

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON



"FRECUENCIA DE MUTACIONES DEL VIH QUE
CONFIEREN RESISTENCIA A LOS ANTIRRETROVIRALES
EN PACIENTES DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO UANL
QUE NO HAN RECIBIDO TRATAMIENTO PREVIO'

Por

MC OLIVIA M. VALLE BAHENA

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN BIOLOGIA
MOLECULAR E INGENIERIA GENETICA

Agosto, 2005

ID

RC607

A26

V3

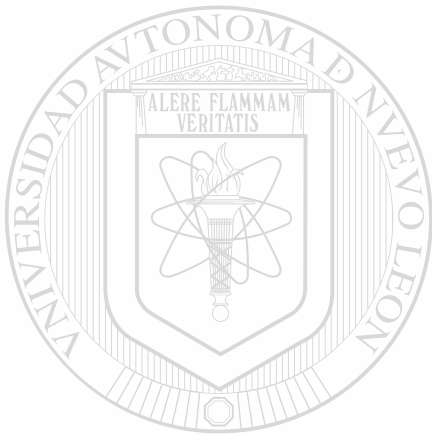
2005

c.1

MC OLIVIA M. VAILLE BAHJENNA



1080127599



UANL

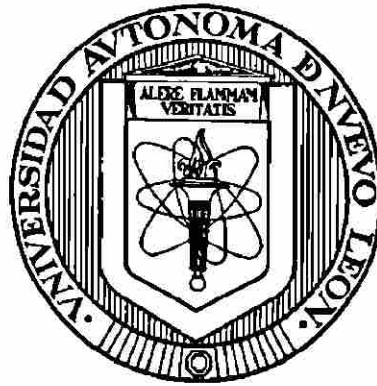
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



" FRECUENCIA DE MUTACIONES DEL VIH QUE CONFIEREN
RESISTENCIA A LOS ANTIRRETROVIRALES EN PACIENTES
DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO UANL QUE NO HAN RECIBIDO
TRATAMIENTO PREVIO "

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

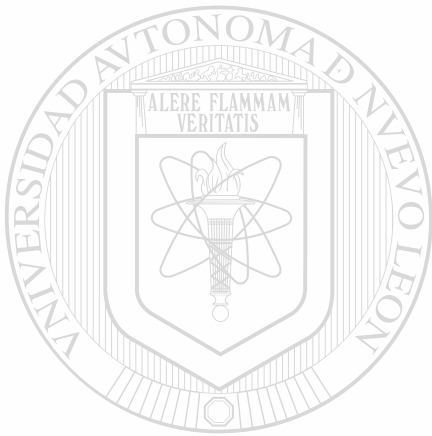
Por
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

MC OLIVIA M. VALLE BAHENA

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN BIOLOGÍA MOLECULAR
E INGENIERÍA GENÉTICA

Agosto, 2005

TD
R2607
.A26
V3
199



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

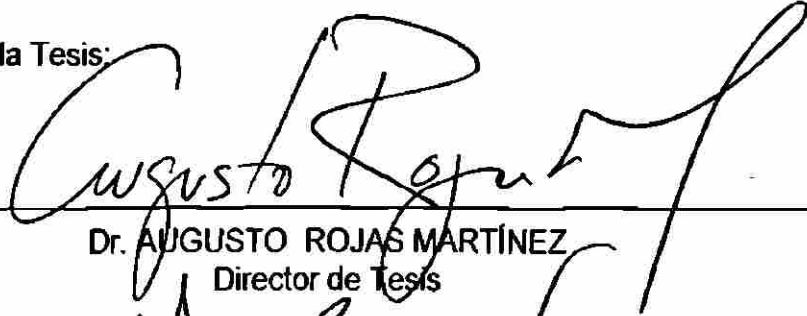


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



FRECUENCIA DE MUTACIONES DEL VIH QUE CONFIEREN
RESISTENCIA A LOS ANTIRRETROVIRALES EN PACIENTES DEL
HOSPITAL UNIVERSITARIO UANL QUE NO HAN RECIBIDO TRATAMIENTO
PREVIO

Aprobación de la Tesis:



Dr. AUGUSTO ROJAS MARTÍNEZ
Director de Tesis




Dr. HUGO A. BARRERA SALDAÑA
Co-Director de Tesis



DRA. ROCÍO ORTIZ LÓPEZ
Comisión de tesis



Dr. JAVIER RAMOS JIMÉNEZ
Comisión de tesis



Dra. AGNÉS REVOL DE MENDOZA
Comisión de tesis



Dr. DIONICIO A. GALARZA DELGADO

Jefe de la División de Estudios de Postgrado



El trabajo experimental de esta tesis se desarrolló en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L; bajo la dirección del Dr. Augusto Rojas Martínez y la co-dirección del Dr. Hugo A. Barrera Saldaña.

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

AGRADECIMIENTOS

Dr. Augusto Rojas Martínez

Dr. Hugo A. Barrera Saldaña

Dra. Rocío Ortiz López

Dra. Agnes Revol de Mendoza

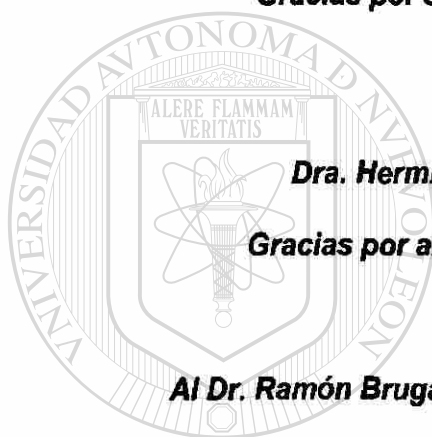
Dr. Javier Ramos Jiménez

Gracias por su apoyo en la realización del trabajo.

Dra. Herminia Guadalupe Martínez Rodríguez

Gracias por abrirme las puertas a esta oportunidad.

Al Dr. Ramón Brugada por su ayuda generosa y desinteresada.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

A todos los compañeros y personal de la ULIEG.



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

A mi inolvidable y querida Facultad de Medicina de la UAEM.

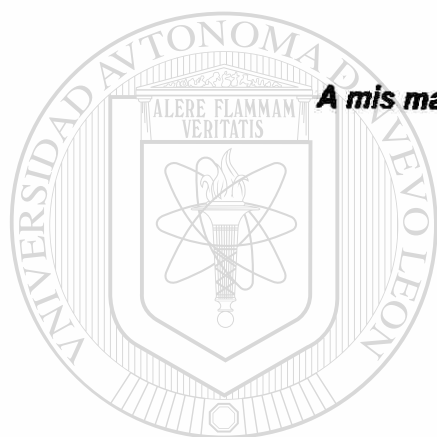
Y sobre todo a Dios

DEDICATORIA

A la memoria de mis padres

A mi esposo

Incansable timonero



A mis más preciadas y exitosas empresas

José Carlos

Alberto Isaac

Josué Iván

Jonathan

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

A mis niñas
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Lulú y América

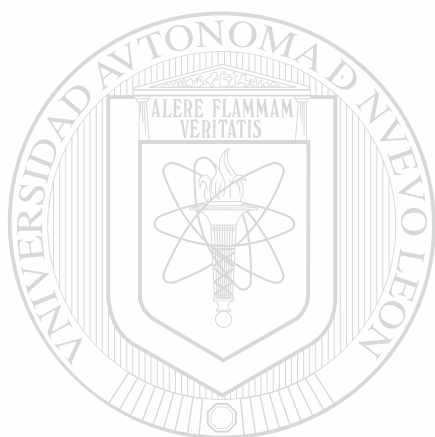
A mis hermanos

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo

I	INTRODUCCIÓN	1
	1.1 Infección por VIH y SIDA.....	1
	1.2 Etiología.....	2
	1.3 Genoma del VIH.....	4
	1.4 Ciclo de replicación del VIH.....	5
	1.5 Curso clínico de la infección por VIH.....	6
	1.6 Tratamiento.....	7
	1.7 Resistencia a los antirretrovirales.....	10
	1.8 Tipos de mutaciones.....	13
	1.9 Evolución de la resistencia a los medicamentos.....	14
	1.10 Tipos de resistencia.....	16
	1.11 Mecanismos para instaurar resistencia.....	17
	1.12 Ensayos para la detección de resistencia.....	17
	1.13 Transmisión de resistencia a los antirretrovirales.....	18
II	JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	21
	2.1 Justificación.....	21
	2.2 Objetivos.....	21
	2.2.1 Objetivo general.....	21
	2.2.2 Objetivos específicos.....	21
III	MATERIAL Y MÉTODOS	23
	3.1 Origen de los reactivos, material y equipo de laboratorio.....	23
	3.2 Material biológico.....	25
	3.3 Área de trabajo.....	25
	3.4 Estrategia general.....	25
	3.4.1 Toma de muestras.....	27
	3.4.2 Aislamiento de RNA y determinación de la carga viral.....	28
	3.4.3 Síntesis de DNAc.....	29
	3.4.4 Amplificación de los genes de la proteasa y RT.....	30
	3.4.5 Verificación de los productos amplificados.....	34
	3.4.6 Secuenciación de los productos amplificados.....	35
	3.4.7 Análisis e interpretación de las secuencias.....	35
IV	RESULTADOS	39
	4.1 Datos demográficos y biológicos de los sujetos.....	39
	4.2 Genotipificación.....	41
	4.2.1 Amplificación de los genes de la proteasa y RT.....	41
	4.2.2 Secuenciación y análisis de las secuencias obtenidas.....	43
	4.2.3 Interpretación de las mutaciones que contribuyen en la resistencia a los inhibidores de proteasa.....	47

4.2.4 Frecuencia de mutaciones en el gen de la proteasa.....	47
4.2.5. Interpretación de las mutaciones en el gen de la RT.....	47
4.2.6 Frecuencia de mutaciones de resistencia en el gen de la RT.....	48
4.2.7 Subtipo al que corresponden las variantes virales.....	48
V DICUSIÓN.....	49
VI CONCLUSIONES.....	57
BIBLIOGRAFÍA.....	59



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Relación de figuras

Figura

1.	Estructura del VIH.....	4
2.	Genoma del VIH.....	5
3.	Ciclo de replicación de VIH.....	6
4.	Modificación de las moléculas blanco de los ARV ..	11
5.	Emergencia de variantes virales resistentes.....	13
6.	Distribución de las mutaciones de resistencia a	13
7.	Estrategia general.....	27
8.	Aislamiento de RNA y determinación de la carga viral.....	29
9.	Diseño de oligonucleótidos.....	31
10.	Mutaciones asociadas con resistencia a los IP	36
11.	Mutaciones asociadas con resistencia a los IRT.....	37
12.	Productos amplificados del gen de la proteasa.....	41
13.	Productos amplificados de las regiones 5',media y 3' de la RT.....	42
14.	Productos amplificados de la región proteasa-RT.....	42
15.	Ejemplo de las secuencias obtenidas.....	43
16.	Alineamiento de muestras con los iniciadores.....	44
17.	Alineamiento de una región de la RT con la secuencia HXB2.....	44

Relación de tablas, cuadros y gráficas

Tabla

1. Antirretrovirales aprobadas por la FDA.....	8
2. Técnica para la síntesis de DNAc.....	30
3. Condiciones para la amplificación del gen de la proteasa.....	32
4. Condiciones de reacción para la amplificación del gen de la RT	33
5. Programa de amplificación del gen de la proteasa.....	33
6. Programa de amplificación del gen Pr-RT completo.....	33
7. Datos demográficos	40
8. Características de los sujetos.....	40
9. Frecuencia de mutaciones secundarias en el gen de la proteasa...	45

Cuadro

1. Iniciadores para el gen de la proteasa	31
2. Iniciadores para las regiones 5', media y 3' del gen de la RT.....	32

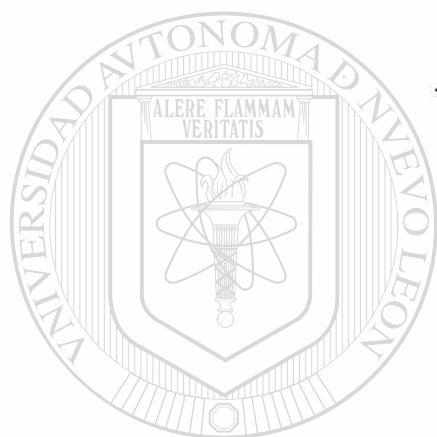
Gráfica

1. Relación carga viral/T-CD4.....	41
2. Mutaciones que contribuyen en la resistencia a los inhibidores de proteasa.....	45
3. Polimorfismos en el gen de la proteasa.....	46
4. Polimorfismos en el gen de la RT.....	46

NOMENCLATURA

ABC	Abacavir
APV	Amprenavir
AZT	Zidovudna
CCR5	Correceptor de los macrófagos
DNAc	DNA complementario
CXCR4	Correceptor de los linfocitos T
DNA	Ácido desoxirribonucleico (siglas en inglés)
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfatados
ddi	Didanosina
ddC	Zalcitabina
D4T	Estavudina
DLV	Delavirdine
EDTA	Etilen Diamino Tetra Acético (Anticoagulante)
EFV	Efavirenz
FDA	Organización federal para la administración de los medicamentos
HTLV	Virus linfotrópico humano
HAART	Terapia antirretroviral altamente activa (siglas en inglés)
HXB2	Virus de la insuficiencia humana cuya secuencia se utiliza como referencia
INRT	Inhibidores nucleosídicos de la RT
INNRT	Inhibidores no nucleosídicos de la RT
IDV	Indinavir
Kb	Kilobase
LPV	Lopinavir
ml	Mililitro
RNA _m	Ácido ribonucleico mensajero
NVP	Nevirapina
NFV	Nelfinavir
ONUSIDA	Organización de las Naciones Unidas y SIDA

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RTV	Ritonavir
RT	Retrotranscripción
SQV	Saquinavir
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
T-CD4	linfocito colaborador de la respuesta inmune
VIH	Virus de la insuficiencia humana
3TC	Lamivudina



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

RESUMEN

Olivia M. Valle Bahena
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Fecha de graduación 31 de agosto de 2005

Título del estudio: FRECUENCIA DE MUTACIONES DEL VIH QUE CONFIEREN RESISTENCIA A LOS ANTIRRETROVIRALES EN PACIENTES DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO UANL QUE NO HAN RECIBIDO TRATAMIENTO PREVIO.

Número de páginas 81 Candidato para el grado de Doctor en Ciencias con especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética.

Propósito y método de estudio: La morbimortalidad por el SIDA (síndrome de inmunodeficiencia adquirida) debido al VIH (virus de la inmunodeficiencia humana) es un grave problema de salud, la transmisión de variantes virales resistentes a los individuos que se infectan por primera vez ha aumentado en Estados Unidos y Europa y es una causa importante de falla terapéutica. En México no existen datos de la prevalencia de dichas variantes. En este trabajo se propuso conocer la frecuencia de mutaciones relacionadas con resistencia en pacientes infectados con VIH que no habían recibido tratamiento previo, en una población del noreste de México.

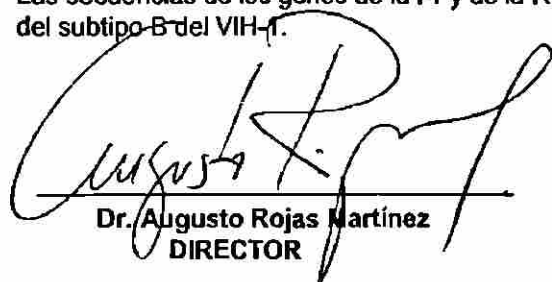
El estudio se realizó en las muestras de plasma de 42 sujetos infectados con VIH libres de tratamiento, reunidas entre febrero de 2001 y septiembre de 2003. Se aisló el RNA viral de las muestras de plasma y se amplificaron por PCR los genes de la proteasa (Pr) y retrotranscriptasa (RT) utilizando cuatro juegos de iniciadores: uno para el gen de la Pr y tres para el de la RT. Los productos amplificados se secuenciaron, alinearon y compararon con la secuencia de referencia HXB2 mientras que la interpretación de las mutaciones se realizó mediante el programa Beta test de la Universidad de Stanford.

Resultados y conclusión:

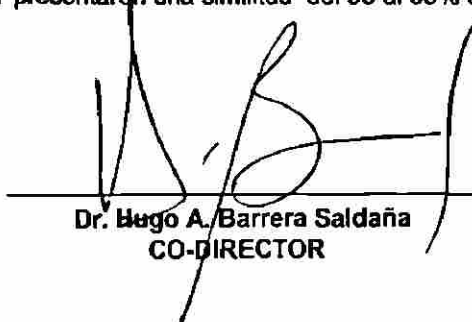
En el gen de la Pr no se detectaron mutaciones relacionadas con resistencia de los virus a los inhibidores de la Pr (IP) y únicamente se presentaron mutaciones secundarias en algunas muestras.

En el gen de la RT, en uno de los aislados se detectó una variante viral relacionada con alto nivel de resistencia a los inhibidores nucleosídicos de la RT (INRT) (prevalencia 3%). Asimismo una muestra presentó una variante asociada a bajo nivel de resistencia a los inhibidores nucleosídicos de la RT (INNRT) (prevalencia de 3%). En el resto de los pacientes, el genotipo de las variantes virales no se relacionó con resistencia a los antirretrovirales.

