segmento variable de la gp 120 se amplificaron mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) Para la amplificación de cada segmento se usaron los siguientes oligonucleótidos, **Tabla VIII.**

Tabla VIII. Oligonucleótidos usados en la PCR.

<i>Oligonucleótido</i>	<i>Secuencia</i>	<i>T_m</i>
3RT	acc cat cca aag gaa tgg agg	60.6
CIPOL1	gga aga aat ctg ttg act cag	58.8
5RT	aaa tcc ata caa tact cc agt a	53.6
V3Fin	gaa cag gac cag gat cca atg tca gca cag tac aat	60
V3Bin	gcg tta aag ctt ctg ggt ccc ctc ctg ag	60

Descripción. Los oligonucleótidos 3RT, 5RT y V3Bin son reversos mientras que CIPOL1 y V3Fin son derechos. T_m: es la temperatura a la cual la mitad de las moléculas de oligonucleótidos se deshíben de sus secuencias complementarias y su temperatura de hibridación se encuentra generalmente 5°C por debajo de su T_m.

Los oligonucleótidos externos para la región de la Proteasa y la Retrotranscriptasa son 3RT y CIPOL1 (dan un fragmento amplificado de 734 pb) mientras que los oligonucleótidos internos para esas mismas regiones son 3RT y 5RT (dan un fragmento de 534 pb), los oligonucleótidos V3Fin y V3Bin fueron usados en ambas reacciones del protocolo semianidado (estos dan un segmento de amplificación de 406 pb).

Para la PCR se utilizó el kit comercial de Roche Taq Polimerase. El reactivo requiere una cadena de ADN molde, los cebadores, ADN Polimerasa, desoxiribonucleótidos trifosfato (dNTPs) y una solución buffer conteniendo iones de magnesio. El volumen final de la reacción fue de 12.5 µL. Las temperaturas y las concentraciones para las reacciones de amplificación fueron estandarizadas y las condiciones finales fueron las presentadas en la **Tabla IX y Tabla X.** Los segmentos se amplificaron mediante una reacción semi anidada que usa 1 µL de

una dilución en proporción 1:100 de la PCR en la primera ronda sobre una segunda ronda con oligonucleótidos internos complementarios al segmento amplificado en la primera ronda.

Tabla VIX. Componentes de reacción para la amplificación de genes.

<i>Componente</i>	<i>Volumen μL</i> <i>1R</i>	<i>Volumen μL</i> <i>2R</i>
Agua	4.625	6.625
dNTP 10mM c/u	0.5	0.5
Oligo F 10 μ M	1	0.5
Oligo R 10 μ M	1	0.5
cADN	2	1
MgCl ₂ 25mM	2	2
PCR Buffer 10X	1.25	1.25
Polimerasa	0.125	0.125
Volumen total	12.5	12.5

Descripción. La mezcla de PCR utiliza los siguientes reactivos. cADN: las cadenas de ADN complementario sintetizadas durante la RT-PCR son utilizadas como molde para amplificar las secciones genéticas de interés en el VIH. dNTP's: los deoxiribonucleotidos son las moléculas usadas para la síntesis del ADN durante la PCR. Oligonucleótidos: los F son los derechos y los R son los reversos, se utilizan los oligonucleótidos descritos en la tabla VIII que son específicos para las regiones del genoma del VIH. Buffer 10X: este compuesto es un amortiguador salino que consta de 200 mM Tris HCl pH 8.4 y 500 mM KCl y es usado para amortiguar el pH durante la PCR. MgCl₂: el cloruro de magnesio es necesario para estabilizar los componentes de la reacción tales como la polimerasa y los dNTP's.

Las concentraciones de la PCR se obtuvieron mediante la estandarización de reacciones y los oligos de semianidación fueron 3RT y CIPOL1 en la primera ronda, 3RT y 5RT en la segunda ronda para los segmentos de la Proteasa y Retrotranscriptasa. Para el segmento de la gp120 se usó el mismo par de oligonucleótidos en ambas rondas de PCR V3Fin y V3Bin.

Tabla X. Temperaturas y ciclos de reacción de PCR.

<i>Temperatura</i>	<i>Tiempo</i>	
95 °C	10 min	1 ciclo
95 °C	30 seg	35 ciclos
50 °C	30 seg	
72 °C	1 min	
72 °C	15 min	1 ciclo
4 °C	detener	

Descripción: La PCR consta de un paso de desnaturalización inicial que permite la deshibridación de la doble cadena de ADN presente en la muestra, un paso de hibridación que permite la unión de los oligonucleótidos específicos a las regiones de interés del genoma del VIH y por ultimo un paso elongación que permite a la polimeraza la síntesis de cadenas complementarias al ADN del VIH.

Las condiciones sobre las temperaturas y ciclos que se usaron para la PCR se estandarizaron usando el termociclador CFX384 touch real-time PCR detection system (Bio-rad). Para la amplificación de todos los segmentos del VIH se usaron las mismas condiciones de temperatura y cantidad de ciclos. En el primer paso de la PCR, la mezcla de los componentes de la reacción se incubó a temperatura alta (95°C) permitiendo la desnaturalización de las cadenas de cADN molde por 10 minutos, en el segundo paso, se realizaron 35 ciclos de la reacción que se incubó a temperatura alta (95°C), se enfrió hasta la temperatura de hibridación, la cual normalmente está cercana a los 50°C y los cebadores se unen al extremo 5' de cada una de las dos cadenas separadas del cADN molde; en el tercer paso, la temperatura se eleva a 72°C y los cebadores unidos a la cadena de ADN molde sirven como punto de inicio de la síntesis de las nuevas cadenas de ADN esta etapa de incubación tomó 60 segundos, dicha secuencia de tres pasos corresponde a un ciclo de PCR. Posteriormente se realizó un solo ciclo de elongación terminal a 72°C por 15 minutos así como una incubación final de 4°C hasta que la reacción se retira del termociclador y se congeló el producto a -20°C.

2.1.14. Análisis de productos en gel de agarosa

La electroforesis en gel de agarosa es una técnica que permite la separación de muestras de ácidos nucleicos de diferente tamaño en pares de bases. El

fundamento de su desarrollo se basa en la capacidad de la agarosa para formar redes moleculares que impiden a diferentes niveles el paso de moléculas a través de sus poros, así como la misma capacidad del ADN de ser atraído hacia un polo positivo debido a la presencia de los grupos fosfato en su estructura molecular. El tamaño en pares de bases (pb) de los productos obtenidos durante la amplificación por PCR de los segmentos genéticos del VIH se analizó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TE 1X corrida durante 50 minutos a 60 mV. Se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb que permite la comparación de la muestra con dicho marcador.

2.1.15 Extracción del producto de PCR del gel de agarosa

Para extraer el ADN producto de la PCR que se utilizó para la electroforesis, se cortó la banda correspondiente al producto de interés, cuidando de cortar la menor cantidad de agarosa posible y se colocó en un tubo eppendorf estéril y se cubrió en su totalidad con agua DEPC esterilizada y filtrada, se incubó a 4°C por una noche.

2.1.16 Purificación de los productos de PCR

Se realizó con el kit comercial QIAquick siguiendo las instrucciones del fabricante. Se separó el agua DEPC tratada con la que se separó el ADN del gel de agarosa en un tubo eppendorf estéril y se adicionaron 5 volúmenes de buffer PB, se mezcló en vortex. Después se coloca una columna en un tubo colector de 2ml y se pasó la mezcla a la columna, se centrifugó a 13,000 rpm por 60 segundos, el líquido que sobrepasó la columna se descartó y se volvió a colocar la columna para lavar con 750 µl de Buffer PE, se centrifugó nuevamente a la misma velocidad por 60 segundos, descartamos el líquido que traspasó la columna y se volvió a colocar la columna en el tubo, se centrifugó nuevamente 60 segundos. Después se colocó la columna en un tubo eppendorf nuevo y estéril para eluir el ADN, mediante la adición de 50 µl de agua grado molecular y una última centrifugación de 60

minutos. El ADN purificado que pasó al tubo eppendorf, se almacenó a -70°C, hasta su secuenciación.

2.1.17. Secuenciación Sanger

La secuenciación se realizó por medio del método enzimático Sanger que se basa en una reacción de síntesis de ADN, a partir de un ADN de cadena sencilla, en la que se adhieren nucleótidos que no tienen un grupo hidroxilo en su extremo 3' (ddNTP) para evitar que la ADN polimerasa continúe la síntesis con el objetivo de tener una terminación específica en cada cadena formada. El resultado de la reacción son fragmentos de ADN doble cadena de distintos tamaños, posteriormente estos fragmentos son separados en un gel de agarosa para determinar la secuencia de la muestra. Las muestras procesadas fueron enviadas a la Universidad de California San Diego (UCSD) donde fueron secuenciadas.

