



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

FRECUENCIA DE MUTACIONES DE RESISTENCIA TRANSMITIDA A
INHIBIDORES DE INTEGRASA EN VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA
HUMANA (VIH) CIRCULANTE EN POBLACIÓN MEXICANA

TESIS

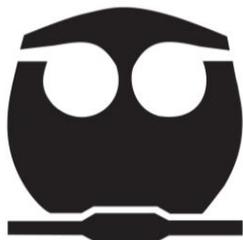
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

THALIA ALEJANDRA GARCÍA TÉLLEZ

MÉXICO, D.F.

2012





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: Francisco Javier Plasencia de la Parra**

VOCAL: **Profesor: Enrique Ortega Soto**

SECRETARIO: **Profesor: Santiago Ávila Ríos**

1er. SUPLENTE: **Profesora: Martha Patricia Coello Coutiño**

2° SUPLENTE: **Profesora: Rocío Gabriela Tirado Mendoza**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS (CIENI), INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS (INER)

ASESOR DEL TEMA:

DR. SANTIAGO ÁVILA RÍOS

(nombre y firma)

SUSTENTANTE:

THALÍA ALEJANDRA GARCÍA TÉLLEZ

(nombre (s) y firma (s))

A quienes aman con la misma intensidad con la que sueñan

A quienes despiertan para amar la vida

A quienes viven para amar el mundo

TAGT

AGRADECIMIENTOS

“La gratitud es una virtud de aquel ser humano que no busca darle valor a sus palabras, si no valorar las acciones de sus semejantes”

Nací en una familia absolutamente unida, llena de valores, de amor, de comprensión y apoyo. GRACIAS porque cada día de mi vida ha valido la pena por verlos sonreír por la mañana y escucharlos al dormir. Gracias por ser el motor, la base, la fuerza y el empuje que cada día me alentaba a trabajar para orgullo de ustedes y satisfacción de mi misma. Gracias a Salvador García y Sonia Téllez que un día soñaron con una familia de la que me hicieron parte y de la que me siento absolutamente orgullosa de pertenecer. Gracias a Tamara García quien nunca ha renunciado a decir “te quiero” sin importar si los tiempos son buenos o no, por confiar en mi y acompañarme en todo sentido. Gracias a mis ti@s y prim@s que han sido ejemplo de tenacidad y perseverancia, y quienes me enseñaron a no perder la sonrisa a pesar de las adversidades porque hay una familia solida que nos respalda.

Irma Oliva y Ariadne Lopez Gracida, ejemplos de mujeres profesionistas que me enseñaron el mundo de la ciencia y me enseñaron las virtudes que conlleva y el compromiso que representa ser Química Farmacéutica-Bióloga. GRACIAS

Gabriela Anaya y Diana Toscano que compartieron los momentos más difíciles de una amiga para convertirlos en los más maravillosos de una hermana. GRACIAS porque a pesar de los años sigo en sus pensamientos y podemos compartir satisfacciones y fracasos, sin olvidar la sonrisa y el abrazo reconfortante que aprendieron a darme.

GRACIAS a quienes se convirtieron en mi familia durante los tres años mas divertidos de mi vida. A quienes como esposo, hijos y herman@s me hicieron sentir importante, me permitieron apoyarlos y me demostraron que para amar a una persona, únicamente hace falta querer hacerlo. Francisco Reyes, Mariano Bucio, Carlos Loyo, Pedro Muñoz, Sandra Domínguez, Angel Martínez, Andrea López, Karina Zaldivar y Azucena Montaña, gracias por ser VP!

Cinco años han pasado desde el día que llegue a mi añorada UNAM, los mismos que he podido compartir con personas tan distintas a mi pero con sueños y emociones similares. GRACIAS a quienes más allá de formar una “Banda” formaron una familia, con sus malos ratos, pero con sus enormes alegrías. GRACIAS a quienes confiaron en mi, a quienes lograron conocerme y se alegraron de mis triunfos sin abandonarme en mis fracasos.