Las secuencias de los genes de la Pr y de la RT presentaron una similitud del 95 al 98% con la del subtipo-B del VIH-1.



Dr. Augusto Rojas Martínez
DIRECTOR



Dr. Hugo A. Barrera Saldaña
CO-DIRECTOR

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 Infección por VIH y SIDA

La infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) ocasionado por dicho virus, son en la actualidad importantes problemas de salud pública. En el resumen mundial de la epidemia hasta diciembre de 2004 la evidencia de su impacto es considerable, 39.4 millones de personas vivían con SIDA, se presentaron 4.9 millones de nuevas infecciones y ocurrieron 3.1 millones de defunciones (1). La terapia ha disminuido la mortalidad de los individuos infectados, sin embargo los medicamentos están fuera del alcance de una gran parte de la población infectada (93,94). Las recomendaciones actuales en el manejo de los pacientes incluyen el uso de combinaciones de tres y hasta cuatro antirretrovirales (ARV), el monitoreo de la eficacia de los medicamentos con base en la carga viral (CV) y el conteo de las células T-CD4, lo cual implica un costo excesivo para los pacientes o para las instituciones de salud. Hasta el momento, los medicamentos existentes no eliminan totalmente el virus del organismo y al suspender el tratamiento, la viremia se restablece. Por otro lado, un significativo número de individuos persiste con niveles altos del virus a pesar del

tratamiento, debido a la emergencia de variantes virales resistentes a los medicamentos y ésta es una de las causas más importantes de falla terapéutica.

Desde 1983, año en que inició esta epidemia en México, hasta el 15 de noviembre del 2004, utilizando las metodologías internacionales de ONUSIDA se estima que existen en México alrededor de 160,000 personas infectadas con VIH. En México la prevalencia de VIH/SIDA es de 0.3% entre la población adulta ubicándose en el lugar 77 en el mundo. En la región de América Latina y El Caribe, México ocupa el lugar 23 de 48, es decir, que México se encuentra entre los países con menor prevalencia en la región, muy por debajo de la prevalencia que muestran otras naciones como Brasil, Honduras y Belice. En cuanto al número de casos acumulados por entidad federativa, Nuevo León ocupa el 11° lugar con 2,384 casos (2).

La infección por VIH es un proceso que se caracteriza por la producción elevada y constante de nuevos viriones y la destrucción de linfocitos T-CD4 (efecto citopático). Por un tiempo, tal destrucción se compensa aumentando la producción de linfocitos, pero al paso de los años el organismo se depleta de dichas células, originando la inmunodeficiencia adquirida. El evento fundamental en la progresión a enfermedad es la replicación viral y el evento que determina el avance a inmunodeficiencia es la destrucción linfocitaria (90).

1.2 Etiología

El agente causal de la forma de SIDA más frecuente en el mundo es el VIH-1,

este agente pertenece a la familia de los retrovirus, subfamilia de los lentivirus, que infectan principalmente a los vertebrados. Han sido reconocidos cuatro retrovirus humanos pertenecientes a dos grupos diferentes: los virus T linfotrópicos humanos HTLV I y HTLV II, y los virus de inmunodeficiencia humanos VIH-1 y VIH-2, que son virus citopáticos. Los retrovirus incluyendo al VIH forman el grupo más ampliamente distribuido y probablemente el de mayor diversidad biológica (3,4), esta característica, puede influir sobre aspectos tales como la infectividad, transmisibilidad e inmunogenicidad del virus. El análisis de las secuencias de los genes de cepas víricas en diferentes zonas geográficas ha revelado que el VIH-1 puede dividirse en los grupos "M", "O" y "N". Estos se denominaron originalmente M de main, O de outlier, y N por no M no-O (5,6). El grupo M, causante de la pandemia mundial, comprende a su vez 10 subtipos (A – K). En EUA, Europa y Australia los virus aislados pertenecen al subtipo B. En México se ha aislado principalmente el subtipo B (7,8).

Estructuralmente, el VIH presenta una cubierta lipídica rodeando una cápside.

Sus principales proteínas de membrana son gp120 y gp41, su genoma está constituido por dos copias idénticas de RNA de 8 a 10 Kb (Figura 1), presenta un sitio para casquete en el extremo 5' y un sitio de poliadenilación en el extremo 3'.

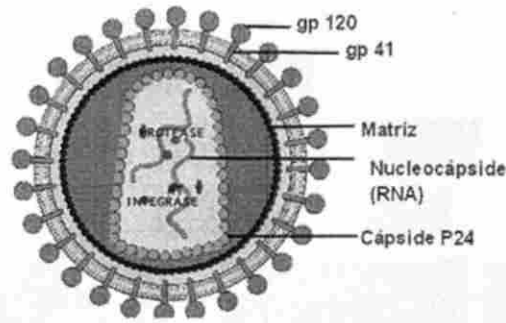


Figura 1. Estructura del VIH

(http://biology.fullerton.edu/courses/biol_302/Web/Browser/moreabout.html#virionstr)

1.3 Genoma del VIH

El genoma viral incluye 3 genes principales:

- **Gag:** codifica para proteínas que forman la cubierta del virión.
- **Pol:** codifica para las enzimas proteasa (Pr), transcriptasa reversa (RT) e integrasa.
- **Env:** codifica para la cubierta de glucoproteínas.

La RT es responsable de la polimerización de DNA dependiente de RNA, de la actividad de RNasa H y de la polimerización de DNA dependiente de DNA. La Pr es responsable del procesamiento postraducciona de las poliproteínas de los genes *gag* y *gag-pol* produce las proteínas de la matriz, cápside, nucleocápside, RT e integrasa y la misma Pr. La integrasa permite la integración del DNA viral al cromosoma de la célula huésped.

El VIH también contiene 6 genes accesorios: *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr* y *vpu* que codifican para proteínas involucradas en la regulación de la expresión génica. Flanqueando estos genes se encuentran las secuencias largas repetitivas terminales (LTRs) que también contienen elementos regulatorios de la expresión génica (Figura 2) (9).

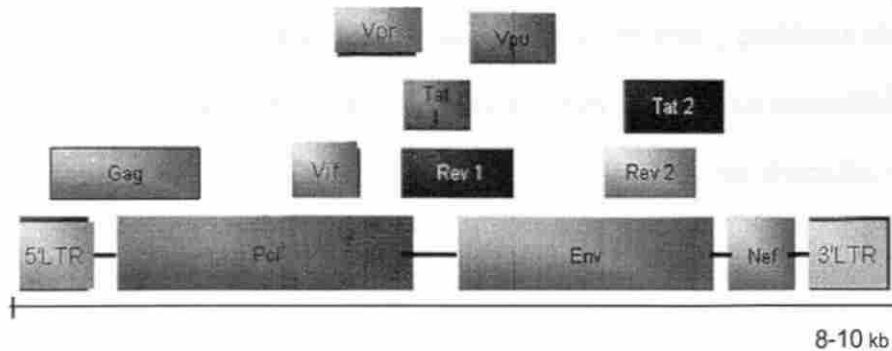


Figura 2. Genoma del VIH
(<http://hiv-web.lanl.gov/content/hiv-db/MAPIPol>)

1.4 Ciclo de replicación del VIH

El VIH existe extracelularmente en forma de viriones con su doble hebra de RNA e intracelularmente como DNA integrado en el cromosoma huésped (DNA proviral). El ciclo de vida del virus requiere en promedio de 1 a 2 días, y se producen aproximadamente 10 millones de viriones por día.

El ciclo se lleva a cabo en dos fases. Inicia por la unión de gp120 a su receptor, la molécula CD4 de los linfocitos cooperadores o inductores de la función del sistema inmune. La molécula CD4 se expresa también en la superficie de monocitos, macrófagos, dendritas y células de Langerhans. Enseguida, participa el correceptor CXCR4 que es necesario para la fusión y entrada del virus. En macrófagos, el correceptor es la β -quimocina llamada CCR5. Ambas moléculas pertenecen a la familia de las proteínas G transmembranales acopladas a receptores celulares. La fusión con la membrana del huésped mediante la molécula gp41, deja el RNA viral desnudo, el cual se interna en la célula blanco. En el citoplasma, la retrotranscripción convierte al RNA viral original en una molécula de DNA que constituye el provirus, el cual

posteriormente llega al núcleo y se integra al azar en el DNA cromosómico. En la segunda fase, se sintetizan y procesan genomas, RNAm y proteínas virales, utilizando la maquinaria de la célula huésped; posteriormente se ensamblan los viriones y se liberan de la célula hospedera 36 a 48 horas después de la infección (10) (Figura 3).

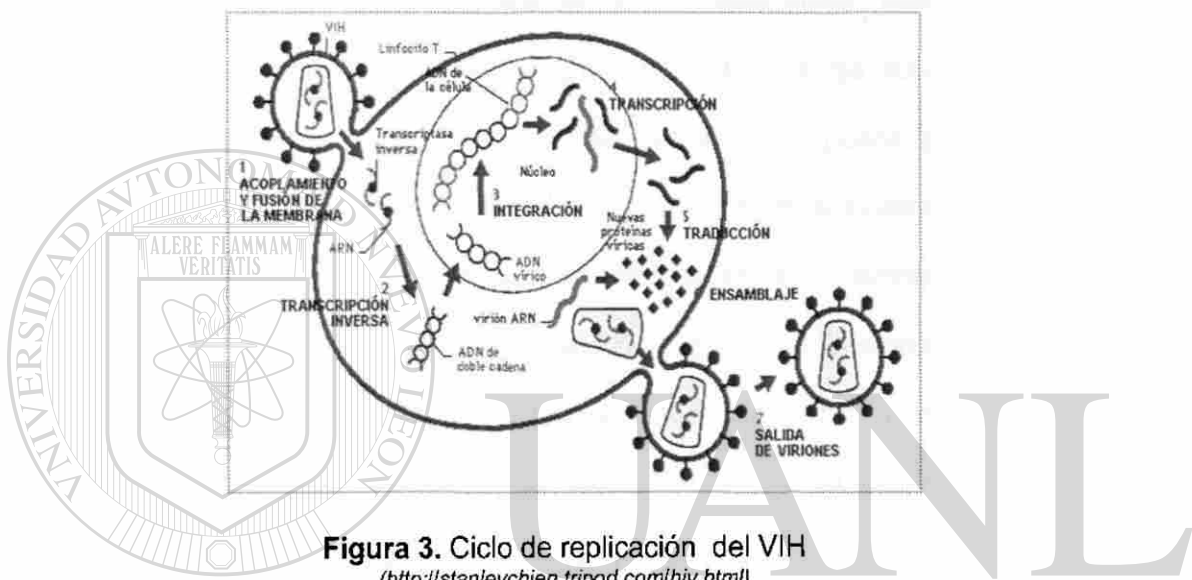


Figura 3. Ciclo de replicación del VIH
(<http://stanleychien.tripod.com/hiv.html>)

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

1.5 Curso clínico de la infección por VIH

El curso clínico de la infección por VIH es único en cada caso. Puede iniciar uno o dos meses después de la infección primaria con síntomas gripales y posiblemente una erupción, (síndrome agudo de VIH) que perdura unas pocas semanas. En otros casos, sin embargo, no hay nada que indique una infección con VIH. Se presente o no sintomatología, durante los primeros meses que siguen a la infección primaria existe un tiempo de extensa replicación viral. Los niveles del virus circulante en sangre son altos y la cuenta de células T-CD4 decaen con las primeras elevaciones de la carga viral. La infección primaria

dispara la respuesta inmune contra el VIH, y como resultado, la carga viral se reduce y la cuenta de CD4 aumenta. Sin embargo, hay virus que se alojan en células del sistema linfático y otros compartimentos, como el cerebro, donde quedan fuera del alcance de la respuesta inmune. Estos reservorios de VIH son una de las razones por las cuales es imposible erradicar el virus completamente con los tratamientos utilizados hasta ahora. Después de la infección primaria pueden pasar muchos años durante los cuales no hay sintomatología de la infección, el estado de latencia clínica puede hacer pensar que el virus está inactivo; sin embargo el virus permanece sumamente activo durante el curso de la infección, pero el sistema inmune lo contrarresta de tal manera que la carga viral y la cuenta de CD4 cambian relativamente poco. Sin embargo, si el virus por alguna razón se replica sin control y sobrepasa la capacidad de la respuesta inmune para reemplazar CD4, el paciente pierde la capacidad para defenderse de las infecciones oportunistas y tumores malignos que son la causa principal de enfermedad y muerte por SIDA.

1.6 Tratamiento

En los últimos años, la quimioterapia contra el SIDA ha progresado de tal manera que la infección por VIH está en vías de convertirse en una enfermedad crónica controlable, al prevenir el desarrollo de infecciones oportunistas e incluso de la inmunodeficiencia. Sin embargo, el manejo es complejo y el paciente debe recibir atención médica especializada desde las etapas tempranas para obtener un mayor beneficio.

Las enzimas blanco de la acción de los medicamentos que se han utilizado en la clínica desde finales de los 80, son la RT y la Pr, cuyas actividades se inhiben con el uso de dichos medicamentos y como consecuencia se deprime la replicación de los virus. Otros fármacos recientemente utilizados son los inhibidores de la fusión. Hasta octubre de 2003 se habían aprobado por la FDA veinte agentes ARV pertenecientes a cuatro clases, con las cuales se diseñan esquemas conteniendo al menos tres ARV. Estas cuatro clases incluyen a los INRT, INNRT, IP e inhibidores de la fusión (Tabla1) (11).

Tabla 1. Antirretrovirales aprobados por la FDA

Inhibidores nucleosídicos de la RT		
Abacavir ABC	Estavudina D4T	Viread
Didanosina ddi	Zalcitabina ddC	Zidovudina AZT
Lamivudina 3TC	Combivir	Trizivir
Inhibidores no nucleosídicos de la RT		
Efavirenz EFV	Nevirapina NVP	Delavirdine DLV
Inhibidores de la Pr.		Inhibidor de la fusión
Amprenavir APV	Nelfinavir NFV	T-20
Indinavir IDV	Ritonavir RTV	
Lopinavir LPV	Saquinavir SQV	
Kaletra		

- 1. Nucleósidos inhibidores de la RT.** Son compuestos que compiten con los dNTPs (desoxirribonucleósidos trifosfatados) naturales al incorporarse en la cadena de DNA viral durante la síntesis. Dichas moléculas carecen del grupo 3'OH, lo cual impide la formación de los

enlaces fosfodiéster entre la cadena que se está elongando y el nucleósido trifosfatado entrante, por lo tanto se interrumpe la síntesis de la cadena.

2. Inhibidores no nucleosídicos de la RT. Son compuestos policíclicos que se unen a una bolsa hidrofóbica cerca del sitio activo de la polimerasa. Estos compuestos inhiben la replicación del VIH desplazando alostéricamente residuos de aspartato que son catalíticos y que se relacionan con el sitio de unión de la RT a su sustrato (6).

3. Inhibidores de la Proteasa. Inhiben la hidrólisis de las poliproteínas virales precursoras, impidiendo la maduración de nuevos virus.

4. Inhibidores de la fusión. Evitan la interacción entre las proteínas virales y los receptores CD4.

Estos fármacos se desarrollaron con la finalidad de eliminar la forma silvestre

del virus, la más común de las cepas. El objetivo de la terapia ARV es suprimir la replicación del VIH por el mayor tiempo posible, lograr la estabilidad inmunológica y la recuperación del paciente (12,13). Idealmente esto se logra con el uso de la terapia antirretroviral altamente activa (HAART). Algunas combinaciones de ARV tienen efecto sinérgico o aditivo y dan como resultado una significativa y prolongada supresión de la replicación, reduciendo la carga viral a niveles indetectables en plasma. Desde mediados de los noventas, dicha terapia ha disminuido significativamente la morbilidad y mortalidad debida a la infección con VIH y está transformado el pronóstico de las personas que viven

con la enfermedad. Sin embargo solo 40 a 65 % de los adultos y niños infectados con VIH mantienen la supresión virológica después de 6 meses de tratamiento (14). Un significativo número de individuos mantiene niveles altos de VIH a pesar del uso de los esquemas de tratamiento potentes. En otros pacientes hay supresión de la carga viral por un periodo corto de tiempo y rápidamente sube dicha carga a niveles cercanos a los que presentaba antes del tratamiento.

Una de las causas más importantes de falla terapéutica es la resistencia del VIH a los ARV, resistencia que puede presentarse aún antes de iniciar la terapia. Estudios realizados en pacientes sin tratamiento previo han identificado la presencia de cepas de virus resistentes a uno o varios ARV (15,16). Está demostrado que los virus resistentes pueden ser transmitidos de un adulto a otro (17,18) y también ocasionalmente se transmiten de forma vertical de madre a hijo (19).