2.1.18. Análisis de datos

2.1.18.1 Análisis demográfico

El análisis de las variables demográficas se realizó mediante el uso de una plantilla en una hoja de Excel, se calcularon estadísticos descriptivos media y prevalencia para cada una de las variables.

2.1.18.2 Análisis de farmacorresistencia

El análisis se realizó en la base de datos para detección de resistencias en el VIH de la Universidad de Stanford (<http://hivdb.stanford.edu/index.html>). El propósito de este programa es estimar qué tan activo será un ARV contra una variante del VIH en particular comparándolo con la actividad que presenta ante una cepa de referencia. Se introdujeron las secuencias en la forma de análisis de mutaciones en la base de datos, se "pegan" las secuencias en formato fasta en el cuadro de texto. Las mutaciones se definen como las diferencias encontradas entre las secuencias obtenidas y la secuencia de referencia de consenso del subtipo B y

son caracterizadas como: a) mutaciones de la RT.- mutaciones de resistencia-NRTI, mutaciones de resistencia NNRTI y otras mutaciones; b) mutaciones de la PR.- mutaciones mayores de resistencia PI, mutaciones menores de resistencia-PI y otras mutaciones; c) mutaciones de la IN.- mutaciones mayores de resistencia IN, mutaciones menores de resistencia IN y otras mutaciones. La lista de “otras mutaciones” contiene las mutaciones que tienen poco efecto en la susceptibilidad al fármaco, mutaciones que representan secuencias de VIH subtipo no-B.

2.1.18.3 Análisis de subtipos

Al igual que el análisis de farmacorresistencia, la detección de los subtipos del VIH se realizó en la base de datos de la Universidad de Stanford. Se introdujeron las secuencias en la forma de análisis de secuencias en la base de datos, se “pegan” las secuencias en formato fasta en el cuadro de texto. Cada secuencia es comparada con una lista de secuencias de referencias del grupo M del VIH-1 de los subtipos A, B, C, D, F, G, H, J, K, CRF01_AE y CRF02_AG. El programa asigna el subtipo que más se acerca a las secuencias de referencia (Gifford R et al AIDS 2006).

CAPITULO III

3.1 RESULTADOS

3.1.1 Análisis de variables demográficas y factores de riesgo

Se incluyeron 121 pacientes de la clínica CAPASITS de la ciudad de Tijuana diagnosticados VIH positivo remitidos entre las fechas de agosto del 2012 a octubre del 2014, sin embargo solo fue posible secuenciar y analizar 73 muestras. Los resultados obtenidos de la variables demográficas y factores de riesgo fue una media de edad de los participantes de 37 años, divididos en 51 hombres (70%) y 22 mujeres (30%). La mayoría de las personas incluidas en el estudio declararon ser solteras (64%) y el resto mantener una relación en unión libre (16%), casados

(11%) o por ultimo divorciado (5%) y viudo (3%). Se categorizó a los integrantes del proyecto según su grado de estudio 30 de ellos manifestaron tener la secundaria terminada, 24 solo estudiaron hasta la escuela primaria, 9 llegaron a estudios de grado profesional, 6 terminaron estudios de bachillerato y solo uno de los pacientes reveló no tener ningún grado de estudio, no obstante el 100% de los afirmó saber leer y escribir. También se indagó sobre la ocupación actual de los reclutados obteniendo un 37% de personas desempleadas, 31% empleados, 10% amas de casa, 3% profesionistas, 1% estudiantes y un 18% perteneciente a una ocupación distinta de las categorías anteriores (**Tabla XI**).

Tabla XI. Resultados variables demográficas.

N=73	n	%
Edad x= 37 años		
Género Masculino Femenino	51 22	70% 30%
Estado civil Soltero Casado Viudo Divorciado Unión libre	47 8 2 4 12	64% 11% 3% 6% 16%
Ocupación Empleado Desempleado Ama de casa Estudiante Profesionista Otros	23 27 7 1 2 13	31% 37% 10% 1% 3% 18%
Grado de estudio Ninguno Primaria Secundaria Bachillerato Técnica Profesional	1 24 30 6 0 9	1% 33% 41% 8% 0% 12%

Sabe leer y escribir		
Si	73	100%
No	0	0

Frecuencias y resultados de las diferentes variables demográficas (n=73).

Se interrogó a los participantes el tiempo en años que tenían de radicando en Tijuana, se obtuvo una media de 15 años, en la Figura 5 se muestra la distribución de los estados de procedencia de los participantes.

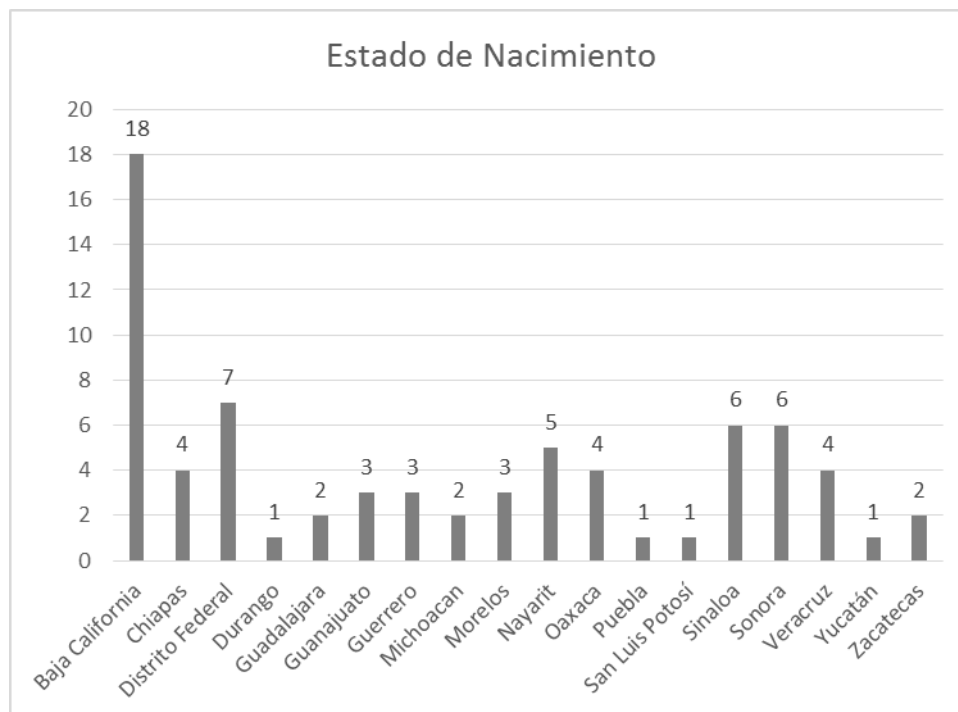


Figura 5. Distribución de estados de nacimiento.

Un factor de riesgo analizado fue la preferencia sexual de los participantes, considerando ambos sexos 42 personas manifestaron ser heterosexuales (57%) y 5 bisexuales (7%), 26 participantes expresaron ser homosexuales (36%) todos ellos pertenecientes al género masculino. En cuanto a la adicción a drogas ilegales, 45 de los pacientes expresaron ser o haber sido adictos a una o más de las drogas cuestionadas: heroína, marihuana, metanfetaminas o cocaína; dentro de este grupo 7 de las personas admitieron haber compartido jeringas con otras personas

alguna vez. Se cuestionó a los participantes si habían sido diagnosticados con alguna de las enfermedades que se mencionan a continuación: sífilis, gonorrea, chlamydia, herpes, virus del papiloma humano o tuberculosis, y 43 de los 73 sujetos de estudio expresaron haber presentado una o más de ellas. El 32.9 % de las personas incluidas en la investigación declararon haber mantenido relaciones sexuales con trabajadoras o trabajadores sexuales y el 27.4% manifestó haber practicado el trabajo sexual, en diferentes estados de México y algunos de Estados Unidos. Un porcentaje similar, el 31%, admitió haber sido recluido en alguna cárcel de México o Estados Unidos.

Tabla XII. Resultados factores de riesgo.

N=73	N	%
Preferencia sexual		
Heterosexual	42	57.5%
Homosexual	26	35.7%
Bisexual	5	6.8%
Trabajador sexual		
Si	20	27.4%
No	53	72.6%
Relaciones sexuales con sexoservidores		
Si	24	32.9%
No	49	67.1%
Adicción a drogas		
Si	45	61.6%
No	28	38.4%
Uso de drogas ilegales		
Ninguna	28	38.4%
Metanfetaminas	33	45.2%
Heroína	13	17.8%
Marihuana	13	17.8%
Cocaína	8	10.9%
Infecciones concomitantes		
Sífilis	21	28.8%
Gonorrea	7	9.6%
Chlamydia	1	1.4%
Herpes	10	13.7%

VPH	2	2.7%
Tuberculosis	27	37%
Preso en reclusorio		
Si	23	31.5%
No	50	68.5%

Frecuencias y resultados de los diferentes factores de riesgo (n=73).