Gracias por “estar” Gabriela Piña y Ximena Flores, por ser solidarias, comprensivas y enérgicas cuando fue necesario; gracias por apoyarme en mis malas decisiones con la finalidad de que aprendiera la lección por mi misma, e indiscutiblemente gracias por las palabras exactas en el momento preciso. GRACIAS Diego Zarate por ser auténticamente mi hermano, por tomarme de la mano en cada paso que daba y hacerme ver de forma objetiva mis aciertos y errores, por compartir no solo tu tiempo, sino uno de tus tesoros: tu familia. GRACIAS Andrés Canales por ser no solo un ejemplo de persona, sino un ejemplo de profesionalista; por luchar incansablemente hasta lograr lo que un día soñaste demostrándome que todo es posible si se pone el corazón en ello. Eduardo Almazán, no se si haga falta recordar lo vertiginoso de nuestra amistad, pero estoy convencida de que vale la pena agradecer que a pesar de todo sigues a mi lado, apoyándome y escuchándome, sacando el lado positivo de las cosas y haciéndome entender la vida con simplicidad.

GRACIAS a quienes sin importar el tiempo de conocerme, en su momento fueron piezas clave en mis decisiones y/o responsables de muchas sonrisas: Alejandro Martínez, Marco Parra, Alejandro Aparicio. Lau, Yair, Mau, Iván N., Julio, Xavier, Batas, Richard, Thalía (y su tween), Efraín, Zak, Charly, Mariana, Karen y Zague.

La motivación y la confianza son claves en el éxito. Si de alguien recibí ambas cosas fue de Iván Patiño. GRACIAS por hacer de cada día una aventura, por las mejores lecciones que humanamente he tenido y por ayudarme a entender hasta donde soy capaz de llegar. Gracias por compartir tus pasiones, tus anhelos, tu familia, tu tiempo y dedicación. Por confiar en mi y enseñarme que disfrutar la vida es cuestión de poner pasión en lo que uno hace, amar lo que uno tiene, y no preocuparse sino disfrutar lo que llega.

“Para pertenecer hay que conocer”. Hay numerosas personas detrás del esfuerzo que representa formar profesionistas y dentro de ellas, el Dr. Eduardo Bárzana, el Dr. Jorge Vázquez, el QFB Raúl Garza, la Q Hortensia Santiago, el Lic. Carlos Figueroa, la Dra. Patricia Coello y los miembros del H. Consejo Técnico fueron artífices de la maravillosa lección que me llevo y de una de las experiencias más enriquecedoras que he tenido. GRACIAS por imprimirle pasión a su trabajo, por dedicarse a su función y por compartir conmigo no solo su amistad y su apoyo, si no cada una de las experiencias que engrandecen su quehacer profesional.

Quiero agradecer a quienes llegaron a mi vida en momentos difíciles y permanecen en ella sacándome una sonrisa genuina con una facilidad increíble. GRACIAS Adolfo por ayudarme a entender que las cosas no tienen una razón, si no un motivo y que hacer que valgan la pena depende de qué tanto estemos dispuestos a aprender. GRACIAS Gio, Jhonatan y Neri por enseñarme que no

importa cuantas veces sea necesario hacerlo, siempre se puede volver a empezar; gracias por estar a mi lado a partir de hoy y para siempre

Indudablemente el paso que hoy doy no habría sido posible sin la confianza del Dr. Santiago Ávila y el apoyo del Dr. Gustavo Reyes y su equipo. Gracias a Zeidy y el equipo administrativo por su constante apoyo, a Gonzalo Salgado, Perla del Río y sus alumnos por el respaldo continuo y sobre todo GRACIAS a quienes poco a poco me hicieron parte de la gran familia que representa el CIENI: Maribel, Claudia, Dany T, Lety, Ana, Amaranta, Humberto, Dany G y Vero.

GRACIAS a cada uno de los pacientes del CIENI que, quizá sin saberlo, son en parte responsables de este logro. Gracias por darnos una lección de vida y demostrarnos que vivir con VIH y vivir sin el tienen algo en común: VIVIR.