1.7 Resistencia a los antirretrovirales.

La resistencia es la evasión del virus a la acción de los ARV. El VIH se hace resistente debido a una o más mutaciones en las regiones del genoma viral que codifican para las moléculas blanco (Pr y RT) de los ARV. Esto da como resultado la producción de proteínas ligeramente diferentes en estructura y aunque todavía funcionan en la replicación, ya no son blancos efectivos para los agentes ARV (como su contraparte silvestre) y la susceptibilidad del virus se reduce (figura 4). Los términos "resistencia" y "susceptibilidad reducida" tienen igual significado. Como los distintos ARV tienen potencias diferentes, la

reducción de la susceptibilidad viral en los pacientes infectados debe relacionarse con la actividad de cada droga en el virus silvestre.

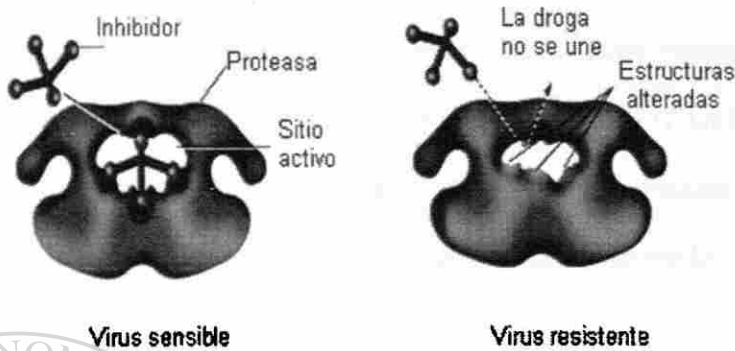


Figura 4. Modificación de las moléculas blanco de los ARV

Las mutaciones ocurren espontáneamente en todos los organismos vivos y la frecuencia de tales mutaciones depende de la velocidad con que el organismo se divide. En una persona no tratada, en el plasma circulan aproximadamente de 10^3 a 10^6 viriones/ml, mientras la concentración de virus en los nódulos

linfáticos es 2 a 3 veces más alta. Cada día se generan 10 millones de viriones

aproximadamente y se ha estimado que ocurre una mutación puntual entre 10^4 y 10^5 veces por día en un individuo infectado no tratado y que pueden incluso ocurrir dobles mutantes (20). Las mutaciones por lo tanto están constantemente emergiendo y pueden dar como resultado cambios en el tropismo, en la sensibilidad a los medicamentos y un incremento de la virulencia. Algunas mutaciones o combinaciones de mutaciones son deletéreas para la capacidad replicativa del virus. Estos efectos son particularmente notables en las mutaciones del gen de la Pr, ya que estas alteran los patrones normales de las proteínas estructurales y funcionales del virus. Como consecuencia, las

partículas virales mutantes tienen una menor capacidad infecciosa. Sin embargo, estos defectos pueden ser compensados por mutaciones secundarias en la Pr o en sus sustratos. Se ha demostrado que las cepas con mutaciones M184V y K65R en la RT tienen una capacidad replicativa menor que cepas con otras mutaciones y que su efecto es aditivo (21). La terapia ARV no es la causa de que el virus desarrolle mutaciones que producen resistencia, éstas ocurren de forma natural, aún en ausencia del tratamiento (22,23); aún más, la resistencia se lleva a cabo en el estado latente de infección de las células. Si los ARV no suprimen al virus, éstos evolucionan, las mutaciones se acumulan y la susceptibilidad disminuye. En ausencia de terapia los virus mutantes que ocurren de manera natural son menos hábiles para replicarse en comparación con el tipo silvestre dominante y por eso existen en pequeñas cantidades. Al iniciar la terapia se ejerce una presión selectiva en la población en la cual el virus silvestre deja de replicarse debido a que es sensible a la droga, mientras que el mutante se replica aún en presencia de la droga y se convierte en la forma dominante de la población viral (Figura 5). La emergencia de variantes virales resistentes es la razón principal de que los pacientes infectados con VIH experimenten un rebote de la carga viral durante la terapia y es una de las causas más importantes de falla terapéutica.

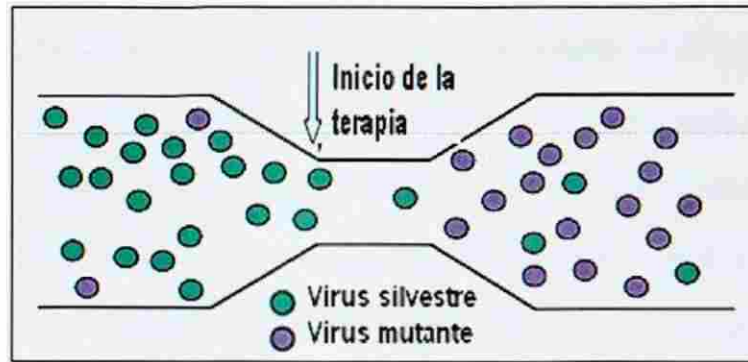


Figura 5. Emergencia de variantes virales resistentes

1.8 Tipos de mutaciones

Es común el uso de los términos mutaciones primarias y secundarias. En las recomendaciones del Internacional AIDS Society-USA Panel se definen como:

Mutaciones primarias, son alteraciones en el material genético que al expresarse dan lugar a cambios estructurales en el sitio activo de la enzima afectando la afinidad de ésta por su sustrato (30,48). Interfieren con la habilidad del medicamento para unirse a la enzima blanco y pueden conferir resistencia

por si mismas. Son las primeras en seleccionarse y se les llama también principales (31). En la figura 6 se presentan los sitios de localización más frecuentes de este tipo de mutaciones.

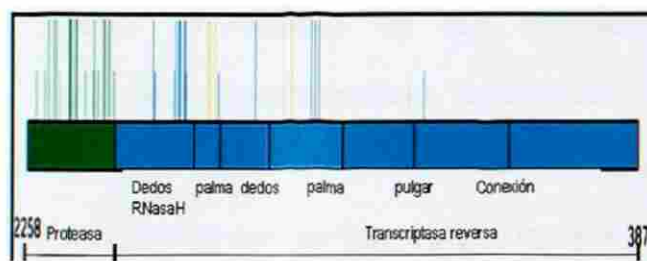


Figura 6. Distribución de mutaciones de resistencia a los ARV.
Proteasa líneas verdes, INRT azules, INNRT amarillas

Mutaciones secundarias o menores, se van acumulando en el genoma viral, funcionan mejorando la actividad de las enzimas que ya contienen mutaciones primarias, son seleccionadas por la ventaja replicativa que confieren al virus mutante; por sí mismas estas mutaciones tienen efecto mínimo o nulo en la magnitud de la resistencia al tratamiento antirretroviral (32) y su efecto fenotípico generalmente depende de la presencia de otras mutaciones, aunque pueden tener menos efecto directo sobre la unión del inhibidor comparadas con las primarias

1.9 Evolución de la resistencia a los medicamentos

La supresión viral exitosa sigue siendo un desafío debido a la variedad de subpoblaciones virales existentes en una persona infectada. La evolución de la resistencia del VIH en un individuo depende de la selección de variantes resistentes durante la terapia. La variabilidad genética del VIH se debe a la

incapacidad de la RT del virus para corregir las mutaciones espontáneas que ocurren en cada ciclo de replicación, a la alta velocidad de replicación del VIH, a la acumulación de variantes provirales durante el curso de la infección y a la recombinación genética entre virus de diferentes secuencias que infectan la misma célula (24,25). El resultado es que innumerables variantes genéticamente relacionadas (cuasiespecies) evolucionan dentro de un individuo en los meses siguientes a la infección primaria (4). Las cuasiespecies mutadas ya preexistentes y las nuevas, son el producto de la presión selectiva creada por condiciones ambientales específicas. El efecto acumulativo de las mutaciones sobre la conducta viral es dependiente de su localización y

composición individual. El desarrollo de resistencia depende del tamaño y heterogeneidad de la población de VIH en el individuo y del grado al cual la replicación viral continúa durante el tratamiento; además de la capacidad de adaptación del virus al nuevo ambiente. Algunas mutaciones seleccionadas durante la terapia confieren resistencia por si mismas, mientras otras incrementan la resistencia solo cuando se presentan en combinaciones o al compensar la disminución de la actividad replicativa que se asocia con resistencia a los ARV.

Durante el curso de una infección, la variación de secuencias virales dentro de un individuo puede ser del 1 al 5 % en las regiones hipervariables de *env* (26).

La variación es menor en poblaciones de virus en plasma en ausencia de terapia y en genes que codifican proteínas conservadas como Pr y RT (27,28).

La combinación de ARV potentes reduce en forma importante la replicación viral, sin embargo, la replicación de los virus resistentes permanece aún después de dos años de terapia efectiva (29).

La resistencia del VIH a los ARV debe ser distinguida de otras causas de falla terapéutica tales como: la falta de adherencia del paciente al tratamiento, insuficientes niveles de droga intracelular o esquemas con actividad antiviral intrínsecamente débil, penetración disminuida al sistema nervioso central y a otros santuarios del virus, absorción disminuida, aumento en el metabolismo de la droga o bien declinación del estado inmunológico. El impacto de la reducción del potencial replicativo del VIH con relación a los aspectos clínicos e inmunológicos de la enfermedad no se ha entendido por completo. Algunas

evidencias sugieren que la pérdida de la capacidad de replicación viral se traduce como pérdida de la virulencia y en algunos pacientes con falla de la terapia, se ha descrito una incongruencia entre los altos niveles de replicación del virus resistente y la presencia de cuentas altas de T-CD4. Esta incongruencia parece decaer con el tiempo, pero puede persistir aún 3 años después del inicio de la falla terapéutica. El mecanismo por el cual se presentan altos niveles de cuentas de CD4, a pesar de los altos niveles de replicación viral, es aún discutido (91).

En los pacientes con resistencia establecida, en los cuales se interrumpe el tratamiento, el virus resistente es sustituido por virus tipo silvestre sensible a los ARV. Clínicamente se manifiesta con rebote de la viremia, asociado con disminución en las cuentas de CD4, lo cual es un signo de que el virus silvestre ha recobrado sus características virulentas.

1.10 Tipos de resistencia

Epidemiológicamente se puede hablar de resistencia primaria y secundaria (33,34). La resistencia primaria se presenta en pacientes que no han recibido tratamiento previo con antivirales y se encuentran infectados con cepas de VIH ya resistentes. Por el contrario, en la resistencia secundaria los virus se hacen resistentes en el paciente infectado como consecuencia de la presión selectiva que ejerce la exposición a fármacos ARV.

En ocasiones, el VIH es resistente a más de un medicamento. Cuando esto sucede, los medicamentos son llamados "de resistencia cruzada". Por ejemplo,

la mayoría de cepas de VIH resistentes a indinavir (Crixivan), también lo son a ritonavir (Norvir). Esto significa que indinavir y ritonavir poseen resistencia cruzada. La resistencia cruzada es importante para la elección de la terapia de primera vez o cuando debe hacerse cambio de medicamentos. Muchos medicamentos tienen, al menos parcialmente, resistencia cruzada.

1.11 Mecanismos para instaurar resistencia

Existen dos mecanismos bioquímicos para crear resistencia a los a NRTIs. El primer mecanismo es mediado por mutaciones en la enzima RT que permiten que ésta discrimine los NRTIs durante la síntesis, evitando su adición a la cadena creciente de DNA (35,36). Éste parece ser el mecanismo que opera en el caso de lamivudina, didanosina, zalcitabina y otros NRTIs.

El segundo mecanismo es mediado por mutaciones de escisión de nucleótidos que incrementan la velocidad de la remoción hidrolítica del NRTI terminador,

lo cual permite que la síntesis de DNA prosiga. El mecanismo de resistencia a zidovudina y estavudina es la escisión de la forma activa de estos compuestos.

(24, 37, 38, 39,40).

1.12 Ensayos para la detección de resistencia

Varios estudios han demostrado que la presencia de resistencia a los ARV antes de iniciar un nuevo régimen, es un predictor de respuesta virológica a dicho régimen (41,42). Además, algunos estudios prospectivos controlados han demostrado que los pacientes cuyos médicos tienen acceso a los ensayos de resistencia a los medicamentos para establecer sus esquemas terapéuticos,

particularmente datos de genotipificación, responden mejor a la terapia que los pacientes cuyos médicos no tienen acceso a este tipo de control (43, 44, 45,46). Los resultados retrospectivos y prospectivos han llevado a los paneles de expertos a recomendar el uso de pruebas de resistencia en el tratamiento de los individuos infectados por VIH (47,48). Las dos pruebas utilizadas son la genotipificación y la fenotipificación. La primera consiste en la identificación de las mutaciones asociadas a resistencia y se lleva a cabo mediante la secuenciación directa del genoma del VIH o por las técnicas de hibridación específica. Las pruebas genotípicas sólo detectan mutantes virales que comprendan por lo menos el 20-30% de la población total de virus y brindan una medida indirecta de la resistencia a los medicamentos. Mientras que en el ensayo fenotípico, que mide la susceptibilidad a los medicamentos, un inóculo fijo de VIH se cultiva en presencia de concentraciones crecientes de una droga específica para la cual se genera una curva dosis respuesta y se calcula la cantidad de droga necesaria para inhibir la replicación viral en un 50% (CI_{50}). Posteriormente se compara la susceptibilidad del virus aislado del paciente con la del virus silvestre a la misma droga. Se considera que hay resistencia si la CI_{50} de la muestra problema aumenta 2.5 veces o más en relación con la de referencia (49).

1.13 Transmisión de la resistencia a los ARV

La transmisión de variantes resistentes del VIH a los fármacos limita seriamente las opciones terapéuticas de los pacientes infectados por primera vez (50,51). La prevalencia de la resistencia primaria del VIH está

incrementando con el uso de ARV en países desarrollados y es una causa importante de falla al tratamiento que se ha asociado con incremento en la mortalidad. Reportes en Norteamérica indican que más del 14 % de los pacientes recientemente infectados son portadores de una cepa de virus caracterizada por contener mutaciones asociadas a resistencia o reducida susceptibilidad a una droga en particular (18,52). En el Reino Unido en el periodo junio de 1994 y agosto del 2000 se reportó incremento en el riesgo de ser infectado con VIH resistente, luego de un estudio que incluyó a 69 sujetos, 14% de los infectados de primera vez tenían VIH con una o más mutaciones asociadas con resistencia. La prevalencia de resistencia estimada para los que se infectaron en el año 2000 fue de 27%. (53). Se estima que la transmisión varía dependiendo del tipo de exposición y magnitud de la carga viral con la que se infecta el paciente (54). Incrementos significativos en la prevalencia de transmisión de resistencia han sido reportados en otros estudios. En Alemania

(1996-1999) la prevalencia fue de 13%, encontrándose principalmente resistencia a los inhibidores de la RT (55). En España (1997-1999), la prevalencia en seroconvertidos resistentes recientes fue de 26.7%. (56). En Francia ha habido un incremento gradual de resistencia primaria a los inhibidores de Pr, a los inhibidores no nucleosídicos y también un aumento gradual a más de una clase de ARV (57). En EE UU en un estudio multicéntrico realizado en primoinfectados con VIH (1995-2000) se reporta que la frecuencia de resistencia a uno o más medicamentos, incrementó de 3.4 en el periodo 1995-1998 a 12.4 de 1999-2000, (58). Resultados similares se encontraron por Ross (59) en un estudio de resistencia en 317 pacientes libres de

tratamiento en 40 ciudades de EE UU en el 2003 (los pacientes no fueron necesariamente recién infectados), 23% de ellos tenían susceptibilidad reducida al menos a un medicamento droga y 14% tenían al menos una mutación de resistencia reconocida. La resistencia a los (NNRTIs) fue la más prevalente. Hubo una asociación significativa entre la prevalencia de resistencia y la raza: 27%, 23% y 6% de blancos, negros e hispanos, respectivamente, fueron resistentes al menos a una droga. Esta asociación está probablemente relacionada con el acceso al tratamiento. Un reporte adicional del trabajo realizado en 39 clínicas de 10 ciudades de EE.UU. (1997-2001), demostró que 8.3% de la población estudiada tenía mutaciones de alta resistencia en la Pr y RT asociadas con susceptibilidad reducida a los ARV. La prevalencia de las mutaciones fue 11.6% para homosexuales, pero solo 6.1% y 4.7% para las mujeres y para los heterosexuales, respectivamente. (60).

Los beneficios de las pruebas de resistencia en pacientes infectados con VIH

por más de 6 a 12 meses de duración son inciertos hasta este momento (61).

Sin embargo, existe la necesidad de pruebas de resistencia en los pacientes libres de tratamiento para monitorear los cambios en la prevalencia de la transmisión de resistencia en los diferentes grupos de riesgo y para optimizar las opciones del tratamiento inicial. (62)

La resistencia puede prevenirse o puede ser retardada marcadamente manteniendo niveles plasmáticos de RNA- VIH por debajo de los límites de detección (63). Aunque esta meta puede lograrse con HAART, la resistencia aún a los más potentes agentes supresores, puede ocurrir si se permite la replicación del VIH aún lentamente en presencia de esos agentes.

CAPÍTULO II

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2.1 JUSTIFICACIÓN

Estudios recientes a nivel mundial han puesto de manifiesto la frecuencia creciente de las primoinfecciones con variantes resistentes del VIH, un problema que dificulta el abordaje terapéutico inicial de los pacientes recién diagnosticados como portadores del virus. En nuestro país, no se han realizado estudios de esta naturaleza y se desconoce la magnitud y el impacto de esta nueva situación epidemiológica, por lo que, el propósito de este trabajo fue determinar la frecuencia y tipo de mutaciones del VIH asociadas a resistencia primaria en pacientes VIH positivos en el noreste de México.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Objetivo General.