En relación con el país fronterizo Estados Unidos solo el 8.2% de los participantes del proyecto admiten poder ingresar en forma legal al país fronterizo y el 41% admite haber cruzado alguna vez de manera ilegal a la unión americana.

Un total de 31 participantes expresaron haber radicado en algún estado de dicho país de los cuales el 64.5% admite haber sido deportado. De los participantes que por algún periodo radicaron en Estados Unidos el 83.9%(n=26) manifestó haber desempeñado una actividad laboral y solo el 16.% evidenció haber recibido atención médica para el VIH en el país extranjero.(**Tabla XIII**)

Tabla XIII. Resultados residencia fronteriza.

N=73	n	%
Residencia Fronteriza		
Si	15	20.5%
No	58	79.5%
Idioma ingles		
Si	23	31.5%
No	50	68.5%
Cruce legal a EU		
Si	6	8.2%
No	67	91.8%
Cruce ilegal a EU		
Si	30	41%
No	43	59%
Residencia en EU		
Si	31	42.5%
No	42	57.5%
Deportado*		

Si	20	64.5%
No	11	35.5%
Trabajo en EU*		
Si	26	83.9%
No	5	16.1%
Atención para VIH en EU*		
Si	5	16.1%
No	26	83.9%

*Frecuencias y resultados calculados en base al número de personas con antecedente de residencia en EU (n=31).

Se registraron las cargas virales y niveles de linfocitos T CD4 al momento del diagnóstico de los participantes, sin embargo no fue posible conocer esta información para la todos los participantes, debido a falta de información en los expedientes clínicos o a que algunos de los pacientes de la clínica CAPASITS solo llevan su seguimiento en la clínica pero no son diagnosticados en la misma. Además se calculó la media de carga viral y linfocitos T CD4 actuales, es decir, al momento del reclutamiento. Los resultados se muestran en la **tabla XIV**.

Tabla XIV. Datos carga viral y linfocitos T CD4.

N=35	Promedio (x)	Unidades
CV al momento del diagnóstico	115,940.4	Copias/ml
CD4 al momento del diagnóstico	319.97	Células/m ³
N=71	Promedio (x)	Unidades
CV actual	126,904.14	Copias/ml
CD4 actual	322.77	Células/m ³

Se presentan los promedios de la carga viral y linfocitos T CD4 de los participantes en el estudio.

Se incluyeron personas bajo TARV y personas que nunca han recibido terapia farmacológica para VIH, los grupos resultaron ser 52% (n=38) bajo TARV y 48% (n=35) vírgenes a tratamiento, dentro del grupo tratado con medicamento antirretroviral cerca del 66% de los sujetos declararon haber abandonado el tratamiento alguna vez en el pasado. En la misma categoría 24, 7, 5 y 2

participantes se encuentran bajo el primer, segundo, tercer y cuarto esquema de tratamiento respectivamente, mientras que el 100% de ellos toma antirretrovirales del grupo NRTI, 58% NNRTI y 58% PI.

Tabla XV. Información TARV.

N=73	N	%
TARV		
Si	38	52%
No	35	48%
Esquema de tratamiento*	24	63.2%
Primer esquema	7	18.4%
Segundo esquema	5	13.2%
Tercer esquema	2	5.2%
Cuarto esquema		
Abandono de tratamiento*		
Si		
No	25	65.8%
	13	34.2%

*Valores calculados a partir de n=38.

3.1.2 Análisis de farmacoresistencia

Se encontró resistencia debida a mutaciones en 7 participantes, es decir, una prevalencia total del 9.6%, solo 2 de los sujetos presentan mutaciones que confieren resistencia a ambas clases de antirretrovirales, NNRTI y NRTI, el resto tiene mutaciones solo para una de los dos tipos de ARV (**Tabla XVI**). También se clasificó la farmacoresistencia en primaria o transmitida, tomando en cuenta 35 participantes; y secundaria, tomando en cuenta 38 participantes, el resultado para ambas fue de 5.7% (n=2) y 13.2% (n=5) respectivamente (**Fig. 6**).

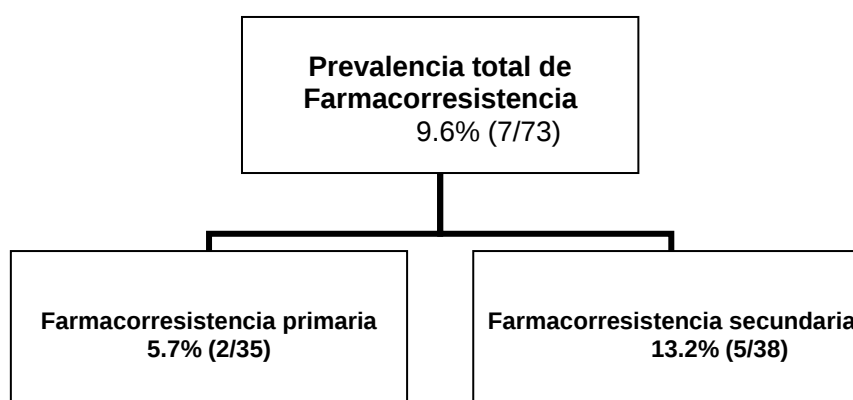
Tabla XVI. Resultados de las Mutaciones de Farmacoresistencia

Número de participante	Mutaciones de farmacoresistencia		
	NRTI	NNRTI	PI
20	D67G, K70R, L741, M184V, K219E	Y181C, G190S	-

25	D67N, K219E	G190S	-
33	-	Y188L	-
65	-	K103N	-
148	M184V	-	-
152	T215C	-	-
156	-	K103N	-

Descripción. Se muestran las mutaciones encontradas en cada uno de los 7 pacientes que resultaron resistentes, y se agrupan por clase de ARV a los que disminuyen la susceptibilidad del virus.

Figura 6 Clasificación de prevalencia por clase de farmacorresistencia



Se muestra la agrupación de farmacorresistencia basada en el estatus de tratamiento de los participantes. Farmacorresistencia primaria: pacientes vírgenes a tratamiento. Farmacorresistencia secundaria: pacientes bajo tratamiento ARV.

Dentro del grupo de participantes en los que se hallamos resistencia, pudimos descubrir farmacorresistencia transmitida en 2 de los sujetos, el paciente número 25 que presentó mutaciones de resistencia a antirretrovirales NNRTI (G190S) y NRTI (D67N, K219E), y el paciente 156 que solo presentó una mutación en el genoma viral que lo hace resistente e NNRTI (K103N).

3.1.3 Análisis de subtipos

Se realizó un análisis genético de las secuencias para determinar el subtipo de VIH más común en la ciudad de Tijuana, el resultado fue 89% (n=65) de subtipo

B y el resto distribuido en cuatro formas recombinantes. Los resultados se muestran en la Figura 7.

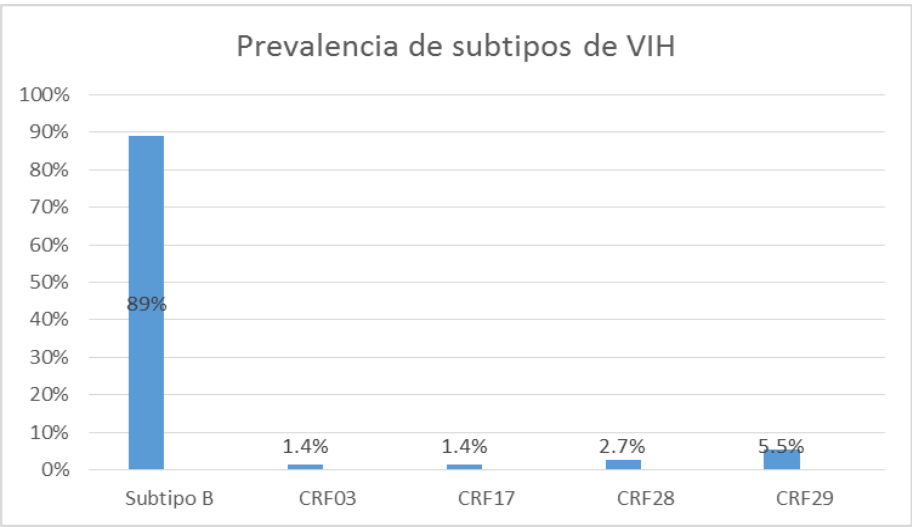
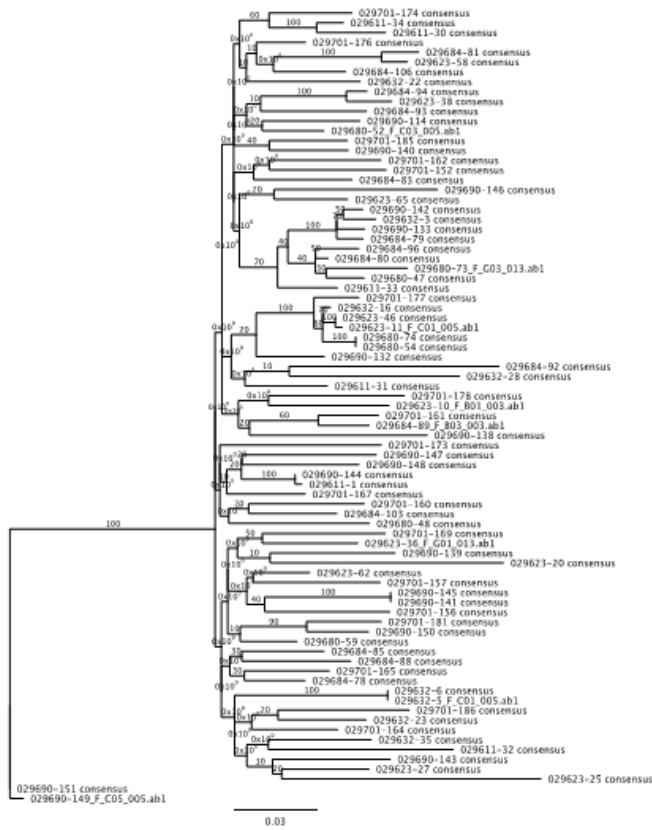