Cada una de las personas que he mencionado y recordado en estas líneas, han hecho de mi vida una maravillosa experiencia, y estoy convencida de que llegaron en el momento justo. Son parte del plan que DIOS tenía para mi y que aun con sus dificultades me ha dejado incalculables momentos gratificantes. A El le agradezco la oportunidad que me da día a día de disfrutar lo que tengo a mí alrededor y de experimentar hasta aprender.

Finalmente, GRACIAS a mi adorada UNAM por la oportunidad de ser su estudiante, el orgullo de ser su egresada y la fortuna de ser de sangre azul y piel dorada.

¡GRACIAS!

Este proyecto recibió financiamiento del gobierno mexicano (Comisión de Equidad y Género de la H. Cámara de Diputados), Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICyTDF, PIRIVE09-18) y Fundación México Vivo

INDICE

0. RESUMEN	10
1. INTRODUCCIÓN.....	12
1.1 EPIDEMIOLOGÍA DE LA INFECCIÓN POR VIH y SIDA	12
1.1.2 PANORAMA MUNDIAL DE LA INFECCIÓN POR VIH	13
1.2 GENERALIDADES DEL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA.....	19
1.3. TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL (TAR).....	35
1.4 RESISTENCIA FARMACOLÓGICA A ANTIRRETROVIRALES.....	41
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	52
3. HIPÓTESIS	54
4. OBJETIVOS	55
<i>General</i>	55
<i>Particulares</i>	55
5. TÉCNICA	56
5.1 SELECCIÓN DE PACIENTES	56
5.2 EXTRACCIÓN DE ARN	56
5.3 AMPLIFICACIÓN.....	57
5.4 ELECTROFORESIS Y PURIFICACIÓN.....	58
5.5 SECUENCIACIÓN.....	59
5.6 SUBTIPIFICACIÓN.....	60
5.7 ANÁLISIS DE MUTACIONES DE RESISTENCIA.....	61
5.8 PREDICCIÓN DE RESISTENCIA FENOTÍPICA.....	61
5.9 ANÁLISIS FILOGENÉTICO	62
5.10 ANÁLISIS DE PRESIÓN SELECTIVA POR MODELO DE CODONES.....	62
5.11 ANALISIS DE PRESIÓN SELECTIVA MEDIADA POR HLA.....	63
6. RESULTADOS	64
6.1 CARACTERÍSTICAS DE LA COHORTE	64
6.2 ANÁLISIS DE VARIABILIDAD EN IN.....	65
6.3 ANÁLISIS DE RESISTENCIA A INHIBIDORES DE INTEGRASA EN VIH CIRCULANTE EN MÉXICO	70
6.4 ANÁLISIS FILOGENÉTICO	75
6.5 ANÁLISIS DE PRESIÓN SELECTIVA POR MODELO DE CODONES.....	81
6.6 ANALISIS DE PRESIÓN SELECTIVA MEDIADA POR HLA.....	81
7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	84
7.1 CARACTERÍSTICAS DE LA COHORTE	84
7.2 VARIABILIDAD DE LA ENZIMA INTEGRASA EN MÉXICO	85
7.3 RESISTENCIA A INHIBIDORES DE INTEGRASA	88
7.4 ANÁLISIS DE PRESIÓN SELECTIVA	92
8. CONCLUSIONES.....	95
9. PERSPECTIVAS.....	96
10. BIBLIOGRAFÍA.....	97

ABREVIATURAS Y SIGLAS

3TC: Lamivudina.

ABC: Abacavir.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ARN: Ácido ribonucleico.

ARNt: Ácido ribonucleico de transferencia.

ARVs: Antirretrovirales.

AZT: Azidotimidina (También llamada ZDV)

CA: Cápside o p24.

CCD: Dominio catalítico.

CENSIDA: Centro Nacional para la prevención y control del SIDA.

CIENI: Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas.

CTD: Dominio C-terminal.