Determinar la frecuencia y tipo de mutaciones del VIH que confieren resistencia a los antirretrovirales en pacientes del Hospital Universitario U.A.N.L que no hayan recibido tratamiento previo.

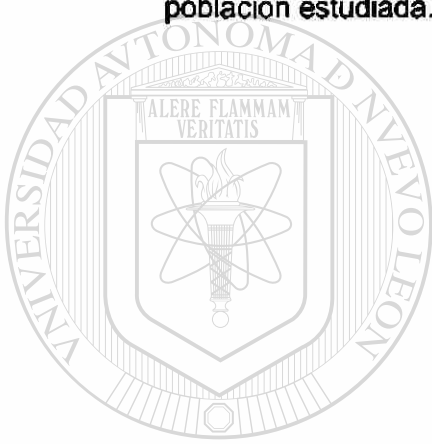
2.2.2 Objetivos específicos.

1. Estandarizar las condiciones de PCR para la amplificación y secuenciación de los genes de la Pr y la RT.

- 2. Analizar la presencia de mutaciones en las secuencias obtenidas.**

- 3. Correlacionar las mutaciones encontradas en la Pr y la RT con las mutaciones de resistencia reportadas e inferir la susceptibilidad a los antirretrovirales.**

- 4. Determinar la posible frecuencia de de resistencia primaria en la población estudiada.**



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPÍTULO III

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Origen de los reactivos, material y equipo de laboratorio

- El estuche para la determinación de la carga viral, AMPLICOR HIV-1 MONITOR 1.5 se adquirió de Roche Diagnostics, (Branchburg, NJ).
- El DNAc para la genotipificación se obtuvo mediante la (TR) del RNA utilizando el estuche de la enzima SUPERScript II RNase H Reverse Transcriptase de Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).
- Para la amplificación de los genes de la Pr y RT se utilizó la enzima Taq Platinum DNA polimerasa, buffer de reacción y cloruro de magnesio de Invitrogen, los dNTPs de Promega (Madison, WI, EUA) y aceite mineral de Sigma Chemical Company (Saint Louis, MO, EUA).
- Los juegos de iniciadores fueron comprados a BIOMOL, SA DE CV (México, D.F. México).
- Para la electroforesis se utilizó: agarosa (Invitrogene), trizma base, EDTA ácido bórico, azul de bromofenol, xilene cianol y bromuro de etidio SIGMA-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
- Como marcadores de peso molecular en las electroforesis se utilizó el DNA del plásmido pUC18 y pBS digeridos con las enzimas de restricción *Msp I* y el DNA de lambda digerido con *Pst I*. Las enzimas de restricción fueron adquiridas en New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA, EUA), y los DNAs plasmídicos se obtuvieron mediante técnicas de mediana

escala realizadas en nuestro laboratorio siguiendo procedimientos estándares (64). El fago lambda fue adquirido en Promega (Madison, WI, EUA).

- Tubos vacutainer morados de 5ml, agujas vacutainer verdes y jeringas de 10 ml se adquirieron en Becton Dickinson (NJ, EUA).
- Los tubos de microcentrífuga (de 2.0 ml), bandejas soportes, pipetas transfer, pipeteadores de canal múltiple, cilindros graduados, micropipetas, y puntas con filtro para carga viral fueron proporcionados por Roche Diagnostics (Branchburg, NJ).
- Las micropipetas de volumen variable de 2, 10, 20, 200 y 1000 μ l fueron obtenidos de Raining Instruments (Woburn, MA. EUA).
- Guantes de látex, tubos de microcentrífuga (de 0.2, 0.5 1.5 y 2.0 ml), puntillas (de 0.01, 0.2 y 1 ml) para las micropipetas se compraron a BIOMOL,SA de CV, México
- Lavador de microplaca, lector de microplaca, proporcionados por Roche Diagnostics (Branchburg, NJ).
- Campana de PCR C.B.S. Cientific Co (Del Mar Ca, EUA)
- Termociclador PTC-100 JM-Research (Watertown, MA, EUA) y un Omni-E Haydbaid (Reino Unido).
- Cámaras de electroforesis horizontal fotodyne (Hartland, WI, EUA) y una fuente poder de Gibco-BRL modelo 250.
- Equipo de fotodocumentación marca BioRad, modelo GelDoc 1000 (Hercules, CA, EUA) para análisis dimensional de geles compatible con PC, constituido de una cámara de video, una fuente de luz UV y una computadora.

3.2 Material biológico

Pacientes masculinos y femeninos que asistieron a consulta en el servicio de Infectología del Hospital Universitario de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L y que cubrieron los siguientes criterios de inclusión:

- 18 años o más
- infectados con VIH, confirmados con ELISA y Western blot
- sin tratamiento previo con ARV
- títulos plasmáticos de VIH-RNA mayores a 1000 copias/ml
- voluntariamente aceptaron participar en el proyecto mediante la firma de una carta de consentimiento informado.

3.3 Área de trabajo

El trabajo experimental del presente estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Genética Molecular del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

3.4 Estrategia general

Para cumplir con los objetivos planteados se siguió la estrategia general que a continuación se detalla e ilustra (figura 6).

1. Se analizaron las muestras de sangre de pacientes infectados por con VIH, libres de tratamiento antirretroviral y diagnosticados en el Servicio

de Infectología del Hospital Universitario UANL, en el periodo febrero de 2001 a septiembre de 2003.

2. Se separó el plasma de las muestras de sangre y se determinaron las cargas virales y las cuentas de linfocitos T-CD4 de cada paciente.
3. Se extrajo el RNA viral del plasma y se llevó a cabo la transcripción reversa (TR). Se estandarizaron las condiciones para amplificar por PCR las regiones correspondientes a la Pr y la RT a partir del DNAc utilizando 4 juegos de iniciadores específicos, uno para la Pr y tres para la RT.
4. Se comprobó la calidad de los productos amplificados (PA) mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.2% y se generaron imágenes digitalizadas utilizando el fotodocumentador.
5. Los fragmentos de la Pr y la RT fueron secuenciados en forma directa en un secuenciador ABI Prisma modelo 3100. Las secuencias obtenidas se alinearon con la secuencia de referencia HXB2 utilizando el programa GENEDOC.
6. El reporte de las mutaciones y su interpretación se obtuvieron mediante análisis computarizado utilizando el algoritmo Beta test de la Universidad de Stanford.

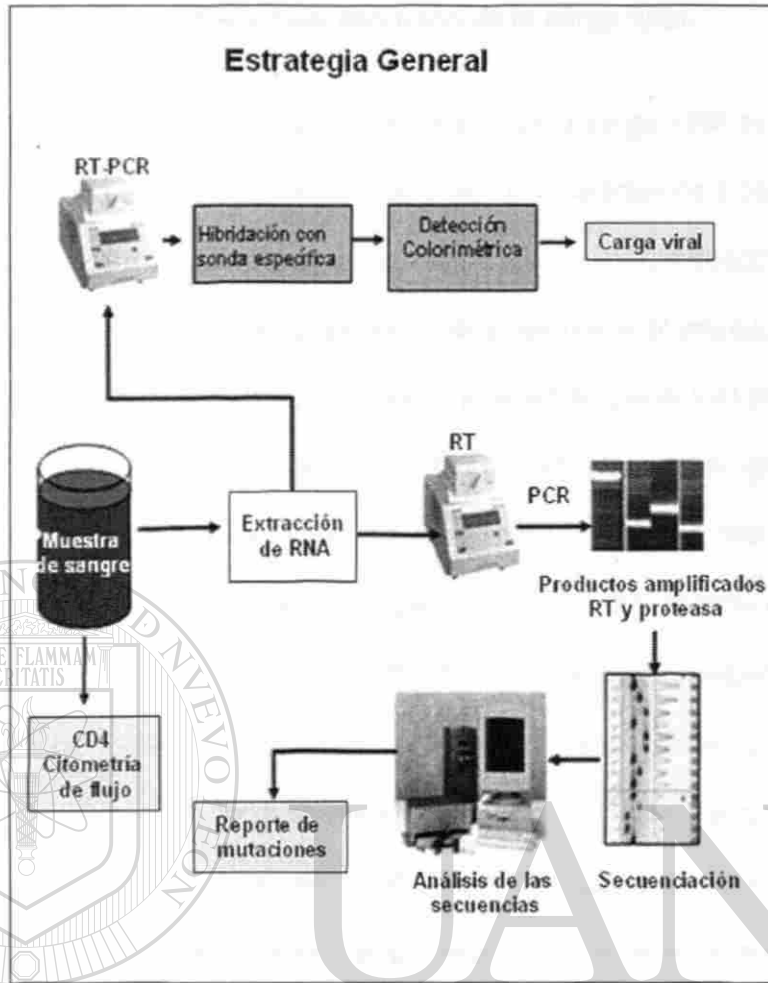


Figura 7. Estrategia general

3.4.1 Toma de muestras.

A cada paciente confirmado VIH positivo se le tomaron de 12 a 15 ml de sangre periférica en 3 tubos vacutainer impregnados con EDTA, la sangre de uno de los tubos se utilizó para la cuenta de T-CD4 (Citometría de flujo), la cual se realizó en el Departamento de Inmunología de la UANL el mismo día que se tomó la muestra. De los otros dos se separó el plasma en las primeras 6 horas luego de la toma y se almacenó a -70°C hasta el aislamiento del RNA.

3.4.2 Aislamiento de RNA y determinación de la carga viral.

La extracción de RNA viral y la cuantificación de la carga viral se realizaron dentro de una campana de flujo laminar y con las medidas de bioseguridad y esterilidad que corresponden. Las muestras de plasma fueron descongeladas a temperatura ambiente y para su procesamiento se utilizó el ensayo comercial Amplicor HIV-1 Monitor 1.5 aprobado por la FDA en el que el VIH se cuantifica identificando un segmento conservado de 155 nucleótidos del gen *gag* del virus. La determinación de la carga viral se basa en 5 procesos: preparación de la muestra, transcripción reversa (TR) del RNA viral para generar el DNAc, amplificación del DNAc blanco por PCR utilizando iniciadores específicos para HIV, hibridación de los productos con sondas específicas y detección colorimétrica de la unión de la sonda a los PA (figura 7). Las reacciones de TR y PCR se realizan simultáneamente utilizando la enzima rTth pol., Parte del RNA obtenido se usó para determinar la carga viral y el resto se almacenó a -70°C para posteriormente utilizarlo en la genotipificación.

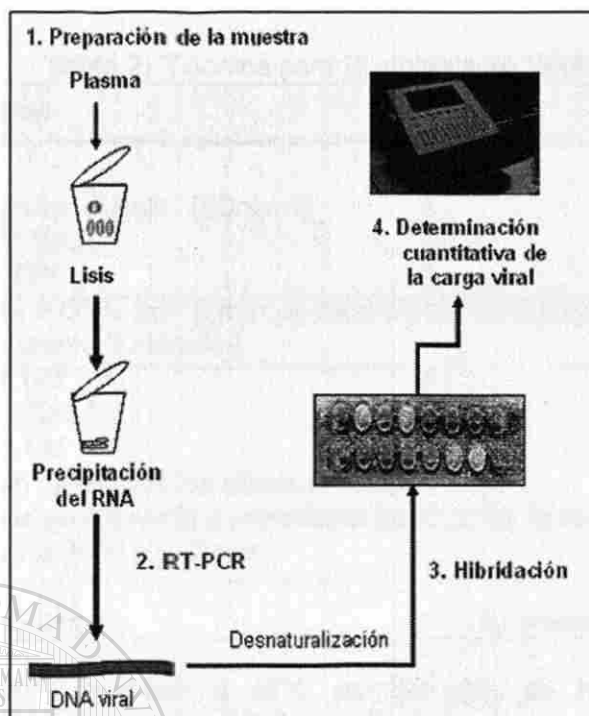


Figura 8. Aislamiento de RNA y determinación de la carga viral

3.4.3 Síntesis de DNAc

Se descongeló el RNA y se procedió a realizar la retrotranscripción de las muestras con carga viral mayor a 1000 copias RNA/ml. Algunas de ellas se centrifugaron a 14,000 rpm a 4°C durante 30 minutos y se resuspendieron en un volumen más pequeño del que estaban con el fin de lograr su mayor concentración. La TR se llevó a cabo en una campana previamente esterilizada con luz U.V, extremando cuidados con el material y los reactivos para evitar contaminación. El programa se desarrolló en un termociclador PTC-100 JM-Research. La cantidad de RNA utilizada fue de 1000 a 2000 copias en un volumen final de 20 µl. El DNAc obtenido se enfrió en hielo y se almacenó a -20°C. La técnica se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Técnica para la síntesis de DNAC

Reactivo	volumen (µl)
RNA	4
Iniciadores al azar (50ng/ml)	1
dNTPs 10mM	1
H2O DEPC	4
Incubar a 65°C por 5 min, al cabo de ese tiempo colocar en hielo durante 2 minutos.	
Buffer 10X	2
MgCl ₂ 25mM	4
DTT 0.1 M	2
RNAsin (inhibidor de ribonucleasa)	1
Mezclar gentilmente y centrifugar para juntar la muestra. Incubar a 25°C por 2 min.	
SuperScript II	1 (50 unidades)
Mezclar e incubar a 42°C por 50 min. se termina la reacción incubando a 70°C por 15 min.	
RNasa H (2 U/µl)	1
Incubar a 37° 20 min.	

3.4.4 Amplificación de los genes de la proteasa y RT.

Con el DNAC obtenido, se procedió a la amplificación de las muestras por duplicado para tener una mayor seguridad en los resultados.

Los genes de la Pr y RT conforman una región constituida por 1,614 pb aproximadamente y se localizan en la posición 2,258-3,872, del gen *pol*. Para la amplificación de este fragmento se utilizó el programa Primer 3 (65) con el cual se diseñaron 4 juegos de iniciadores (tomando como base la secuencia de referencia HXB2) un juego para el gen de la Pr y 3 para el gen de la RT. Con estos últimos se obtuvieron 3 fragmentos que comprendían a las regiones 5', media y 3' del gen. En algunas muestras se logró amplificar el fragmento completo que incluía los dos genes (Pr y RT) utilizando los iniciadores 5' de Pr y 3' de la última región de la RT y a partir de éste segmento de 1,734 pb, se

obtuvieron por PCR anidada las 4 regiones (proteasa; 5', media y 3' de la RT). En la figura 8 se representa el gen *pol* al que pertenecen los genes de Pr y RT, se muestra la estrategia para el diseño de los iniciadores y el tamaño de los fragmentos que se obtienen en pares de bases.

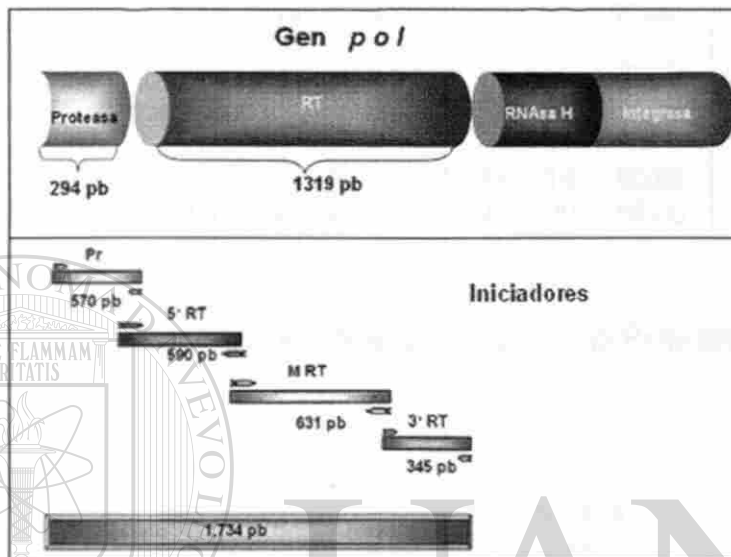


Figura 9. Diseño de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos para la amplificación de los genes de Pr se describen en el cuadro 1.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Cuadro 1. Iniciadores para el gen de la proteasa

Oligonucleótidos	Tm	mer	%gc
HIV-PROT-1 cccaccagaagagagcttcagg	68.4	22	59.1
HIV-PROT-2 ggagtattgtatggatttcaggccc	68.6	26	46.2

En el cuadro 2 se muestran los oligonucleótidos para el gen de la RT.

Cuadro 2. Iniciadores para las regiones 5', media y 3' del gen de la RT

Oligos	Tm	mer	%gc
5'RT-1 cccattagccctattgagactg	59.98	22	50.00
5'RT-2 gctgccctatttctaagtcagatcc	62.73	25	48.00
M1RT cacaggggatggaaaggatca	60.86	20	50.00
M2RT gcacccctcattctgcata	61.00	20	50.00
3'RT1 gcaaggccaatggacata	57.98	18	50.00
3'RT2 ctgtagctgccccatctac	57.45	20	55.00

La mezcla de reacción para la amplificación del gen de la Pr se presenta en la tabla 3.