Figura 7. Prevalencia de Subtipos de VIH

Además se construyó un árbol filogenético resultado del análisis de las secuencias de todas las muestras.

Figura 8. Análisis filogenético



CAPITULO IV

4.1 DISCUSIÓN

La finalidad de esta investigación fue determinar por medio de la genotipificación la existencia y prevalencia de virus resistentes a ARV circulantes en la ciudad de Tijuana Baja California, además de describir la distribución de la epidemiología molecular del VIH y la dinámica de transmisión del virus que existe en la frontera Tijuana - Estados Unidos. El análisis se realizó a partir de muestras tomadas en CAPASITS, lugar donde se concentra la mayor parte de personas infectadas con VIH para su atención médica.

Nuestro estudio comenzó con la idea de que la epidemiología molecular del VIH está tomando diferentes patrones de distribución a lo que se ha descrito anteriormente en investigaciones realizadas por otros autores, es por esto que se dio un enfoque particular a la interacción que existe entre los participantes y la frontera con Estados Unidos, además de indagar los factores de riesgo ya conocidos y más comunes para contraer infección por VIH uso de drogas ilegales, tendencias sexuales, trabajo sexual, entre otras.

En la mayoría de los estudios sobre la epidemia de VIH realizados en México se han encontrado solo cepas del VIH-1 subtipo B. Al contrario de nuestros datos que muestran la presencia de varias formas recombinantes CRF que solo habían sido descritas en otros países, lo que sugiere un cambio en el panorama de la epidemia para nuestra ciudad. Si bien obtuvimos una prevalencia del 89% de virus VIH-1 subtipo B, el hecho de que se haya encontrado un 11% de cepas no-B sugiere que la variabilidad genética del VIH puede ser mayor, o llegar a incrementarse en los próximos años y afectar de manera incierta la morbilidad y mortalidad asociada a la infección por VIH. Lo anterior, deja en evidencia la importancia de realizar investigaciones al respecto de mayor alcance que logren responder a dichas interrogantes.

Con los datos obtenidos podemos establecer para la ciudad de Tijuana Baja California una prevalencia total de 9.6%, sin embargo debido a la diversidad en la población de estudio, con respecto al uso o no de medicamentos ARV es necesario hacer un análisis separando a la población en dos grupos: pacientes vírgenes a tratamiento y pacientes bajo TARGA, entonces podemos concluir que obtuvimos una prevalencia de 5.7% (n=2) y 13.2% (n=5) para cada grupo respectivamente.

La mayoría de investigaciones previas relacionadas a farmacorresistencia han sido para calcular resistencia transmitida, uno de los más citados y que incluye dentro de sus participantes a población baja californiana reportó una prevalencia del 6.8% contra el 5.7% encontrado en nuestra muestra. A pesar de la diferencia en el número de muestras y el alcance entre las dos investigaciones, se puede concluir que las cifras son similares, lo que ubica a la ciudad de Tijuana al igual que al resto del país en un nivel intermedio de farmacorresistencia transmitida según los criterios de la OMS.

La cercanía geográfica con Estados Unidos y el tipo de población que analizamos en la que casi un 80% de los participantes corresponde a población migrante que alguna vez radicó en los Estados Unidos nos permite realizar una comparación con estudios realizados del otro lado de la frontera con dicho país, se encontró una prevalencia de farmacorresistencia primaria menor a la encontrada en San Diego California, 5.7% frente a 13.5% reportada por los autores estadounidenses. La diferencia es considerable posiblemente debido a las fechas en las que fueron realizados los estudios, ya que el estudio estadounidense corresponde a un periodo que comenzó 1996, año en el que se instaura la estrategia de TARGA para contrarrestar la epidemia de VIH, caso contrario a nuestro trabajo que se realiza en fechas en las que la TARGA es la primera opción de tratamiento. Por todo lo anterior y sin haber mencionado el distinto manejo clínico del paciente con VIH que se realiza en ambas naciones, sería interesante realizar algún estudio comparativo de las secuencias génicas del VIH entre pacientes de Tijuana Baja California y California Estados Unidos.

El haber encontrado farmacorresistencia primaria sugiere que ésta puede jugar un papel importante en la variación genética del VIH en nuestra población y el haber descrito niveles menores que los conocidos para Estados Unidos pone en evidencia la necesidad de realizar investigación que nos ayude a controlar y prevenir la propagación de virus resistentes en la región fronteriza.

Contrario a los resultados en el grupo virgen a TARV encontramos en el grupo de paciente bajo TARV una prevalencia calculada de farmacorresistencia de 13.2%, mayor a la reportada en estudios realizados también en los Estados Unidos en los que se ha encontrado prevalencia de virus resistentes del 8% y 10%. Estos resultados reflejan una oportunidad de mejora en el manejo y seguimiento del paciente bajo tratamiento farmacológico, ya que como se explicaba anteriormente una de las primeras causas de aparición de mutaciones es causada por el abandono y falta de adherencia al TARV.

En los 7 participantes que resultaron resistentes a ARV se localizó al menos una mutación que genera alta resistencia a NRTI (L74I y M184V) o a NNRTI (Y188L, Y181C, G190S y K103N) lo que significa que todos los pacientes en los que se encontraron mutaciones son altamente resistentes al menos a uno de los tres tratamientos disponibles en los servicios de salud pública en Tijuana Baja California.

También hallamos en 2 pacientes mutaciones que confieren resistencia intermedia y baja a los NRTI como K70R, D67N y, K219E respectivamente. Solo en un paciente se encontró resistencia baja a NNRTI debido a la mutación Y181C.

CAPITULO V

5.1 CONCLUSIONES

Se logró poner a punto metodologías de biología molecular: extracción y purificación de ácidos nucleicos y amplificación de los genes relacionados con farmacorresistencia del VIH.

Se identificó el 89% de prevalencia de virus del VIH subtipo B en Tijuana Baja California, el 11% restante se clasificó dentro de las 4 formas recombinantes CRF03, CRF17, CRF28, CRF29.

Se encontraron mutaciones que confieren farmacorresistencia en 9.6% (n=7) todos ellos en el gen de la retrotranscriptasa, no se determinaron mutaciones en el gen de la proteasa.

Las mutaciones encontradas disminuyen la susceptibilidad a antirretrovirales NNRTI y NRTI, valores de prevalencia de 6.8% y 5.5% respectivamente para cada clase.

CAPITULO VI

6.1 BIBLIOGRAFIA

1. William E Diehl, Nirali Patel, Kate Halm, Welkin E Johnson, Tracking interspecies transmission and long-term evolution of an ancient retrovirus using the genomes of modern mammals, *eLife* 2016;5:e12704. <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.12704>.
2. Gallo, R. (1987a). El primer retrovirus humano. *Investigación y Ciencia*, núm. 125: 44-55.
3. Atwood, W. J.; Berger, J. R.; Kaderman, R.; Tornatore, C. y Major, E. O. (1993). Human immunodeficiency virus type 1 infection of the brain. *Clinical Microbiology Reviews*, 6(4):339-366.
4. Sevilya, Z.; Loya, S.; Hugnes, S. H. y Hizi, A. (2001). The ribonuclease H activity of the reverse transcriptases of human immunodeficiency viruses type 1 and type 2 is affected by the thumb subdomain of the small protein subunits. *Journal of Molecular Biology*, 311: 957-971.
5. Zennou, V., Petit, C., Guetard, D., Nerhbass, U., Montagnier, L., and Charneau, P. (2000). HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. *Cell* 101(2), 173-85.
6. Levy JA. Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Microbiol Rev* 1993;57:183-289.
7. Frankel AD, Young JA. HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem* 1998;1-25.
8. Hu, W. S., and Temin, H. M. (1990b). Genetic consequences of packaging two RNA genomes in one retroviral particle: pseudodiploidy and high rate of genetic recombination. *Proc Natl Acad Sci USA* 87(4), 1556-60.
9. Gaynor R. Cellular transcription factors involved in the regulation of HIV-1 gene expression. *Aids* 1992;6:347-363.
10. Göttinger, H. G., Sodroski, J. G., and Haseltine, W. A. (1989). Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 86(15), 5781-5.
11. Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM, et al. *Pneumocystis carinii* pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med* 1981;305:1425-1431.
12. Masur H, Michelis MA, Greene JB, et al. An outbreak of community-acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction. *N Engl J Med* 1981;305:1431-1438.