CV: Carga viral.

d4T: Estavudina.

ddC: Zalcitabina.

ddl: Didanosina.

ddNTP: Dideoxynucleótido.

dNTP: Deoxynucleótido.

EFV: Efavirenz.

EVG: Elvitegravir.

FTC: Emtricitabina

HLA: Antígeno Leucocitario Humano.

IN: Integrasa.

INBIs: Inhibidores de unión a Integrasa.

INER: Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

INSTI: Inhibidores de transferencia de hebra.

LEDGF: Factor de crecimiento celular derivado del epitelio (Cellular lens epithelium-derived growth factor, inglés).

LTR: Repeticiones terminales largas (Long Terminal Repeats, inglés)

MA: Matriz o p17.

MHC: Complejo Mayor de Histocompatibilidad.

NC: Nucleocápside o p7.

NNRTI: Inhibidores de Transcriptasa Reversa no análogos de nucleósidos.

NRTI: Inhibidores de Transcriptasa Reversa análogos de nucleósidos.

NTD: Dominio N-terminal.

NVP: Nevirapina.

ONU: Organización de las Naciones Unidas.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PI: Inhibidor de proteasa.

PIC: Complejo de pre integración o preintegrativo.

PR: Proteasa.

RAL: Raltegravir.

RT: Transcriptasa Reversa.

SIDA: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida.

SS: Stanford Score.

TAMs: Mutaciones análogas de timidina.

TAR: Tratamiento antirretroviral.

TARAA: Tratamiento antirretroviral altamente activo.

TDF: Tenofovir.

TDR: Resistencia transmitida (Transmitted Drug Resistance, inglés)

VIH: Virus de Inmunodeficiencia Humana.

ZDV: Zidovudina

RESUMEN

Antecedentes: La incorporación de nuevos antirretrovirales (ARV), como los inhibidores de Integrasa que bloquean la transferencia de hebra (InSTIs), a los esquemas de tratamiento antirretroviral (TAR) ha hecho que sea relevante el estudio de la resistencia transmitida (TDR) a estos fármacos en poblaciones vírgenes a TAR. La prevalencia de TDR a estos ARV en la mayoría de las poblaciones vírgenes a TAR se ha estimado en menos del 2%. Sin embargo, la prevalencia de TDR a InSTIs y su tendencia en México se desconocen.

Métodos: La resistencia a InSTIs fue evaluada en una cohorte de 100 pacientes mexicanos infectados con VIH subtipo B, vírgenes a TAR de 12 estados. Un fragmento del gen *pol*, incluyendo a Integrasa (IN) completa, se amplificó a través de una PCR anidada. Los productos de PCR fueron secuenciados utilizando 8 primers y se ensamblaron con Geneious 5.3.4. La resistencia se evaluó mediante el algoritmo de la Base de Datos de Resistencia de la Universidad de Stanford. Se construyeron árboles filogenéticos basados en el método de Máxima verosimilitud para tratar de explicar la TDR a través de agrupamientos con MEGA 5.0. El posible papel de HLA en la selección de mutaciones de TDR a InSTIs se evaluó a través de mapas de epítomos de linfocitos T citotóxicos usando la base de datos de VIH e Inmunología de Los Alamos. Por otra parte, los sitios de IN bajo selección positiva se determinaron mediante el programa DataMonkey, disponible en línea.

Resultados: Se observó una frecuencia de TDR a Raltegravir (RAL) de 5% y de 6% para Elvitegravir (EVG), con un puntaje de Stanford >15 (al menos bajo nivel de resistencia). Sólo se observó una mutación común asociada a resistencia de alto nivel, Q148R. Se registraron variantes poco comunes en los sitios asociados con la resistencia a INSTIs, N155S y E92V que confieren resistencia de nivel intermedio. Dos virus relacionados filogenéticamente fueron portadores de la mutación E138K y un virus presentó el cambio R263K. Se ubicaron seis sitios bajo presión positiva que no coincidieron con posiciones asociadas a resistencia.