Tabla 3. Condiciones de reacción para la amplificación del gen de proteasa.

Reactivo	μ l
Buffer 10x	3.0
MgCl ₂ 50 mM	1.2
dNTPs 10mM	0.8
Oligo 5' 10 μ M	0.5
Oligo 3' 10 μ M	0.5
Taq.pol 5u/ μ l	0.3
DNAc	2.0
H ₂ O para	30.0

Para amplificar las regiones 5', media y 3' de la RT se utilizaron condiciones similares a las de la Pr, exceptuando la cantidad de magnesio (50 mM) que para la región 3'RT fue de 0.9 μ l.

En la tabla 4 se indican las condiciones de reacción del fragmento Pr- RT completo, utilizando los iniciadores HIV-PROT 1 y 3'RT2.

Tabla 4. Condiciones de reacción para la amplificación del gen de la RT

Pr-RT completo μ l	
Buffer 10x	3.0
Mgcl2 50 mM	1.0
dNTPs 10mM	0.6
Oligo 5' 10 μ M	0.6
Oligo 3' 10 μ M	0.6
Taq.pol 5u/ μ l	0.3
DNAc	2.0
H2O para	30 μ l

A partir del DNAc, los iniciadores antes descritos y con las mezclas de reacción correspondientes, se procedió a la amplificación de los genes, utilizando los termocicladores PTC-100 JM-Research y Omni-E Haydbaid.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



Tabla 5. Programa de amplificación del gen de la proteasa

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Evento
1	94	2.0	Desnaturalización
2	94	0.30	Desnaturalización
3	66	1.0	Alineamiento
4	72	1.0	Extensión
40 ciclos a partir del paso 2			
6	72	6.0	Extensión final

Para la amplificación de las regiones 5' y media de la RT se utilizó el mismo programa que el de la Pr pero con una temperatura de alineamiento de 68°C, y para la región 3' RT se utilizó una temperatura de alineamiento de 62°C. Para esta última la extensión final fue de 5 minutos.

En la tabla 6 se indica el programa utilizado para la amplificación de la región que incluye a los genes de la Pr y de la RT.

Tabla 6. Programa de amplificación del gen Pr-RT completo

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Evento
1	94	2.0	Desnaturalización
2	94	0.30	Desnaturalización
3	58	1.0	Alineamiento
4	72	1.40	Extensión
40 ciclos a partir del paso 2			
6	72	6.0	Extensión final

Para algunas muestras, se tuvieron que modificar las condiciones de reacción y el programa de amplificación que se habían estandarizado. Se abundará en este punto en otro apartado.

3.4.5 Verificación de los productos amplificados.

Para verificar el tamaño de los productos obtenidos, se corrieron 7 µl de los amplicones más 1µl de jugo azul 6X. Como marcador de peso molecular se utilizaron los plásmidos pUC o pBS+ *Msp1* para los fragmentos de de 345 a 631 y λ+ *Pst I* para el fragmento de 1735 pb) en un gel de agarosa 1.2 %

preparado con TBE 1X. Las muestras se sometieron a electroforesis a 76 V en su inicio y posteriormente a 100 V. Al cabo de 40 minutos aproximadamente se hizo la tinción del gel en bromuro de etidio (2 µg/ml) durante 5 minutos y posteriormente se lavó en un recipiente que contenía agua. Finalmente se observó en el fotodocumentador.

3.4.6 Secuenciación de los productos amplificados.

Quince microlitros de cada uno de los PA (libres de inespecificidades) y sus duplicados se enviaron para su secuenciación al Masonic Medical Research Laboratory, N.Y. La secuenciación se realizó en forma directa en un secuenciador ABI Prisma modelo 3100. Las secuencias obtenidas se alinearon en el programa GENEDOC con la secuencia de referencia HXB2 que se puede encontrar en " HIV RT and Protease Sequence Database" (66) (No de acceso al GeneBank K03455). El alineamiento se llevó a cabo en la región que incluye

a los nucleótidos 2,258 a 3872.

3.4.7 Análisis e interpretación de las secuencias.

Para el análisis de las secuencias e interpretación de las mutaciones se utilizó el algoritmo Stanford HIV db "beta test" (67) el cual reporta niveles de resistencia a los medicamentos ARV que han sido aprobados por la FDA. El programa asigna un puntaje a cada mutación de resistencia, suma los puntajes y con el total reporta uno de los siguientes niveles de resistencia a los ARV: susceptible, potencial bajo nivel de resistencia, bajo nivel de resistencia,

resistencia intermedia y alto nivel de resistencia. En las figuras 10 y 11 pueden observarse las mutaciones que hasta la fecha se han asociado con resistencia a los ARV.

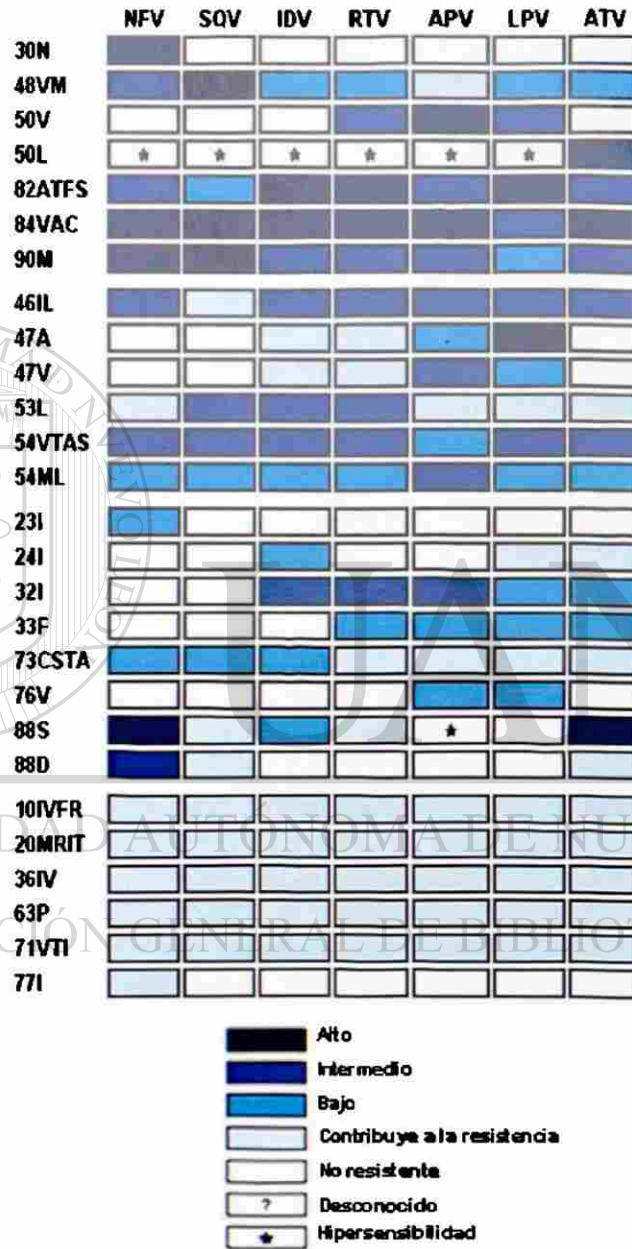


Figura 10. Mutaciones asociadas con resistencia a los IP

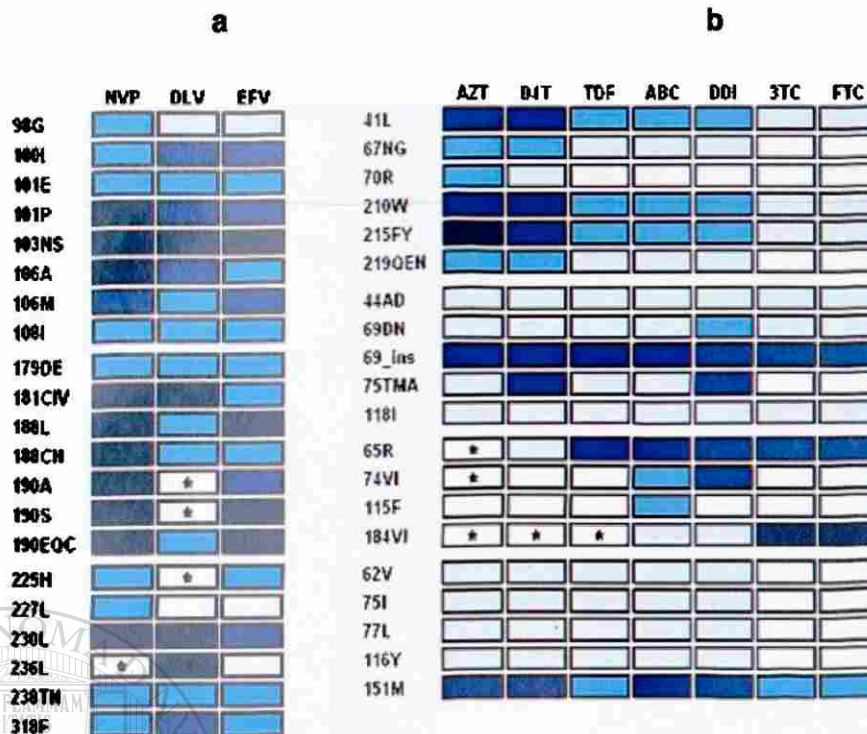


Figura 11. Mutaciones asociadas con resistencia a los IRT (a). INNRT, (b) INRT.

Existen 5 Niveles de resistencia

1. Susceptible. puntaje (0-9): El genotipo no reduce la susceptibilidad a los ARV.

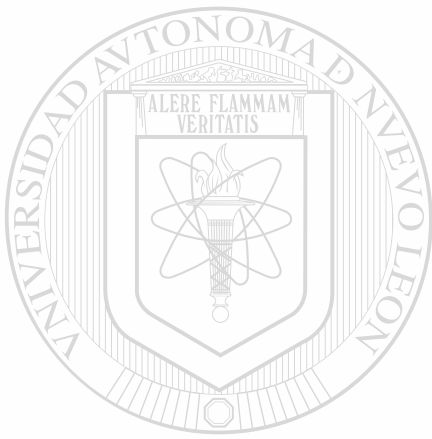
2. Potencial bajo nivel de resistencia. (10-14): Las mutaciones por si mismas no causan resistencia, indican la posibilidad de previa selección por los ARV.

3. Bajo nivel de resistencia. (15-29): Los virus con este genotipo tienen susceptibilidad reducida a Los medicamentos y pueden tener una respuesta virológica subóptima al tratamiento.

4. Resistencia intermedia. (30-59): El genotipo de este virus sugiere un grado de resistencia mayor al anterior sin llegar a ser de alta resistencia.

Alto nivel de resistencia. (Mayor a 60): Los pacientes generalmente tienen poca o no tienen respuesta al tratamiento con ARV.

El programa también compara la secuencia del virus aislado con una lista de secuencias de referencia del VIH-1 grupo M y le asigna el subtipo de la secuencia de referencia más cercana.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

Se analizaron un total de 42 muestras de plasma de pacientes en su mayoría del sexo masculino y con edad promedio de 33 años; diagnosticados VIH positivos en el servicio de infectología del Hospital Universitario de la UANL, entre febrero de 2001 y septiembre de 2003. A las muestras se les determinaron los niveles plasmáticos de VIH-RNA y la cuenta de células T-CD4. Se amplificaron los genes completos de la Pr y de la RT en 30 de dichas muestras. En seis se amplificó únicamente el gen de la RT y en otras tres solamente el gen de la Pr. De las tres restantes se obtuvieron algunos de los fragmentos de los genes pero ninguno se completó por lo que se excluyeron del estudio.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
4.1 Datos demográficos y biológicos de los sujetos ®
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

El estudio comprende en total a 39 pacientes del noreste de México, los datos demográficos se muestran en la tabla 7. La población se distribuyó en 4 grupos según los factores de riesgo de infección por VIH: heterosexuales 41%, homosexuales 15.4%, consumidores de drogas por vía endovenosa 12.5% y bisexuales 7.7%. El resto no refirió factores de riesgo.

Tabla 7. Datos demográficos

Lugar de residencia	No	(%)
Cerralbo, Nuevo León	1	2.5
Cd. Victoria, Tamaulipas	1	2.5
Escobedo, Nuevo León	1	2.5
Guadalupe, Nuevo León	2	5.0
Hualahuises, Nuevo León	1	2.5
Monterrey, Nuevo León	26	66.0
Reynosa, Tamaulipas	1	2.5
Saltillo, Coahuila	2	5.0
San Luis Potosí, SLP	2	5.0
Sn. Nicolás de los Garza, NL	1	2.5
Tampico, Tamaulipas	1	2.5

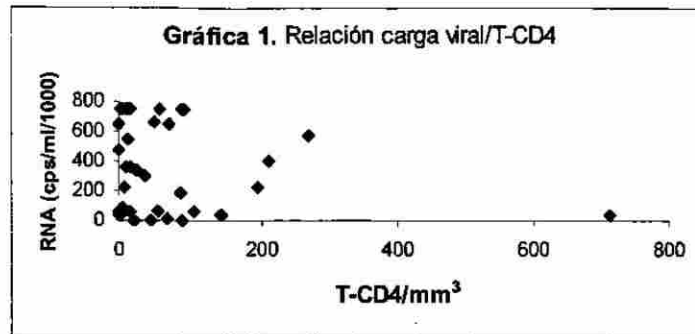
En la tabla 8 se presentan en forma resumida las características de los sujetos que se integraron al estudio.

Tabla 8. Características de los sujetos (n=39)

	No	%
Sexo		
Masculino	35	90
Femenino	4	10
Edad (años)		
20-45	33	85
46-58	6	15
Carga viral RNA-VIH (cps/ml/1000)		
1-50	7	17
50->750	32	83
Cuenta de T-CD4⁺ (Células/mm³)		
0-199	36	92
200-719	3	8

Frecuencia de mutaciones del VIH que confieren resistencia a los antirretrovirales en pacientes del Hospital Universitario UANL que no han recibido tratamiento previo.

La gráfica 1 muestra la relación entre la carga viral y la cuenta de linfocitos T-CD4.



4.2 Genotipificación

4.2.1 Amplificación de los genes de la proteasa y RT.

Se probaron diferentes mezclas de reacción para la amplificación de los distintos segmentos. En la figura 12 se presenta la fotografía de un gel que muestra algunos PA del gen de la Pr.

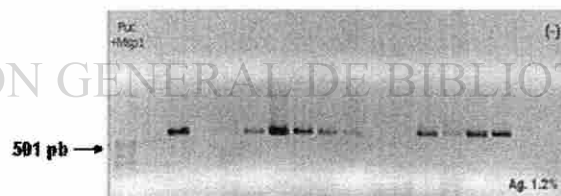


Figura 12. Productos amplificados del gen de la proteasa

En la figura 13 se muestran los PA de las regiones 5', media y 3' de la RT

Frecuencia de mutaciones del VIH que confieren resistencia a los antirretrovirales en pacientes del Hospital Universitario UANL que no han recibido tratamiento previo.

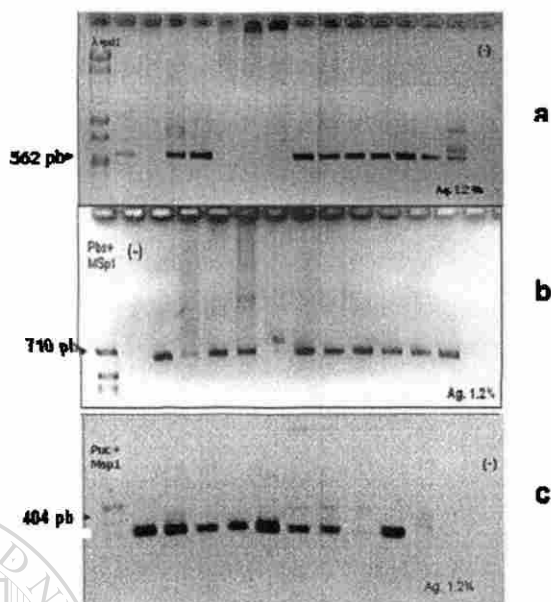


Figura 13. PA de las regiones 5' (a), media (b) y 3' (c) de la RT

Las muestras que no amplificaron bajo las condiciones estandarizadas, o que mostraron inespecificidades, se procesaron en forma individual ya sea variando la concentración de magnesio, modificando la temperatura de

alineamiento o se obtuvieron por PCR anidada a partir del segmento Pr-RT.

De esta forma se amplificaron algunas de ellas y se mejoró la calidad de otras.

En la figura 14 se muestra la fotografía de un gel con las bandas del segmento completo Pr-RT.