13. CDCP. Update on acquired immune deficiency syndrome (AIDS)--United States. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1982,31:507-508, 513-504.
14. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science 1983,220:868-871.
15. Popovic, M., Sarngadharan, M. G., Read, E., and Gallo, R. C. (1984). Detection, isolation and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. Science 224, 497-500.
16. Levy, J. A., Hoffman, A. D., Kramer, S. M., Landis, J. A., Shimabukuro, J., and Oshiro, L. S. (1984). Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. Science 225, 840-842.
17. Gallo R, Salahuddin S, Popovic M, et al. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. Science 1984,224:500-503.
18. Levy JA, Hoffman AD, Kramer SM, Landis JA, Shimabukuro JM, Oshiro LS. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. Science 1984,225:840-842.
19. Temin, H. M., and Mizutani, a. S. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous Sarcoma virus. Nature 226, 1211-1213.
20. Lewis, P., Hensel, M., and Emerman, M. (1992). Human immunodeficiency virus infection of cells arrested in the cell cycle [published erratum appears in EMBO J 1992 Nov;11(11):4249]. Embo J 11(8), 3053-8.
21. Bryant, M., and Ratner, L. (1990). Myristoylation-dependent replication and assembly of human immunodeficiency virus 1. Proc Natl Acad Sci U S A 87(2), 523-7.
22. Göttlinger, H. G., Sodroski, J. G., and Haseltine, W. A. (1989). Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. Proc Natl Acad Sci USA 86(15), 5781-5.
23. Gelderblom, H. R., M. Özel, and Pauli., a. G. (1989). Morphogenesis and morphology of HIV structurefunction relations. Arch Virol 106, 1-13.
24. Goff, S. P. (1990). Retroviral reverse transcriptase: synthesis, structure, and function. J Acquir Immune Defic Syndr 3(8), 817-31.
25. Frankel, A. D., and Young, J. A. (1998). HIV-1: fifteen proteins and an RNA. Annu Rev Biochem 67, 1-25.
26. Feng, S., and Holland, E. C. (1988). HIV-1 tat trans-activation requires the loop sequence within tar. Nature 334(6178), 165-7.

27. Roy, S., Delling, U., Chen, C. H., Rosen, C. A., and Sonenberg, N. (1990). A bulge structure in HIV-1 TAR RNA is required for Tat binding and Tat-mediated transactivation. *Genes Dev* 4(8), 1365-73.
28. Shibuya, H., Irie, K., Ninomiya-Tsuji, J., Goebel, M., Taniguchi, T., and Matsumoto, K. (1992). New human gene encoding a positive modulator of HIV Tat-mediated transactivation. *Nature* 357(6380), 700-2.
29. Gaynor, R. B. (1995). Regulation of HIV-1 gene expression by the transactivator protein Tat. *Curr Top Microbiol Immunol* 193, 51-77.
30. Sodroski, J., Patarca, R., Rosen, C., Wong-Staal, F., and Haseltine, W. (1985). Location of trans-activating region on the genome of human T-cell lymphotropic virus type III. *Science* 229, 74-77.
31. Malim, M. H., Hauber, J., Le, S. Y., Maizel, J. V., and Cullen, B. R. (1989). The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature* 338(6212), 254-7.
32. Ruben, S., Perkins, A., Purcell, R., Joung, K., Sia, R., Burghoff, R., Haseltine, W. A., and Rosen, C. A. (1989). Structural and functional characterization of human immunodeficiency virus tat protein. *J Virol* 63(1), 1-8.
33. Garcia, J. V., and Miller, A. D. (1992). Downregulation of cell surface CD4 by nef. *Res Virol* 143(1), 52-5.
34. Deacon, N. J., Tsykin, A., Solomon, A., Smith, K., Ludford-Menting, M., Hooker, D. J., McPhee, D. A., Greenway, A. L., Ellett, A., Chatfield, C., Lawson, V. A., Crowe, S., Maerz, A., Sonza, S., Leramont, J., Sullivan, J. S., Cunningham, A., Dwyer, D., Dowton, D., and Mills, J. (1995). Genomic Structure of an Attenuated Quasi Species of HIV-1 from a Blood Transfusion Donor and Recipients. *Science* 270, 988-991.
35. Premkumar, D. R. D., X.Z. Ma, R. K. Maitra, B.K. Chakrabarti, J. Salkowitz, B. Yen-Lieberman, M.S. Hirsch, and Kestler, a. H. W. (1996). The nef gene from a long-term HIV type 1 nonprogressor. *AIDS Res Hum Retroviruses* 12 (4), 337-45.
36. Heinzinger, N. K., Bukinsky, M. I., Haggerty, S. A., Ragland, A. M., Kewalramani, V., Lee, M. A., Gendelman, H. E., Ratner, L., Stevenson, M., and Emerman, M. (1994). The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(15), 7311-5.
37. Bartz, S. R., Rogel, M. E., and Emerman, M. (1996). Human immunodeficiency virus type 1 cell cycle control: Vpr is cytostatic and mediates G2 accumulation by a mechanism which differs from DNA damage checkpoint control. *J Virol* 70, 2324-2331.

38. Klimkait, T., Strebel, K., Hoggan, M., Martin, M. A., and J.M.Orenstein (1990). The human immunodeficiency virus type 1-specific protein vpu is required for efficient virus maturation and release. *J Virol* 64, 621-629.
39. Dalglish AG, Beverly PC, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA. The CD4(T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 1984,312:763-767.
40. Klatzmann D, Champagne E, Chamaret S, et al. lymphocyte T4 molecule behaves as receptor for human retrovirus LAV. *Nature* 1984,312:767-76856.
41. Fauci, A. S. (1996). Resistance to HIV-1 infection: It's in the genes. *Nature Medicine* 2, 966-967.
42. Zhang, L., Carruthers, C. D., He, T., Huang, Y., Cao, Y., Wang, G., Hahn, B., and Ho, D. D. (1997). HIV Type 1 Subtypes, Coreceptor Usage, and CCR5 Polymorphism. *AIDS Research and Human Retroviruses* 13, 1357-1365.
43. Choe H, Farzan M, Sun Y, et al. The b-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* 1996,85:1135-1138.
44. Rinaldo, C. R., Jr., Gupta, P., Huang, X. L., Fan, Z., Mullins, J. I., Gange, S., Farzadegan, H., Shankarappa, R., Munoz, A., and Margolick, J. B. (1998). Anti-HIV type 1 memory cytotoxic T lymphocyte responses associated with changes in CD4+ T cell numbers in progression of HIV type 1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 14(16), 1423-33.
45. Varmus H. Retroviruses. *Science* 1988,240:1427-1435.
46. Gaynor R. Cellular transcription factors involved in the regulation of HIV-1 gene expression [published erratum appears in *AIDS* 1992 Jun;6(6):following 606]. *AIDS* 1992,6:347-363.
47. Chang DD, Sharp PA. Messenger RNA transport and HIV rev regulation. *Science* 1990,249:614-615.
48. Perelson, A. S., Essunger, P., Cao, Y., Vesanen, M., Hurley, A., Saksela, K., Markowitz, M., and Ho, D. D. (1997). Decay characteristics of HIV-1-infected compartments during combination therapy. *Nature* 387, 188-191.
49. Perelson, A. S., Neumann, A. U., Markowitz, M., Leonard, J. M., and Ho, D. D. (1996). HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science* 271(5255), 1582-6.
50. Grossman, Z., Meier-Schellersheim, M., Paul, W. E., and Picker, L. J. (2006). Pathogenesis of HIV infection: what the virus spares is as important as what it destroys. *Nat Med* 12(3), 289-95.