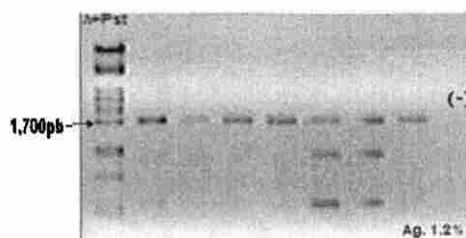


Figura14. PA de la región proteasa-RT

4.2.2 Secuenciación y análisis de las secuencias obtenidas.

De cada muestra, se secuenciaron los PA de dos reacciones de PCR independientes. Por lo tanto se obtuvieron para cada muestra 4 secuencias: dos en el sentido 5'→3' y dos en el sentido 3'→5'. En la figura 15a, se aprecia el alineamiento de algunos nucleótidos de una de las secuencias obtenidas, con la secuencia de referencia HXB2 (primera fila). En los casos en que el cromatograma mostró doble pico (figura 15b) la secuencia se analizó tomando en cuenta una y otra base. En ninguna de las muestras que presentaron esta característica se encontró resistencia por el cambio de base.

a

```

360      *      380      *      400
TGTGGACATAAAAGCTATAGGTACAGTATTAATAGGACCTACACCTGTCAA
TGTGGACACAGAGCTATAGGTACAGTATTAATAGGACCTACACCTGTCAA
TGTGGACACAGAGCTATAGGTACAGTATTAATAGGACCTACACCTGTCAA
TGTGGACACAGAGCTATAGGTACAGTATTAATAGGACCTACACCTGTCAA
TGTGGACACAGAGCTATAGGTACAGTATTAATAGGACCTACACCTGTCAA
TGTGGACACAGAGCTATAGGTACAGTATTAATAGGACCTACACCTGTCAA

```

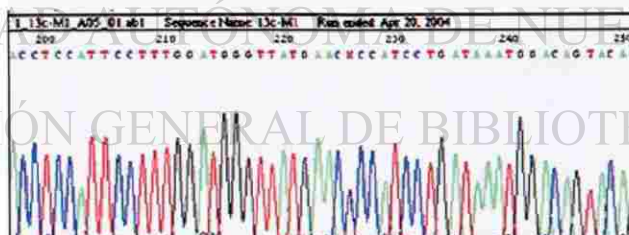


Figura 15. Ejemplo de las secuencias obtenidas

En relación con las muestras en las que hubo que modificar las condiciones de reacción y el programa de amplificación para poder obtener los fragmentos, las secuencias de tales fragmentos se alinearon con el iniciador correspondiente y con la secuencia HXB2. En la figura 16 se aprecian los resultados de 2 de ellas

VIH de las muestras en relación con el HXB2, cuya secuencia se utilizó para el diseño de los iniciadores.



Figura 16. Alineamiento de las muestras con los Iniciadores y con la secuencia HXB2

En relación con esta característica del virus, en la figura 17 se observa una panorámica de una región de 47 bases de la RT de 21 muestras diferentes alineadas con la secuencia de referencia (primera fila) donde pueden apreciarse varios cambios en esa región.

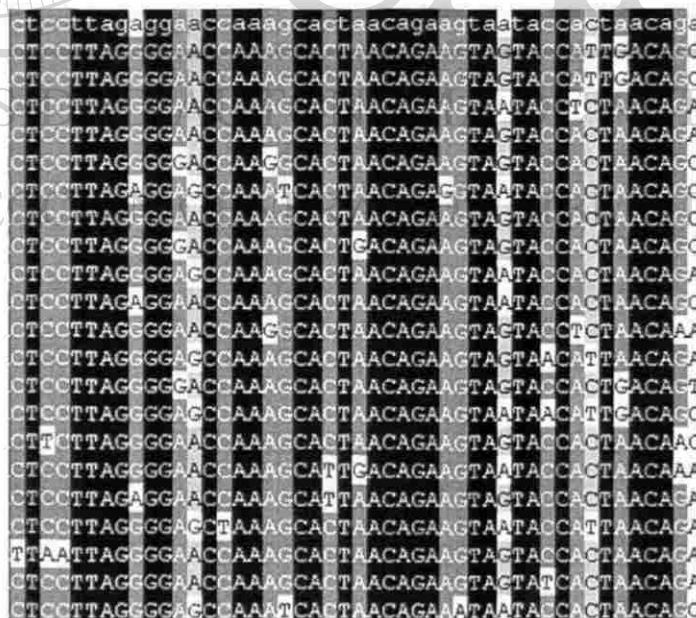


Figura17. Alineamiento de una región de la RT con la secuencia HXB2.

El análisis de las secuencias obtenidas no reportó mutaciones de resistencia en el gen de la proteasa y únicamente se encontraron mutaciones que contribuyen en la resistencia (secundarias) a los inhibidores de dicha enzima. En la gráfica 2 se muestra la frecuencia de estas mutaciones y el número de muestras que las presentaron. En 7 de los aislados (21%) se presentó una mutación, en 10 (30%) 2 mutaciones, en 7 (21%) 3 mutaciones y en una muestra (3%), se presentaron como máximo 4 mutaciones del tipo mencionado. No se presentaron este tipo de mutaciones en 8 muestras. La mayoría de los cambios se observaron en las posiciones 93, 63 y 77 (48, 42 y 39 % respectivamente) y con menor frecuencia se identificaron otras en las posiciones 71, 33, 60, 36, y 10 tabla 9.

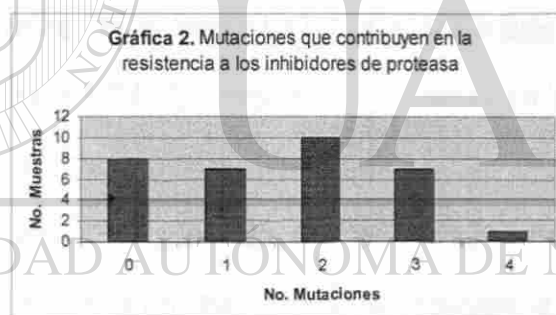
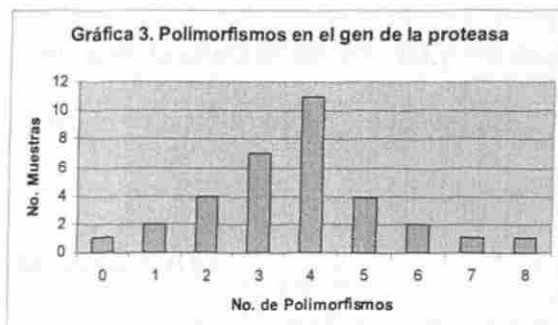


Tabla 9. Frecuencia de mutaciones secundarias en el gen de la proteasa (n=33)

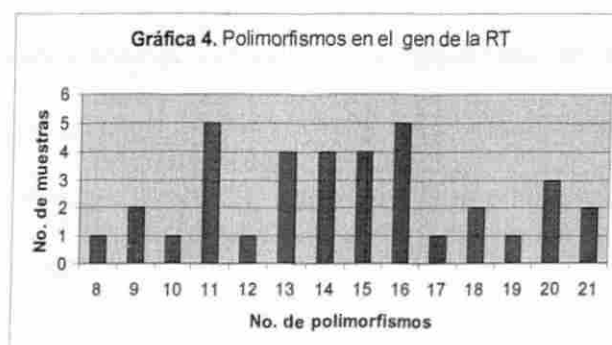
Codón	No. pacientes	(%)
I93L	16	48
L63P	14	42
V77I	13	39
A71T,V	4	12
L33F	1	3
M36I	2	6
L10I	1	3

También en el gen de la proteasa se encontraron diferentes polimorfismos que no se han asociado con resistencia gráfica 3.



En relación con el gen de la RT, en uno de los aislados se detectó la mutación M184V que se asocia con alto nivel de resistencia a los INRT (lamivudina y emtricitabina) y en otro la mutación V179D que causa bajo nivel de resistencia a cada uno de los INNRT. En tres de las muestras se detectó la mutación V118I la cual causa bajo nivel de resistencia a 3TC y probablemente al resto

de los NRTIs cuando se presenta con la mutación E44A/D. También se encontraron polimorfismos no relacionados con resistencia a los inhibidores de la RT y se muestran en la gráfica 4.



4.2.3 Interpretación de las mutaciones que contribuyen en la resistencia a los inhibidores de proteasa.

- V77I es una mutación que se asocia con resistencia a NFV
- Los polimorfismos en la posición 63, 71, 93 y 10I se asocian con resistencia a los inhibidores de Pr cuando están presentes con otras mutaciones.
- L33F se selecciona por RTV, APV, LPV y puede contribuir a la resistencia a estos ARV así como a ATV.
- M36I se presenta en algunos subtipos no-B y tienen poco o ningún efecto en la susceptibilidad a los PI.

4.2.4 Frecuencia de mutaciones de resistencia en el gen de la proteasa

La suma del puntaje de las mutaciones encontradas (reportado por el algoritmo beta test) no es mayor a 9, tomando como base este resultado, podría inferirse que las cepas virales de las muestras analizadas son susceptible a los IP.

4.2.5 Interpretación de las mutaciones en el gen de la RT

Mutaciones asociadas con los INRT

- V118I Causa resistencia a 3TC y probablemente al resto de los INRTI cuando se presenta con E44A/D, pero no fue el caso en este estudio.
- M184V causa alto nivel de resistencia a lamivudina y emtricitabina (>100 veces). Se asocia también con bajo nivel de resistencia a ABC y DDC y reduce la sensibilidad a DDI.

Mutaciones asociadas con los INNRT

- V179D causa potencial bajo nivel de resistencia a DLV, EFV, NVP

4.2.6 Frecuencia de mutaciones de resistencia en el gen de la RT

En este estudio la frecuencia de mutaciones en el gen de la RT asociadas con alto nivel de resistencia fue de 3% y un 3% de los aislados presentó bajo nivel de resistencia.

4.2.7 Subtipo al que corresponden las variantes virales

En todas las muestras analizadas, las secuencias de los genes de la Pr y de la RT presentaron una similitud del 95 al 98% a los del subtipo B del VIH-1, por lo que puede considerarse que el único subtipo presente en la población estudiada es B.

Las 39 secuencias se encuentran reportadas en el Gen Bank con números de acceso: AY812748-AY812750, AY926353-AY926357, DQ150700-DQ150730.

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

En los pacientes infectados con VIH, el primer esquema terapéutico es uno de los factores más importantes para producir una supresión virológica eficaz y duradera (11). El conocimiento de la prevalencia de variantes resistentes es una herramienta útil para optimizar dichos esquemas y así obtener una mejor respuesta inmunológica evidenciable por la cuenta de T-CD4. Nuestro interés se enfocó en las mutaciones de los genes de la Pr y de la RT que confieren resistencia a los ARV en pacientes que no han sido tratados previamente. Para tal fin se investigó la frecuencia de dichas mutaciones del VIH, en una muestra de 39 pacientes en una población del noreste de México. El 90% de la muestra se constituyó por sujetos del sexo masculino y en su mayoría desempleados.

La mayor parte de los participantes se reportaron como heterosexuales, seguidos por homosexuales, adictos a las drogas por vía endovenosa y bisexuales como factores de riesgo de exposición al VIH. Únicamente 3 pacientes presentaron cuentas de T-CD4 de más de 200 células mm^3 y las cargas virales fueron mayores a 14,000 copias de RNA/ml, excepto en un paciente que tuvo 1000 copias. se esperaría que a mayores cuentas de T-CD4 la carga viral fuera menor sin embargo, aunque la mayoría de los pacientes tienen cuentas de T-CD4 menores de 300, algunos pacientes tuvieron cargas virales altas y otros cargas relativamente bajas, no hay una relación directa entre la cantidad de estas células y la carga viral. La relación entre estos parámetros y la presencia de resistencia a los ARV se ha investigado, sin

embargo los datos son controvertidos (91) En relación con la genotipificación es importante resaltar la diversidad genética que se identificó en las secuencias de los aislados, lo cual tuvo repercusión al estandarizar las condiciones para amplificar las diferentes regiones, ya que los iniciadores se diseñaron tomando como base la secuencia de referencia HXB2 y las secuencias de algunas muestras no se complementaban con el oligonucleótido correspondiente.

En todas las muestras de los pacientes en que se estudió el gen de la Pr las mutaciones encontradas fueron "menores" (secundarias), no se asocian por sí solas con resistencia a los inhibidores de la enzima, pero contribuyen cuando existen otras mutaciones. En 7 de los aislados (21%) se presentó una mutación, en 10 (30%) 2 mutaciones, en 7 (21%) 3 mutaciones y en una muestra (3%) se presentaron como máximo 4 mutaciones del tipo mencionado.

No se detectaron este tipo de mutaciones en 8 muestras. La mayoría de los cambios se observaron en las posiciones 93, 63 y 77 (48, 42 y 39 %

respectivamente) y con menor frecuencia se identificaron otras en las posiciones 71, 33, 36 y 10. Estas posiciones polimórficas contribuyen a la

resistencia, pero solo en combinación con otras mutaciones de resistencia. Las mutaciones en las posiciones 10, 36, y 71 ocurren en más del 5 al 10% de individuos no tratados infectados con virus subtipo B; pero en pacientes tratados que albergan aislados con otras múltiples mutaciones, la prevalencia incrementa dramáticamente. La posición 63 de la Pr es la más polimórfica, en los no tratados cerca del 45% de los aislados tienen 63L (consenso subtipo B), 45% en 63P y el 10% en otros residuos en este sitio. La mutación I93L se asocia estadísticamente con múltiples inhibidores de Pr, mientras que V77I

se asocia solo con nelfinavir (68,69). Existe la hipótesis de que los individuos que albergan aislados conteniendo múltiples mutaciones secundarias, pueden tener un riesgo mayor de falla virológica durante la terapia con IP (70) pero otros estudios no apoyan esta hipótesis (71). La mutación L33F ha ocupado la atención recientemente, debido a su asociación con falla de respuesta al inhibidor experimental tipranavir (72). Se ha reportado una gran variabilidad en el gen de la Pr, el 47.5% de las 99 posiciones de sus aminoácidos presenta polimorfismos y muchos de los cambios de los aminoácidos conocidos que contribuyen a resistencia ocurren como polimorfismos naturales en aislados de pacientes que nunca han recibido IP (73,74).

En el gen de la RT se detectó una mutación asociada con alto nivel de resistencia a los INRT (M184V) con una prevalencia de 3% una mutación asociada con bajo nivel de resistencia a los INNRT (V179D) con prevalencia también de 3%. La mutación M184V por sí sola causa alto nivel (100 veces)

de resistencia a lamivudina y emtricitabina y bajo nivel de resistencia a didanosina, zalcitabina y abacavir; además incrementa la susceptibilidad a zidovudina, estavudina y tenofovir. La mutación emerge rápidamente en pacientes recibiendo monoterapia con lamivudina y también generalmente es la primera en desarrollarse en aislados de pacientes recibiendo tratamientos no completamente supresivos (75, 76,77). La posición 184 se encuentra en una región conservada de la RT cercana al sitio activo. La mutación resulta de una sustitución A por G que cambia el nucleótido ATG (metionina) por GTG (valina) (78), generándose impedimento estérico entre el anillo de lamivudina y la cadena ramificada de la valina, afectando de esa manera la unión del inhibidor.

Al examinar la prevalencia de resistencia secundaria (selección de virus resistentes al iniciar la terapia) en pacientes con infección primaria, la mayoría de los que recibieron terapia antirretroviral a largo plazo presentaron la mutación M184V como la mutación más prevalente. Entre el grupo de transmisores potenciales de virus resistentes, cerca de 75% de pacientes con terapia a largo plazo tenían la mutación 184V, pero solo cerca del 20% de pacientes en el grupo que presentaba variantes virales con alguna mutación en la infección primaria (resistencia primaria), tenían la mutación M184V. Por lo tanto, se evidenció una pendiente descendente en la transmisión. La explicación puede ser que después de la infección primaria el virus mutante revierta hacia virus silvestre o que la capacidad de replicación viral se afecte por la mutación (79). Se valoró el impacto genético y fenotípico de la suspensión del tratamiento con lamivudina, determinando la resistencia a la misma en nueve pacientes antes y después de interrumpir los ARV (80). El total de los pacientes mantuvieron 100% de resistencia mientras estaban bajo tratamiento, aproximadamente dos semanas después de interrumpida la terapia la IC_{50} empezó a declinar en un paciente, y en periodos de 7 semanas a 14 meses, la sensibilidad a lamivudina se restauró casi completamente. Así, parece que la población del virus cambia de resistente a silvestre al suspender la lamivudina, eliminándose de la población viral la resistencia fenotípica a la droga. La cinética de la desaparición de M184V presentó una gran variabilidad interpaciente y en algunos no ocurre del todo. Aunque algunas mutaciones de resistencia transmitidas pueden perdurar por meses y hasta años (81), tales mutaciones en ausencia de presión selectiva ejercida por los ARV, revierten a una variante replicativa más competente y cuando esto ocurre, la mutación

transmitida no es detectable por los métodos de rutina por lo que las proporciones de transmisión de resistencia observadas pueden ser subestimadas comparadas con las que se habrían determinado cuando se llevó a cabo la infección (58). Lo anterior, indica que probablemente el paciente que adquirió la mutación M184V fue infectado antes del estudio genotípico por otro paciente que estaba bajo la acción de los antirretrovirales que seleccionan dicha mutación. En una de las muestras se detectó la mutación K101Q la cual se consideraba causante de resistencia de bajo nivel a cada uno de los INNRT (82), sin embargo en la base de datos actual se considera sin efecto.

La mutación V118I observada en 3 de los aislados, ocurre normalmente en el 2% de los pacientes no tratados, pero su frecuencia aumenta en personas recibiendo INRT. En un estudio se encontró que las mutaciones V118I y E44D fueron más comunes en virus de pacientes tratados con zidovudina y se asociaron con alto nivel de resistencia a zidovudina cuando se presentan

ambas (92). El efecto de V118I y E44D cuando se presentan en forma aislada no es todavía claro. En los aislados que presentaron la mutación V118I no se encontró la mutación E44A/D y por sí misma al parecer no limita la actividad virológica de los regímenes que contienen lamivudina (83). En la mayoría de las secuencias de los genes de la Pr y de la RT se encontraron polimorfismos que hasta la fecha no se han relacionado con resistencia. La mutación K103R de la RT se presentó en 6 de las muestras, dicha mutación ocurre aproximadamente en 1% de portadores no tratados y por sí misma no causa resistencia (84). El gen de la RT presentó mayor número de polimorfismos por secuencia (8-21) comparado con el de Pr (0-13)

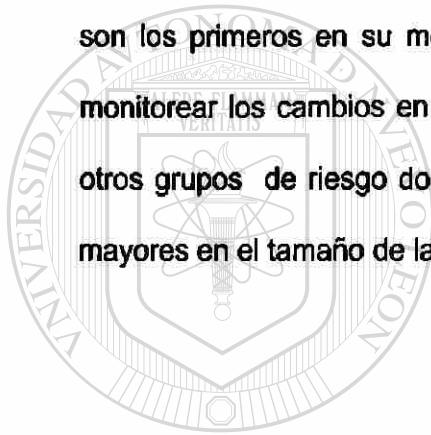
La prevalencia de mutaciones que confieren alto nivel de resistencia a los ARV observada en esta investigación es baja (3%) comparada con la reportada en otros estudios similares, en los que se ha reportado hasta un 27% (53), sugiriendo estos resultados que la transmisión de cepas resistentes del VIH es todavía rara en pacientes recién diagnosticados en esta región del país. Si bien en los reportes de América y Europa existen diferencias en la prevalencia de las variantes resistentes en personas con primoinfección, la mayoría de ellas pueden explicarse por los diferentes métodos utilizados para detectar la resistencia, por la variabilidad geográfica en los patrones de uso de los ARV y la variación en los factores de riesgo para la exposición al VIH. En un estudio sobre resistencia en pacientes libres de tratamiento en 40 ciudades de EE.UU, se encontró una asociación significativa entre la prevalencia de resistencia y la raza: 27% 23% y 6% de blancos, negros e hispanos respectivamente, fueron portadores de cepas resistentes al menos a un agente antirretroviral. Esta asociación está probablemente relacionada con el acceso al tratamiento (59).

Otros datos en EE.UU también sugieren que las mutaciones primarias asociadas con resistencia a los INRT, INNRT o IP (4.7% 1.3% o 5.6% respectivamente, fueron poco comunes en sujetos sin tratamiento en poblaciones poco representativas (mujeres, usuarios de drogas intravenosas y prisioneros) (85). En Israel, analizaron 176 pacientes recién infectados por VIH sin tratamiento previo con ARV y encontraron que de los no portadores de mutaciones de resistencia, al menos 55% fueron pacientes infectados en ciudades donde no había disponibilidad de tratamiento y encontraron virus resistentes en 14.8% en los pacientes que tuvieron disponibilidad de los ARV

(86). Bajos niveles de resistencia también se reportan en una población indigente en San Francisco, California, en la que a pesar de la conducta de alto riesgo para la exposición del grupo a cepas resistentes, la frecuencia de mutaciones apareció más baja que en otras cohortes que están en tratamiento, concluyéndose que la resistencia no es común en individuos con pobre adherencia al tratamiento, ya que hay insuficiente presión de la droga para seleccionar a los virus resistentes (87). La muestra del presente estudio reúne características similares a las reportadas en el sentido de que la infección de los sujetos que se integraron al estudio pudo darse a partir de otros individuos con poco o nulo acceso a la terapia ARV o bien con pobre adherencia a la misma, debido a las condiciones socioeconómicas de la mayoría de sujetos que conformó el grupo. Sin embargo se considera que son varios los factores involucrados en el desarrollo de la resistencia a los ARV: factores del huésped (estado de inmunidad), propiedades de los medicamentos (niveles, actividad antirretroviral e interacciones entre los medicamentos que conforman el régimen) y las propiedades virales (carga viral, susceptibilidad, y poblaciones preexistentes de virus resistentes (88). El hecho de no haber encontrado niveles representativos de resistencia primaria en este grupo de investigación, no excluye a la resistencia en otro tipo de población con acceso a los ARV. Además, por la sensibilidad de los métodos sólo se detectan especies virales si éstas conforman más del 30 % del total de la población de los virus. Por otro lado, algunos estudios han descrito discordancia entre los compartimientos donde se localiza el virus, habiéndose identificado secuencias de resistencia en el DNA proviral mas no en el RNA viral del plasma, lo que indica que el DNA proviral contiene archivos de secuencias que solo se pueden detectar en las

células mononucleares de sangre periférica (89) y que no siempre producen cepas replicativas.

Aunque no existen estudios previos en México en los que se haya analizado la prevalencia de mutaciones de resistencia del VIH a los antirretrovirales, con estos datos hemos demostrado que la frecuencia de mutaciones es más baja que la reportada a partir de otras cohortes fuera del país con acceso al tratamiento y similar a aquellas donde no se dispone de él. Estos resultados son los primeros en su modalidad en nuestro país y crean la necesidad de monitorear los cambios en la prevalencia de la transmisión de resistencia en otros grupos de riesgo donde se tenga acceso al tratamiento y con alcances mayores en el tamaño de la muestra para optimizar la terapia de elección.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



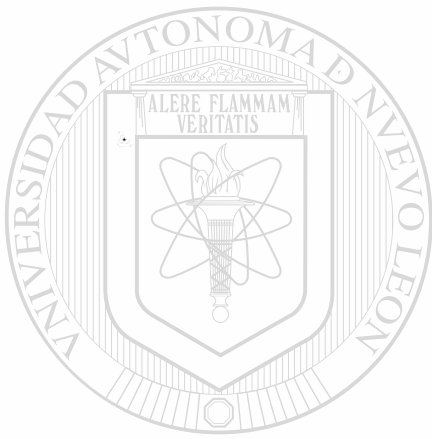
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES

- ✚ El grupo de estudio lo constituyeron 39 pacientes infectados con VIH que no habían recibido tratamiento antirretroviral previo.
 - ✚ En el análisis de los genes de la proteasa no se encontraron mutaciones asociadas con resistencia a los inhibidores de la enzima.
 - ✚ Se identificaron mutaciones secundarias en los genes de la proteasa que contribuyen a la resistencia cuando se asocian a otras mutaciones.
 - ✚ El análisis de los genes de la transcriptasa reversa reportó una variante con alta resistencia a los inhibidores nucleosídicos de la RT.
 - ✚ Se detectó una mutación asociada con baja resistencia a los inhibidores no nucleosídicos de la RT.
-
- ✚ La prevalencia de mutaciones asociadas con alta resistencia a los inhibidores nucleosídicos de la RT fue de 3%
 - ✚ La prevalencia de mutaciones asociadas con baja resistencia a los inhibidores no nucleosídicos de la RT fue de 3%
 - ✚ La frecuencia de mutaciones primarias del VIH en el grupo de estudio es baja, comparada con la reportada en estudios de poblaciones en que se tiene disponibilidad de la terapia antirretroviral y es semejante a la que se reporta en lugares donde no se tiene acceso al tratamiento.
 - ✚ Las secuencias de los genes de la proteasa y de la RT presentaron una similitud del 95 al 98% los del subtipo B del VIH-1, por lo que se

considera que lo virus que infectaron a las pacientes corresponden al subtipo B.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

BIBLIOGRAFÍA

1. <http://www.unaids.org/worldaidsday/2004>
2. Registro Nacional de Casos de SIDA. Datos al 15 de noviembre del 2004. Secretaría de Salud. <http://www.salud.gob.mx/conasida/>.
3. Coffin JM. Genetic diversity and evolution of retroviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 1992;176:143-64.
4. Coffin JM. HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science* 1995;267:483-9.
5. De Leys R, Vanderborcht B, Vanden Haesevelde M, Heyndrickx L, van Geel A, Wauters C, Bernaerts R, Saman E, Nijs P, Willems B, et al. Isolation and partial characterization of an unusual human immunodeficiency retrovirus from two persons of west-central African origin. *J Virol.* 1990 Mar;64(3):1207-16.
6. Chameau P, Borman AM, Quillent C, Guetard D, Chamaret S, Cohen J, Remy G, Montagnier L, Clavel F. Isolation and envelope sequence of a highly divergent HIV-1 isolate: definition of a new HIV-1 group. *Virology.* 1994 Nov 15;205(1):247-53
7. Korber B, Kuiken C, Foley B, Hahn B, McCutchan F, Mellors J, Sodroski J (eds.): *Human retroviruses and AIDS. The Oriental Biology and Biophysics, 1998 Group T-10.* Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM, EE.UU. 19983.
8. Rivera-Morales LG, Novitsky AV, Trujillo JR, Lavalle-Montalvo C, Cano- Dominguez C, Ramos-Jiménez J, Jiménez-Ríos E, Flores-Flores L, López-Guillén P, Gilbert P, Vannberg F, Tamez-Guerra R, Rodríguez-Padilla C, Essex Max. The Molecular Epidemiology of HIV Type 1 of Men in Mexico. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2001; 17:87-92.
9. Shafer RW, Stevenson D, Chan B. Human immunodeficiency virus reverse transcriptase and protease sequence database. *Nucleic Acids Res* 1999;.27: 348-352.
10. Schwartz SA, Nair MP. Current concepts in human immunodeficiency virus infection and AIDS. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999 May; 6(3):295-305.
11. Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for using antiretroviral agents among HIV-infected adults and adolescents. <http://www.aidsinfo.nih.gov/guidelines>. October 29, 2004.

12. Department of Health and Human Services. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-infected adults and adolescents. 2002. Available at: <http://www.aidsinfo.nih.gov/>. Accessed December 12, 2002.
13. Yeni PG, Hammer SM, Carpenter CC, Cooper DA, Fischl MA, Gatell JM, Gazzard BG, Hirsch MS, Jacobsen DM, Katzenstein DA, Montaner JS, Richman DD, Saag MS, Schechter M, Schooley RT, Thompson MA, Vella S, Volberding PA. Antiretroviral treatment for adult HIV infection in 2002: updated recommendations of the International AIDS Society-USA Panel. *JAMA*. 2002; 288:222-235.
14. Tobin N, Frenkel L. Human immunodeficiency virus drug susceptibility testing and resistance testing. *Pediatr Infect Dis J*. 2002;21:681-683.
15. Puig T, Perez-Olmeda M, Rubio A, Ruiz L, Briones C, Franco JM, Gomez-Cano M, Stuyver L, Zamora L, Alvarez C, Leal M, Clotet B, Soriano V. Prevalence of genotypic resistance to nucleoside analogues and protease inhibitors in Spain. The ERASE-2 Study Group. *AIDS*. 2000;14:727-732.
16. Grant RM, Hecht FM, Warmerdam M, Liu L, Liegler T, Petropoulos CJ, Hellmann NS, Chesney M, Busch MP, Kahn JO. Time trends in primary HIV-1 drug resistance among recently infected persons. *JAMA*. 2002; 288:181-188.
17. Hecht FM, Grant RM, Petropoulos CJ, Dillon B, Chesney MA, Tian H, Hellmann NS, Bandrapalli NI, Digilio L, Branson B, Kahn JO. Sexual transmission of an HIV-1 variant resistant to multiple reverse-transcriptase and protease inhibitors. *N Engl J Med*. 1998; 339:307-311.
18. Yerly S, Kaiser L, Race E, Bru JP, Clavel F, Perrin L. Transmission of antiretroviral-drug-resistant HIV-1 variants. *Lancet* 1999;354:729-33.
19. Frenkel LM, Wagner LE 2nd, Demeter LM, Dewhurst S, Coombs RW, Murante BL, Reichman RC. Effects of zidovudine use during pregnancy on resistance and vertical transmission of human immunodeficiency virus type 1. *Clin Infect Dis*. 1995; 20: 1321-1326.
20. Ribeiro RM, Bonhoeffer S. Production of resistant HIV mutants during antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(14):7681-6.
21. Miller V, White KL, Petropoulos CJ, Parkin NT. Decreased replication capacity of hiv-1 clinical isolates containing K65R or M184V RT mutations program and abstracts of the 10th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. February 10-14, 2003; Boston, Massachusetts. Abstract 616.

22. Mohri H, Singh MK, Ching WTW, et al. Quantitation of zidovudine-resistant human immunodeficiency virus type 1 in the blood of treated and untreated patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:25-29.12.
23. Najera I, Holguín A, Quiñones-Mateu E, et al. Pol gene quasispecies of human immunodeficiency virus: mutations associated with drug resistance in virus from patients undergoing no drug therapy. *J Virol* 1995; 69:23-31.
24. Arion D, Sluis-Cremer N, Parniak MA. Mechanism by which phosphonoformic acid resistance mutations restore 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) sensitivity to AZT-resistant HIV-1 reverse transcriptase. *J Biol Chem*. 2000; 275:9251-9255.
25. Havlir DV, Richman DD. Viral dynamics of HIV: implications for drug development and therapeutic strategies. *Ann Intern Med*. 1996;124:984-994.
26. Brown A J. Sequence variability in human immunodeficiency viruses: pattern and process in viral evolution. *AIDS* 1991; 5, S35-42.
27. Imamichi H, Crandall KA, Natarajan V, Jiang MK, Dewar RL, Berg S, Gaddam A, Bosche M, Metcalf JA, Davey RT Jr, Lane HC. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Quasi Species That Rebound after Discontinuation of Highly Active Antiretroviral Therapy Are Similar to the Viral Quasi Species Present before Initiation of Therapy. *J Infect Dis*. 2001; 183, 36-50.
28. Quinones-Mateu ME, Holguín A, Dopazo J, Najera I, Domingo E. Point mutant frequencies in the pol gene of human immunodeficiency virus type 1 are two- to threefold lower than those of env. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1996; 12, 1117-1128.
29. Daniel R, Kuritzkes, MD, Brian A. Boyle, MD, JD, Joel E. Gallant, MD, MPH, Kathleen E. Squires, MD, Andrew Zolopa. *Current Management Challenges in HIV: Antiretroviral Resistance* MD. *AIDS Read* 13(3):133-135, 138-142, 2003. © 2003 Cliggott Publishing, Division of SCP Communications.
30. Soriano Vázquez V, Rodríguez-Rosado R, Martínez-Echevarría R. Introducción de las pruebas de detección de resistencias a los antiretrovirales en la práctica clínica. *Rev Clin Esp* 1999; 199: 179-183.
31. Kessler H, Deeks S, Grant R. *Understanding assays: a guide to HIV resistance tests*. Rush-Presbyterian-St Luke's Medical Center. 2000. Available at: [http:// www.rush.edu/cme](http://www.rush.edu/cme). Accessed December 12, 2002.

32. Rodríguez-Rosado R, Briones C, Soriano V. Introduction of HIV drug resistance testing in clinical practice. *AIDS* 1999; 13: 1007-1014.
33. Condra JH. Resisting resistance. *Ann Intern Med* 1998; 128: 951-954.
34. Pomerantz RJ. Primary HIV-1 resistance. A new phase in the epidemic? *JAMA* 1999; 282: 1177-1179.
35. Huang H, Chopra R, Verdine GL, Harrison SC. Structure of a covalently trapped catalytic complex of HIV-1 reverse transcriptase: implications for drug resistance. *Science* 1998; 282:1669-1675.
36. Larder BA, Bloor S, Kemp SD, Hertogs K, Desmet RL, Miller V, Sturmer M, Staszewski S, Ren J, Stammers DK, Stuart DI, Pauwels R. A family of insertion mutations between codons 67 and 70 of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase confer multinucleoside analog resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:1961-7.
37. The "CATCH" study at the Second International AIDS Society Conference on HIV Pathogenesis and Treatment. July 13 - 16, 2003, Paris, France.
38. Arion D, Kaushik N, McCormick S, Borkow G, Parniak MA. Phenotypic mechanism of HIV-1 resistance to 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT): increased polymerization processivity and enhanced sensitivity to pyrophosphate of the mutant viral reverse transcriptase. *Biochemistry* 1998; 37:15908-15917.
39. Meyer PR, Matsuura SE, So AG, Scott WA. Unblocking of chain-terminated primer by HIV-1 reverse transcriptase through a nucleotide-dependent mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998; 95:13471-13476.
40. Meyer PR, Matsuura SE, Mian AM, So AG, Scott WA. A mechanism of AZT resistance: an increase in nucleotide-dependent primer unblocking by mutant HIV-1 reverse transcriptase. *Mol. Cell* 1999; 4:35-43.
41. Demeter LM and Haubrich R. Phenotypic and genotypic resistance assays: methodology, reliability, and interpretations. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr* 2001; 26[Suppl. 1]:S3-9.
42. Haubrich R and Demeter LM. Clinical utility of resistance testing: retrospective and prospective data supporting use and current recommendations. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr* 2001; 26[Suppl. 1]:S51-59.
43. Cohen CJ, Hunt S, Sension M, Farthing C, Conant M, Jacobson S, Nadler J, Verbiest W, Hertogs K, Ames M, Rinehart AR, Graham NM;

VIRA3001 Study Team. A randomized trial assessing the impact of phenotypic resistance testing on antiretroviral therapy. *AIDS* 2002; 16:579–588.