51. Tindall B, Cooper DA. Primary HIV infection: host responses and intervention strategies. *AIDS* 1991;5:1-14.
52. Borrow, P., Lewicki, H., Wei, X., Horwitz, M. S., Pfeffer, N., Meyers, H., Nelson, J. A., Gairin, J. E., Hahn, B. H., Oldstone, M. B. A., and Shaw, G. M. (1997). Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary demonstrated by rapid selection of CTL escape virus. *Nature Medicine* 3, 205-211.
53. Gaines H, von Sydow MA, von Stedingk LV, et al. Immunological changes in primary HIV-1 infection. *AIDS* 1990;4:995-999.
54. Mellors, J. W., Kingsley, L. A., Rinaldo, J. C. R., Todd, J. A., Hoo, B. S., Kokka, R. P., and Gupta, P. (1995). Quantitation of HIV-1 RNA in Plasma Predicts Outcome after Seroconversion. *Ann Intern Med* 122, 573-579.
55. Mellors, J. W., Rinaldo, C. R., Jr., Gupta, P., White, R. M., Todd, J. A., and Kingsley, L. A. (1996). Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science* 272(5265), 1167-70.
56. Embretson, J., Zupancic, M., Ribas, J. L., Burke, A., Racz, P., Tenner-Racz, K., and Haase, A. T. (1993). Massive covert infection of helper T lymphocytes and macrophages by HIV during the incubation period of AIDS. *Nature* 362, 359-362.
57. Pantaleo, G., Graziosi, C., Demarest, J. F., Butini, L., Montroni, M., Fox, C. H., Orenstein, J. M., Kotler, D. P., and Fauci, A. S. (1993). HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature* 362, 355-358.
58. Silvestri, G., and Feinberg, M. B. (2003). Turnover of lymphocytes and conceptual paradigms in HIV infection. *J Clin Invest* 112(6), 821-4.
59. Gange, S. J., Mellors, J. W., Lau, B., Detels, R., Phair, J. P., Munoz, A., and Margolick, J. B. (2001). Longitudinal patterns of HIV type 1 RNA among individuals with late disease progression. *AIDS Res Hum Retroviruses* 17(13), 1223-9.
60. Lang, W., Perkins, H., Anderson, R. E., Royce, R., Jewell, N., and Winkelstein, W., Jr. (1989). Patterns of T lymphocyte changes with human immunodeficiency virus infection: from seroconversion to the development of AIDS. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2(1), 63-9.
61. Goudsmit, J., Bogaards, J. A., Jurriaans, S., Schuitemaker, H., Lange, J. M., Coutinho, R. A., and Weverling, G. J. (2002). Naturally HIV-1 seroconverters with lowest viral load have best prognosis, but in time lose control of viraemia. *Aids* 16(5), 791-3.
62. Rodes, B., Toro, C., Paxinos, E., Poveda, E., Martinez-Padial, M., Benito, J. M., Jimenez, V., Wrin, T., Bassani, S., and Soriano, V. (2004). Differences in disease

- progression in a cohort of longterm non-progressors after more than 16 years of HIV-1 infection. *Aids* 18(8), 1109-16.
63. CDC. Administration of zidovudine during late pregnancy and delivery to prevent perinatal HIV transmission. *MMWR* 1998; 47:151-154.
 64. Rawlison K, Zubrow A, Harris M, Jackson V, Chao S. Disseminated Kaposi's sarcome in pregnancy: a manifestation of Acquired Immunodeficiency Syndrome. *Obstet Gynaecol* 1984; 25:63-65.
 65. Connor EM, Sperling RS, Gelber R, et al. Reduction of maternal-infant transmission of human immunodeficiency virus type 1 with zidovudine treatment. Pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 076 Study Group. *N Engl J Med* 1994,331:1173-1180.
 66. Bryson YJ, Luzuriaga K, Sullivan JL, Wara DW. Proposed definitions for in utero versus intrapartum transmission of HIV-1 [letter]. *Presse Med* 1992,21:1686.
 67. Goedert JJ, Duliege AM, Amos CI, Felton S, Biggar RJ. High risk of HIV-1 infection for first-born twins. The International Registry of HIV-exposed Twins [see comments]. *Lancet* 1991,338:1471-1475.
 68. Simonon A, Lepage P, Karita E, et al. An assessment of the timing of mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus type 1 by means of polymerase chain reaction. *J Acquir Immun Def Syndr* 1994:952-957.
 69. Mayaux MJ, Burgard M, Teglas JP, et al. Neonatal characteristics in rapidly progressive perinatally acquired HIV-1 disease. The French Pediatric HIV Infection Study Group. *JAMA* 1996,275:606-610.
 70. Maldonado Y. Human immunodeficiency virus HIV and acquired immunodeficiency syndrome. In: *Principle and practice of Pediatric Infectious Disease*. Edited by Livingston Ca. 4th ed; 1997:2169-2226.
 71. Eastman PS, Shapiro DE, Coombs RW, et al. Maternal viral genotypic zidovudine resistance and infrequent failure of zidovudine therapy to prevent perinatal transmission of human immunodeficiency virus type 1 in pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 076. *J Infect Dis* 1998,177:557-564.
 72. Samson M, Libert F, Doranz B, et al. Resistance to HIV-1 infection in Caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* 1996,382:722-725.
 73. Huang Y, Paxton W, Wolinsky S, et al. The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression. *Nat Med* 1996,2:1240-1243.
 74. Lapointe N, Michaud J, Pekovic D, Chausseau J, Dupuy J. Transplacental transmission of HTLVII virus. *N Engl J Med* 1985; 312:1325-6.

75. Brandt CD, Sison AV, Rakusan TA, et al.: HIV DNA blood levels in vertically infected pediatric patients: variations with age, association with disease progression, and comparison with blood levels in infected mothers. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1996, 13:254–261.
76. Shafer A. The effects of pregnancy on the natural evolution of HIV infection. The experience of Berlin. *Infection a HIV chez la mère et l'enfant*. PJ Berrebi A, Tricoire J. Pontonnier G eds. Toulouse 1988. 105-125
77. Study TEC. Natural history of vertically acquired human immunodeficiency virus infection. *Pediatrics* 1994:815-819.
78. Barnhart HX, Caldwell MB, Thomas P, et al. Natural history of human immunodeficiency virus disease in perinatally infected children: an analysis from the Pediatric Spectrum of Disease Project. *Pediatrics* 1996,97:710-716.
79. Galli L, De Martino M, Tovo PA, et al. Onset of clinical signs in children with HIV-1 perinatal infection. *AIDS* 1995,9:455-461.
80. Leroy V, Newell ML, Dabis F, et al. International multicentre pooled analysis of late postnatal mother-to-child transmission of HIV-1 infection. Ghent International Working Group on Mother-to-Child Transmission of HIV [published erratum appears in *Lancet* 1998 Oct 3;352(9134):1154] [see comments]. *Lancet* 1998,352:597-600.
81. Pliner V, Weedon J, Thomas PA, et al. Incubation period of HIV-1 in perinatally infected children. New York City Perinatal HIV Transmission Collaborative Study Group. *AIDS* 1998,12:759-766.
82. Blanche S, Newell ML, Mayaux MJ, et al. Morbidity and mortality in Europe an children vertically infected by HIV- 1. The French Pediatric HIV Infection Study Group and European Collaborative Study. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1997,14:442-450.
83. Thiry L, Sprecher S, Jonkhaeer T. Isolation of AIDS virus from cell-free breast milk of three healthy virus carriers. *Lancet* 1985; 2:891-2.
84. Newell M, Peckham C, Lepage P. HIV-I infection in pregnancy: implications for women and children. *AIDS* 1990.
85. Oxtoby,M. Human immunodeficiency virus and other viruses in human milk: placing the issues in broader perspective. *Pediatr Infect Dis* 1988; 7: 825-35.
86. Chavez A. Alvarez AM, Wu E, Peña A, Vizueta E : Evolucion de la Transmision vertical de la infeccion por VIH en Chile *Rev Chil Infectology*. 2007; 24: 368-371
87. Palumbo P, Clinical Virology of pediatric HIV disease. *Handbook of Pediatric HIV care*. Zeichner SL. Read JS Eds, Lippincott Williams and Wilkins, USA 1999; 63-75.

88. Morris CR, Araba-Owoleye L, Spector SA, et al: Disease patterns and survival after acquired immunodeficiency virus-infected children, *Pediatric Infect. Dis J* 1996; 15: 321-328
89. Abuzantoin OR, Hanson IC. Organ-Specific Manifestations of HIV in children. *Ped Clin N AMER* 2000 47: 79-108
90. CDC Guidelines for the Use on Antiretroviral Agents in Pediatric HIV infection. *MMWR Morbid Mortal Wkly Rep* 1998 47: (RR-4) : 1-43 puestas desde el dia 01/03/99 *MMWR* 2009, Feb 23; 1-139 en <http://AIDSinfo.nih.gov>
91. European Collaborative Study. Management of vertically HIV infected children in Europe *Acta Paediatr* 2003; 92:246-250.
92. King SM, American Academy of Pediatrics Committee on pediatrics AIDS American Academy of pediatrics infectious Diseases and immunization Committee. Evaluation and treatment of the human immunodeficiency virus -1- exposed infant. *Pediatrics*. 2004; 114 (2) : 497-505.
93. Anabwani GM, Woldestadik EA and Kline MW. Treatment of Human Immunodeficiency Virus (HIV) in children using Antiretroviral Drugs . *Semin Pediatr Dis* 2005; 16: 116-124
94. Crowley s, Kekitiinwa A and Vaz P. Clinical management of HIV infection in children . *Curr Opin HIV AIDS*. 2007; 2: 410-415
95. Gray L. Newell ML, Thorne C, et al and European Collaborative Study . Fluctuations in symptoms in human immunodeficiency virus-infected children: the first 10 years of life. *Pediatrics*, 2001 . 108(1) : 116-22
96. WHO. Antiretroviral therapy of HIV in infants and children in resource-limited settings. Toward universal access . Switzerland. 2006 : 1-71 en [http:// www.who.int/hiv/en](http://www.who.int/hiv/en).
97. De Rossi A. Virus-host interactions in paediatric HIV-1 infection. *Curr Opinion in HIV and AIDS* 2007 ; 2: 399-404
98. Watson DC, Farley JJ, Efficacy of and adherence to highly active antiretroviral therapy in children infected with human immunodeficiency virus type 1. *Pediatr Infect. Dis J*. 1999. 18(8) :682-9
99. L homme R, Warris A , Gibb D, et al . Children with HIV are not small adults: whats is different in pharmacology ? *Curr Opin HIV AIDS* 2007; 2: 405-408
100. European Collaborative Study . Age-related standars fot T lymphocyte subsets based on uninfected children born to human immunodeficiency virus-1 infected woman. The Eurpan Collaborative Study . *Pediatric Infect Dis J*.1992 11(12): 1018-26
101. Walker AS, Doerholt K, Sharland M, et al. response to highly active antiretroviral therapy varies with age: the UK and Ireland Collaborative HIV Paediatric Study. *AIDS* 2004 18(14): 1915-24.

102. Dunn D. HIV Prognostics Markers Collaborative Study Group. Short term risk of disease progression in HIV infected children receiving no antiretroviral therapy of zidovudine monotherapy ; e meta-analysis Lancet 2003; 362: 1605-11.
103. Dunn D, Woodburn P, Duong T, et al for the Paediatric Prognostic Markers Collaborative Study and the CASCADE Collaboration. Current Cd4 Cell Count and short term risk of AIDS and Death before the availability of effective antiretroviral therapy in HIV infected Children and Adults. J Infection Dis J 2008 ; 197: 398-404.
104. Faye A, Bertone C, Teglas JP, et al. Early multitherapy including a protease inhibitor for human immunodeficiency virus type 1 infected infants . Pediatr Infect Dis J .2002. 21(6) ; 518-25
105. McIntosh K, Shevitz A, Zaknun D, et al, Age-and time related changes in extra-cellular viral load in children vertically infected by human immunodeficiency virus . Pediatr Infect Dis J, 1996 15(12) : 1087-91 .
106. Colgorove RC, Pitt J, Chung PH, et al . Selective vertical transmission of HIV-1 antiretroviral resistance mutation AIDS, 1998 12 (17) :2281-8.
107. Eshleman SH, Mracna M, Guay LA, et al Selection and fading of resistance mutations in women and infants receiving nevirapine to prevent HIV-1 vertical transmission (HIVNET012) AIDS 2001, 15(15): 1951-7 therapy . Pediatr Infect Dis J, 2005.24(4) :352-7
108. F. Mompoux.F, Sirvent N. Cattalorda J, mariani R and Lefevre JC: Stavudine, Lamivudine and Indinavir in children with advanced HIV-1 infection preliminary experience AIDS 1997; 11:11523-24
109. Melvin AJ, Mohan KM, Arcuino LA, Endestein RE, Frenkel LM : Clinical, Virologic and Immunologic responses in children with advanced HIV type 1 diseases treated with PI. Pediatric Infectious diseases Child 1997 ;16 : 968-74
110. Rutstein RM, Feingold A, Meislich D, Word B. Rudy B.:Protease inhibitor therapy in children with perinatally acquired HIV infection. AIDS 1997;11: F107-11
111. Muller BU, Nelson RP Jr: phase I/II study of the PI, Ritonavir in children with HIV infection. Pediatrics 1998 ; 101 (3pt 1) : 335-343
112. Jankelevich J : Long term activity of IDV/ZDV/3TC in HIV-1 infected children: results of a phase I/II study 5th Conference on retrovirus and opportunistic infection Chicago 1998
113. Douglas CW , Farley JJ, Lovelace S and Vink P.: Efficacy and adherence to Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART) in HIV-1 infected children 5Th Conference on retrovirus and opportunistic infections February 1-5 1998 Sheraton Chicago Hotel , Chicago IL.

114. Kline MW, Fletcher CV, Harris AT, Brundage RC, Evans KD, Simon C and Callers NR: One year follow up of HIV infected children receiving combination therapy with Indinavir , Stavudine (d4T), and didanosine (ddI), 5th Conference on retrovirus and opportunistic infection, February 1-5 1998, Sheraton Chicago Hotel ,Chicago IL.
115. Pelton SI, Yogeb R and Johnson D, Changes in viral load and immunologic makers in children treated with triple therapy including Ritonavir. 5Th Conference on retrovirus and opportunistic infection , February 1-5 1998. Sheraton Chicago Hotel Chicago IL.
116. Febo I, Chantry C, Lugo L : Use of Ritonavir in combination with nucleoside reverse transcriptase inhibitor agents in children and adolescents with perinatally acquired HIV infection 5Th Conference on retrovirus and opportunistic infection , February 1-5 1998 . Sheraton Chicago Hotel, Chicago IL.
117. Fletcher CV, Kline MW, Brundage RC, Buss EN, Steimer JL, Calles NR, Moreau EL, Eason M, Delora P, Deuff F. Farmacologic characteristic s of Saquinavir soft gelatin capsules (SQV-SGC) given with nucleoside antiretroviral agents (NRTIs) with and without Nelfinavir in HIV infected children 5Th Conference on retrovirus and opportunistic infection, February 1-5 , 1998 Sheraton Chicago Hotel , Chicago IL.
118. Nielsen K. Mother- to child transmission of HIV. The state of the art 38Th Interscience Conference on antimicrobial Agents and Chemotherapy , Sep 1999.
119. Chiriboga C.A., Fleishman S., Champion S., Gaye-Robinson L., Abrams E.J. (2005). Incidence and prevalence of HIV encephalopathy in children with HIV infection receiving highly active anti-retroviral therapy (HAART). J Pediatr, 146(3):402-7.
120. Bennett D, Camacho R, Otelea D, et al. Drug resistance mutations for surveillance of transmitted HIV-1 drug-resistance: 2009 update. PloS One. 2009;4:e4724.
121. US Food and Drug Administration. Drugs used in the treatment of HIV Infection, 2008.
122. Adams J, Patel N, Mankaryous N, et al. Nonnucleotide reverse transcriptase inhibitor resistance and the role of the second-generation agents. Ann Pharmacother. 2010;44:157-65.
123. Anta L, Llibre J, Poveda E, et al. Rilpivirine resistance mutations in HIV Patients mailing non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors-based therapies. AIDS. 2012.
124. Novak, R.M., Chen, L., MacArthur, R.D. y cols. Prevalence of antiretroviral drug resistance mutations in chronically HIV-infected, treatment-naïve patients: Implications for routine resistance screening before initiation of antiretroviral therapy. Clin Infect Dis 2005; 40: 468-474.