44. Tural C, Ruiz L, Holtzer C, Schapiro J, Viciano P, Gonzalez J, Domingo P, Boucher C, Rey-Joly C, Clotet B; Havana Study Group. Clinical utility of HIV-1 genotyping and expert advice: the Havana trial. *AIDS* 2002; 16:209–218.

45. Meynard J L, M.Vray L, Monard-Joubert S, Matheron G, Peytavin F, Clavel F, Brun-Vezinet and PM, Girard. 40th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Toronto, Canada, abstract 698, p. 294, 2000.

46. Melnick D J, Rosenthal M, Cameron M, Snyder S, Griffith-Howard K, Hertogs W, Verbiest N, Graham, and S.Pharm, Abstract 786, 7th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, San Francisco, Calif., 2000.

47. EuroGuidelines group for HIV Resistance. 2001. Clinical and laboratory guidelines for the use of HIV-1 drug resistance testing as part of treatment management: recommendations for the European setting. *AIDS* 15:309–320.

48. Hirsch MS, Brun-Vezinet F, D'Aquila RT, Hammer SM, Johnson VA, Kuritzkes DR, Loveday C, Mellors JW, Clotet B, Conway B, Demeter LM, Vella S, Jacobsen DM, Richman DD. Antiretroviral drug resistance testing in adult HIV-1 infection: recommendations of an International AIDS Society-USA Panel. *JAMA* . 2000; 283:2417–2426

49. Alcorn TM, Faruki H. HIV resistance testing: methods, utility and limitations. *Mol Diagn* 2000; 5: 159-168.

50. D'Aquila RT, Johnson VA, Welles SL, Japour AJ, Kuritzkes DR, DeGruttola V, et al. Zidovudine resistance and HIV-1 disease progression during antiretroviral therapy. AIDS Clinical Trials Group Protocol 116B/117 Team and the Virology Committee Resistance Working Group. *Ann Intern Med* 1995;122:401-8.

51. Zolopa AR, Shafer RW, Warford A, Montoya JG, Hsu P, Katzenstein D, et al. HIV-1 genotypic resistance patterns predict response to saquinavir-ritonavir therapy in patients in whom previous protease inhibitor therapy had failed. *Ann Intern Med* 1999;131:813-21.

52. Boden D, Hurley A, Zhang L, Cao Y, Guo Y, Jones E, Tsay J, Ip J, Farthing C, Limoli K, Parkin N, Markowitz M. HIV-1 drug resistance in newly infected individuals. *JAMA* 1999;282:1135-41.

53. UK Collaborative Group on Monitoring the Transmission of HIV Drug Resistance Analysis of prevalence of HIV-1 drug resistance in

primary infections in the United Kingdom *BMJ*, May 2001; 322: 1087 - 1088.

54. Quinn TC, Wawer MJ, Sewankambo N, Serwadda D, Li C, Wabwire-Mangen F, et al. Viral load and heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. Rakai Project Study Group [see comments]. *N Engl J Med* 2000;342:921-9.
55. Duwe S, Brunn M, Altmann D, Hamouda O, Schmidt B, Walter H, Pauli G, Kucherer C. Frequency of genotypic and phenotypic drug-resistant HIV-1 among therapy-naive patients of the German Seroconverter Study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2001; 26:266-273. 46.
56. Brionas, Carlos; Perez-Olmeda, Mayte; Rodriguez, Carmen; del Romero, Jorge; Hartogs, Kurt ; Soriano, Vincent. Primary Genotypic and Phenotypic HIV-1 Drug Resistance in Recent Seroconverters in Madrid. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* . 2001; 26(2):145-150.
57. Harzic M, Pellegrin I, Deveau C, Chaix ML, Dubeaux B, Garrigue I, Ngo N, Rouzioux C, Goujard C, Hoen B, Sereni D, Delfraissy JF, Meyer L. Genotypic drug resistance during HIV-1 primary infection in France (1996-1999): frequency and response to treatment. *AIDS* 2002;16(5):793-6.
58. Little SJ, Holte S, Routy JP, Daar ES, Markowitz M, Collier AC, Koup RA, Mellors JW, Connick E, Conway B, Kilby M, Wang L, Whitcomb JM, Hellmann NS, Richman DD. Antiretroviral-Drug Resistance among Patients Recently Infected with HIV. *N Engl J Med* 2002; 347:385-394. Antiretroviral-Drug Resistance among Patients Recently Infected with HIV. *N Engl J Med* 2002; 347:385-394.
59. Ross L, Lim M, Liao Q, et al. Prevalence of antiretroviral drug resistance and resistance mutations in antiretroviral therapy (ART) naive HIV infected individuals from 44 US cities during 2003. Program and abstracts of the 44th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy; October 30-November 2, 2004, Washington, DC. Abstract H-173.
60. Weinstock HS, Zaidi I, Heneine W, Bennett D, Garcia-Lerma JG, Douglas JM, LaLota M, Dickinson G, Schwarcz S, Torian L, Wendell D, Paul S, Goza GA, Ruiz J , Boyett B, Kaplan JE. The epidemiology of antiretroviral drug resistance among drug-naive HIV-1-infected persons in 10 US cities. *J Infect Dis* 2004;189(12): 2174-80.
61. Daniel R. Kuritzkes, MD, Brian A. Boyle, MD, JD, Joel E. Gallant, MD, MPH, Kathleen E. Squires, MD, Andrew Zolopa, MD. Current Management Challenges in HIV: Antiretroviral Resistance. *AIDS Read* 2003 13(3):133-135, 138-142)

62. Susan J Little, Is transmitted drug resistance in HIV on the rise? *BMJ* 2001;322;1074-1075

63. Havlir DV, Hellmann NS, Petropoulos CJ, et al. Drug susceptibility in HIV infection after viral rebound in patients receiving indinavir-containing regimens. *JAMA*. 2000;283:229-234.

64. Sambrook J, Russel W.D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press USA. 83.

65. http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi

66. Rhee SY, Gonzales MJ, Kantor R, Betts BJ, Ravela J, Shafer RW. Human immunodeficiency virus reverse transcriptase and protease sequence database. *Nucleic Acids Res*. 2003; Jan 1;31(1):298-303.

67. http://hivdb6.stanford.edu/asi/deployed/hiv_central.pl?program=hivdb.

68. Hertogs K, Bloor S, Kemp SD, Van den Eynde C, Alcorn TM, Pauwels R, Van Houtte M, Staszewski S, Miller V, Larder BA. Phenotypic and genotypic analysis of clinical HIV-1 isolates reveals extensive protease inhibitor cross-resistance: a survey of over 6000 samples. *AIDS* 2000; Vol. 14, 1203-10.

69. Wu TD, Schiffer CA, Gonzales MJ, Taylor J, Kantor R, Chou S, Israelski D, Zolopa AR, Fessel WJ, Shafer RW. Mutation patterns and structural correlates in human immunodeficiency virus type 1 protease following different protease inhibitor treatments. *J Virol*. 2003; Vol. 77, 4836-47.

70. Perez EE, Rose SL, Peyser B, Lamers SL, Burkhardt B, Dunn BM, Hutson AD, Sleasman JW, Goodenow MM. Human immunodeficiency virus type 1 protease genotype predicts immune and viral responses to combination therapy with protease inhibitors (PIs) in PI-naive patients. *J Infect Dis*. 2001;Vol. 183, 579-88.

71. Alexander CS, Dong W, Chan K, Jahnke N, O'Shaughnessy MV, Mo T, Piaseczny MA, Montaner JS, Harrigan PR. HIV protease and reverse transcriptase variation and therapy outcome in antiretroviral-naive individuals from a large North American cohort. *AIDS*. 2001;Vol. 15, 601-7.

72. McCallister S, Kohlbrenner V, Squires K, Lazzarin A, Kumar P, DeJesus E, Nadler J, Gallant J, Walmsley S, Yeni P, Leith J, Dohnanyi C, Hall D, Sabo J, MacGregor T, Verbiest W, McKenna P, Mayers D. Characterization of the impact of genotype, phenotype,

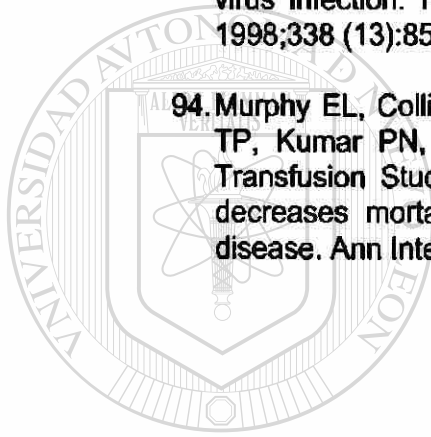
and inhibitory quotient on antiviral activity of tipranavir in highly treatment-experienced patients. *Antiviral Therapy*. 2003;Vol. 8, S15.

73. Kozal MJ, Shah N, Shen N, Yang R, Fucini R, Merigan TC, Richman DD, Morris D, Hubbell E, Chee M, Gingeras TR.. Extensive polymorphisms observed in HIV-1 clade B protease gene using high-density oligonucleotide arrays. *Nat Med*. 1996 Jul;2(7):753-9.
74. Birk M, Sonnerborg A. Variations in HIV-1 pol gene associated with reduced sensitivity to antiretroviral drugs in treatment-naive patients. *AIDS*. 1998 Dec 24;12 (18):2369-75.
75. Whitcomb JM, Parkin NT, Chappey C, Hellmann NS, Petropoulos CJ. Broad nucleoside reverse-transcriptase inhibitor cross-resistance in human immunodeficiency virus type 1 clinical isolates. *J Infect Dis*. 2003; Vol. 188, 992-1000.
76. Boucher CA, Cammack N, Schipper P, Schuurman R, Rouse P, Wainberg MA, Cameron JM. High-level resistance to (-) enantiomeric 2,-deoxy-3,-thiacytidine in vitro is due to one amino acid substitution in the catalytic site of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Antimicrob. Agents Chemother*. 1993; Vol. 37, 2231-2234.
77. Parkin N, Chappey C, Petropoulos C, Hellmann N. HIV-1 reverse transcriptase mutations that suppress zidovudine resistance also increase in vitro susceptibility to tenofovir, but not stavudine. *Antiviral Therapy*. 2003;Vol. 8, S34.
78. Keulen W, Boucher C, Berkhout B. Nucleotide substitution patterns can predict the requirements for drug-resistance of HIV-1 proteins. *Antiviral Res*. 1996;Vol. 31, 45-57.
79. Mark Wainberg, Conference Report Primary HIV Resistance, Antiretroviral Therapy Regimens, and the M184V Mutation: ighlights of the XIII Drug Resistance Workshop – A Canadian Perspectiva June 8-12, 2004; Tenerife Sur – Costa Adeje, Canary Islands, Spain Posted 07/28/2004.
80. Miller MD, Anton KE, Mulato AS, et al. Human immunodeficiency virus type 1 expressing the lamivudine-associated M184V mutation in reverse transcriptase shows increased susceptibility to adefovir and decreased replication capability in vitro. *J Infect Dis*. 1999;179:92–100.
81. Little SJ, Daar ES, Holte S, et al. Persistence of transmitted drug resistance among subjects with primary HIV infection not receiving antiretroviral therapy. Presented at the 9th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Seattle, February 24–28, 2002.

82. Young SD, Britcher SF, Tran LO, Payne LS, Lumma WC, Lyle TA, Huff JR, Anderson PS, Olsen DB, Carroll SS, et al. L-743, 726 (DMP-266): a novel, highly potent nonnucleoside inhibitor of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995; Vol. 39, 2602-5.
83. Perno CF, Cozzi-Lepri A, Balotta C, Forbici F, Violin M, Bertoli A, Facchi G, Pezzotti P, Angarano G, Arici C, Narciso P, Orani A, Rause E, Scalzini A, Poggio A, Ippolito G, Moroni M, Monforte AD. Impact of mutations conferring reduced susceptibility to lamivudine on the response to antiretroviral therapy. *Antivir Ther.* 2001; Vol. 6, 195-8.
84. Rhee SY, Gonzales MJ, Kantor R, Betts BJ, Ravela J, Shafer RW. Human immunodeficiency virus reverse transcriptase and protease sequence database. *Nucleic Acids Res.* 2003; Vol. 31, 298-303.
85. McClemon D, Danehower S, Thompson M, Fischl M, H essenthaler S, St. Clair M, Hernandez J. Low Prevalence of Key Resistance Mutations in Under-Represented and Incarcerated, Antiretroviral Therapy Naive, HIV-1 Infected Adults in North America. The 1st. IAS Conference on HIV Pathogenesis and Treatment 2001 Buenos Aires 2001.
86. Z. Grossman, M. Lorber, S. Maayan, N. Bar-Yacov, I. Levy, D. Averbuch, V. Istomin, M. Chowers, Z. Sthoeger, D. Ram, H. Rudich, F. Mileguir, R. Pavel, R. Almaliach, F. Schlaeffer, Z. Kra-Oz, E. Mendelson, J. M. Schapiro, and K. Riesenber. Drug-Resistant HIV Infection among Drug-Naive Patients in Israel. *HIV/AIDS • CID* 2005;40: 294-302.

87. Holodniy M, Charlebois ED, Bangsberg DR, Zolopa AR, Schulte M, Moss AR. Prevalence of antiretroviral drug resistance in the HIV-1-infected urban indigent population in San Francisco: a representative study. *Int J STD AIDS.* 2004 Aug;15(8):543-51.
88. Ribeiro RM, Bonhoeffer S, Nowak MA: The frequency of resistant mutant virus before antiviral therapy. *AIDS* 1998, 12:461-465.
89. Traub MA, Leriche-Guerin K, Regis C, Bordes I, Cotte L, Detmer J, Kolberg J, Ritter J, Trepo C. Prevalence of primary resistance to zidovudine and lamivudine in drug-naive human immunodeficiency virus type-1 infected patients: high proportion of reverse transcriptase codon 215 mutant in circulating lymphocytes and free virus. *J Med Virol.* 2000 Jul;61(3):352-9.
90. Stanley A. Schwartz* and Madhavan P. N. Nair Current Concepts in Human Immunodeficiency Virus Infection and AIDS. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, May 1999 6 (3): 295-305.

91. Cheryl A. Stoddart, Teri J. Liegler, Fabrizio Mammano, Valerie D. Linnquist-Stepps, Matthew S. Hayden, Steven G. Deeks, Robert M. Grant, François Clavel & Joseph M. McCune. Impaired replication of protease inhibitor-resistant HIV-1 in human thymus. *Nature Medicine* June 2001 Volume 7 Number 6pp 712 – 718.
92. Thomas C. Stoeckli, Samantha MaWhinney, Jonathan Uy, Chengying Duan, Jing Lu, David Shugarts, and Daniel R. Kuritzkes. Phenotypic and Genotypic Analysis of Biologically Cloned Human Immunodeficiency Virus Type 1 Isolates from Patients Treated with Zidovudine and Lamivudine. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002 December; 46(12): 4000–4003.
93. Palella FJ Jr, Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA, Aschman DJ, Holmberg SD. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med.* 1998;338 (13):853-60.
94. Murphy EL, Collier AC, Kalish LA, Assmann SF, Para MF, Flanigan TP, Kumar PN, Mintz L, Wallach FR, Nemo GJ. Viral Activation Transfusion Study Investigators. Highly active antiretroviral therapy decreases mortality and morbidity in patients with advanced HIV disease. *Ann Intern Med* 2001; 135:17-26.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Olivia M. Valle Bahena

Candidato para obtener el grado de Doctor en Ciencias con Especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética.

Tesis:

Frecuencia de mutaciones del VIH que confieren resistencia a los antirretrovirales en pacientes del Hospital Universitario UANL que no han recibido tratamiento previo.

Campo de estudio: Biología Molecular

Biografía

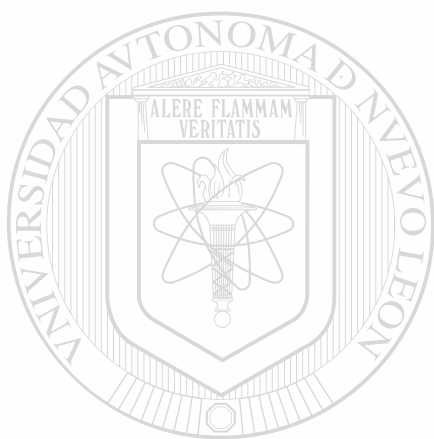
Lugar y fecha de nacimiento: San Nicolás Estado de México, 14 de marzo de 1945.

Padres: Antonio Valle Flores, Isaías Bahena Torrecilla

Educación:

Egresada de la Universidad Autónoma del Estado de México, con el grado de Médico Cirujano Partero.

Egresada del CINVESTAV IPN con el grado de Maestro en Ciencias con especialidad en Bioquímica.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