125. Wensing, A.M., van de Vijner, D.A., Angarano, G. y cols. Prevalence of drug-resistant HIV-1 variants in untreated individuals in Europe: Implications for clinical management. *J Infect Dis* 2005; 192: 958-966.
126. Betancor G, Garriga C, Puertas MC, et al. Clinical, virological and biochemical evidence supporting the clustering of HIV-1 reverse transcriptase polymorphism R284K and dthymidine analogue resistance mutations M41L, L210W and T215Y in patients failing antiretroviral therapy. *Retrovirol.* 2012;9:68.
127. Perelson, A.S., Neumann, A.U., Markowitz, M., Leonard, J.M., Ho, D.D. HIV-1 dynamics in vivo: Virion clearance rate, infected cell life-span and viral generation time. *Science* 1996; 271: 1582-1586.
128. Asahchop E, Oliveira M, Wainberg M, et al. Characterization of the E138K resistance mutation in HIV-1 reverse transcriptase conferring susceptibility to etravirine in B and non-B HIV-1 subtypes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55:600-7.
129. Bennett D, Camacho R, Otelea D, et al. Drug resistance mutations for surveillance of transmitted HIV-1 drug-resistance: 2009 update. *PLoS One.* 2009;4:e4724.
130. Geretti A M. Clinical implications of HIV drug resistance to nucleoside and nucleotide transcriptase inhibitors. *AIDS rev* 2006; 8: 210-20.
131. Clavel F, Hance AJ. HIV Drug resistance. *N Engl J Med* 2004; 350; 10: 1023-35.
132. Johnson V A, Brun-Vézinet F, Clotet B. Update of the drug resistance mutations in HIV-1: December 2010. *International AIDS Society-USA* 2010; 18 (5): 156-63.
133. Llibre M J, Shapiro M J, Bonaventura C. Clinical implications of genotypic resistance to the newer antirretroviral drugs in HIV-1 infected patients with virological failure. *Clin Infect Dis* 2010; 50 (6): 872-81.
134. Paredes Roger and Buenaventura C. Clinic management of HIV-1 resistance. *Antivir Res* 2010; 85: 245-65.
135. Vingerhoets J, Peeters M, Azijn H, Hoogstoel A, Nijs S, De Bethune MP, et al.
136. An update of the list of NNRTI mutations associated with decreased virologic response etravirine (ETV): multivariate analyses on the pooled DUET-1 and DUET-2 clinical trial data the Proceedings of the XVII International Drug Resistance Workshop. Sitges, Spain. 10 junio 2008. Abstract 24.
137. Perno C F, Svicher V, Ceccherini-Silberstein F. Novel drug resistance mutations in HIV: Recognition and clinical relevance. *AIDS Rev* 2006; 8: 179-190.
138. García F, Álvarez M, Bernal C, et al. Laboratory diagnosis of HIV infection, viral tropism and resistance to antiretrovirals. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011;29:297-307.
139. García F, Álvarez M, Fox Z, et al. Predicting antiretroviral drug resistance from the latest or the cumulative genotype. *Antivir Ther.* 2011;16:373-82.

140. Nijhuis M, van Maarseveen N M, Verheyen J, Boucher C. Novel mechanisms of HIV protease inhibitor resistance. *Curr Opin HIV AIDS* 2008;3: 627-32.
141. Desbois D, Roquebert B, Peytavin G, et al. In vitro phenotypic susceptibility of human immunodeficiency virus type 2 clinical isolates to protease inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52:1545-8.
142. Sterrantino G, Zaccarelli M, Trotta M, et al. Interpretation of genotypic resistance to predict darunavir/ritonavir failure in antiretroviral experienced patients. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2012;59:170-2.
143. Wei X, Decker J M, Liu H. Emergence of resistant human immunodeficiency virus type 1 in patients receiving fusion inhibitor (T-20) monotherapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 1896-905.
144. Urdaneta A, Vives M. Update in antiretroviral therapy: entry inhibitors. *Infectio* 2006; 10 (266-72).
145. Westby M. Resistance to CCR5 antagonists. *Curr Opin HIV AIDS* 2007; 2: 137-44.
146. Briz V, Poveda E, Soriano V. HIV entry inhibitors: mechanisms of action and resistance pathways. *J Antimicrob Chemother* 2006; 56:19-27.
147. Westby M. Reduced maximal inhibition in phenotypic susceptibility assays indicates that viral strains resistant to the CCR5 antagonist maraviroc utilize inhibitor bound receptor entry. *J Virol* 2007; 81:2359-71.
148. Anastassopoulou C G, Ketas T J, Klasse P J, Moore J P. Resistance to CCR5 inhibitors caused by sequence changes in the fusion peptide of HIV-1 gp41. *Proc Natl Acad Sci* 2009; 106 (13): 5318-23.
149. Finkelstein G, Nelson M, Lazzarin A. Subanalyses of maraviroc in previously treated R5 HIV-1 infection. *N Engl J Med* 2008; 359:1442-5.
150. De Rossi A, Walker AS, Klein N, De Forni D, King D, Gibb DM. Increased thymic output after initiation of antiretroviral therapy in human immunodeficiency virus type 1-infected children in the Paediatric European Network for Treatment of AIDS (PENTA) 5 Trial. *J Infect Dis* 2002;186:312-320.
151. Douek DC, Koup RA, McFarland RD, Sullivan JL, Luzuriaga K. Effect of HIV on thymic function before and after antiretroviral therapy in children. *J Infect Dis* 2000;181:1479-1482.
152. Douek DC, McFarland RD, Keiser PH, et al. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature* 1998;396:690-695.
153. De la Rosa R, Leal M. Thymic involvement in recovery of immunity among HIV infected adults on highly active antiretroviral therapy. *J Antimicrob Chemother* 2003;52:155-158.

154. Levy J, Shimabukuro J, McHugh T, Casavant C, Stites D, Oshiro L. AIDS associated retroviruses (ARV) can productively infect other cells besides human T helper cells. *Virology* 1985,147:441-448.
155. Broder CC, Berger EA. Fusogenic selectivity of the envelope glycoprotein is a major determinant of human immunodeficiency virus type 1 tropism for CD4- Tcell lines vs. primary macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995,92:9004-9008.
156. Obregón E, Punzon C, Fernandez-Cruz E, Fresno M, Munoz-Fernandez MA. HIV-1 infection induces differentiation of immature neural cells through autocrine tumor necrosis factor and nitric oxide production. *Virology* 1999,261:193-204.
157. Arias RA, Munoz LD, Munoz-Fernandez MA. Transmission of HIV-1 infection between trophoblast placental cells and T-cells take place via an LFA-1-mediated cell to cell contact. *Virology* 2003,307:266-277.
158. Li TS, Tubiana R, Katlama C, Calvez V, Ait Mohand H, Autran B. Long-lasting recovery in CD4 T-cell function and viral-load reduction after highly active antiretroviral therapy in advanced HIV-1 disease. *Lancet* 1998,351:1682-1686.
159. Cameron DW, Heath-Chiozzi M, Danner S, et al. Randomised placebo-controlled trial of ritonavir in advanced HIV-1 disease. The Advanced HIV Disease Ritonavir Study Group. *Lancet* 1998,351:543-549.
160. Hammer S, Squires K, Hughes M, et al. A controlled trial of two nucleoside analogues plus zidovudine in persons with human immunodeficiency virus infection and CD4 cell counts of 200 per cubic millimeter or less. *N Engl J Med* 1997,337:725-733.
161. Nixon DF, Broliden K, Ogg G, Broliden PA. Cellular and humoral antigenic epitopes in HIV and SIV. *Immunology* 1992,76:515-534.
162. Westby M, Manca F, Dalgleish AG. The role of host immune responses indetermining the outcome of HIV infection. *Immunol Today* 1996,17:120-126.
163. Borrow, P., et al., Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus [see comments]. *Nat Med*, 1997. 3(2): p. 205-11.
164. Douek, D.C., L.J. Picker, and R.A. Koup, T cell dynamics in HIV-1 infection. *Annu Rev Immunol*, 2003. 21: p. 265-304.
165. Price, D.A., et al., Positive selection of HIV-1 cytotoxic T lymphocyte escape variants during primary infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. 94(5): p. 1890-5.
166. Migueles, S. A., Weeks, K. A., Nou, E., Berkley, A. M., Rood, J. E., Osborne, C. M., Hallahan, C. W., Cogliano-Shutta, N. A., Metcalf, J. A., McLaughlin, M., Kwan, R., Mican, J. M., Davey, R. T., Jr., and Connors, M. (2009). Defective human

- immunodeficiency virus-specific CD8⁺ Tcell polyfunctionality, proliferation, and cytotoxicity are not restored by antiretroviral therapy. *J Virol* 83(22), 11876-89.
167. Laeyendecker, O., Rothman, R. E., Henson, C., Horne, B. J., Ketlogetswe, K. S., Kraus, C. K., Shahan, J., Kelen, G. D., and Quinn, T. C. (2008). The effect of viral suppression on cross-sectional incidence testing in the Johns Hopkins Hospital Emergency Department. *J Acquir Immune Defic Syndr* 48(2), 211-5.
168. Bailey, J. R., Lassen, K. G., Yang, H. C., Quinn, T. C., Ray, S. C., Blankson, J. N., and Siliciano, R. F. (2006b). Neutralizing antibodies do not mediate suppression of human immunodeficiency virus type 1 in elite suppressors or selection of plasma virus variants in patients on highly active antiretroviral therapy. *J Virol* 80(10), 4758-70.
169. Li, Y., Migueles, S. A., Welcher, B., Svehla, K., Phogat, A., Louder, M. K., Wu, X., Shaw, G. M., Connors, M., Wyatt, R. T., and Mascola, J. R. (2007). Broad HIV-1 neutralization mediated by CD4-binding site antibodies. *Nat Med* 13(9), 1032-4.

CAPITULO VII

ANEXOS