Únicamente para el virus portador del cambio E92V se identificó superposición entre los epítomos reconocidos por HLA y la posición de mutación. Dos polimorfismos altamente conservados (V201I y L101I) se observaron en el dominio catalítico de la enzima, pero ninguno de ellos se ha asociado con disminución de la susceptibilidad a InSTIs.

Conclusiones: Se estimó una prevalencia mayor de resistencia transmitida a InSTIs en población mexicana en comparación con la reportada en otras cohortes. Se observaron posibles grupos de transmisión de resistencia a InSTIs. La asociación de HLA y la aparición de mutaciones de resistencia no fué contundente, pero no debe descartarse. Otros estudios sobre la transmisión de resistencia a InSTIs se requieren para confirmar las tendencias mostradas en el presente estudio.

FRECUENCIA DE MUTACIONES DE RESISTENCIA TRANSMITIDA A INHIBIDORES DE INTEGRASA EN VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH) CIRCULANTE EN POBLACIÓN MEXICANA

1. INTRODUCCIÓN

1.1 EPIDEMIOLOGÍA DE LA INFECCIÓN POR VIH y SIDA

1.1.1 ORIGEN DE LA PANDEMIA

En 1981 una serie de casos inusuales de inmunosupresión preocupó al personal de salud estadounidense. Los pacientes mostraban una marcada disminución de Linfocitos T CD4+, adenopatía e infecciones oportunistas, principalmente neumonía asociada al hongo *Pneumocystis jiroveci*. Llamó la atención que todos los casos documentados, hasta ese momento, fueran hombres homosexuales. Poco después empezaron a presentarse casos en pacientes hemofílicos, personas con historial de transfusiones, y parejas de éstos; por ello se sospechó que la enfermedad naciente era transmisible por dos vías principales: sanguínea y sexual.

Entre 1981 y 1983 se propusieron numerosos agentes que pudieran ser responsables del cuadro clínico que se presentaba en los pacientes, el cual fue denominado Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA).

En el año de 1983 el grupo del investigador Luc Montaigner (Instituto Pasteur, Francia) detectó en sobrenadantes de pacientes con inmunodeficiencia restos de la enzima transcriptasa inversa, lo que hizo suponer una etiología viral para el SIDA. Posteriores investigaciones lo llevaron al descubrimiento de un virus al que denominó Virus Asociado a Linfadenopatía (LAV, por sus siglas en inglés). Por su parte el doctor Robert Gallo del NIH (National Institutes of Health) en Bethesda, USA, aisló un retrovirus de pacientes con SIDA que fue bautizado como virus de leucemia de células T humanas tipo III (HTLV-III). Mientras que Levy y colaboradores aislaron un microorganismo al que denominaron retrovirus asociado a SIDA. Dada la similitud genética de todos los aislamientos, se determinó que se

trataba del mismo virus que fue ubicado dentro de los *Lentivirus* y adquirió el nombre de Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH).

Para finales de 1983 los pacientes no estaban confinados a una sola región de la Unión Americana, existían casos en más de 15 estados y pronto se sumaron reportes de Europa. Al término del año siguiente eran ya doce mil casos reportados a nivel mundial, lo que suponía una epidemia peligrosa y de atención urgente [2].

En 1986 surge un virus estrechamente relacionado con el VIH, sin embargo fue encontrado únicamente en pacientes africanos y presentaba una progresión clínica mucho más lenta, se le denominó VIH-2.

1.1.2 PANORAMA MUNDIAL DE LA INFECCIÓN POR VIH

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, “El SIDA es la más compleja, mutante y probablemente, más devastadora enfermedad infecciosa que jamás haya visto la humanidad” y es que desde su descubrimiento en 1981 el Virus de Inmunodeficiencia Humana ha cobrado la vida de miles de personas alrededor del mundo, y se ha posicionado como una de las pandemias más importantes de la historia.

Durante muchos años, la cifra de individuos infectados con este virus creció de forma alarmante, lo que obligó a los gobiernos y organizaciones de salud a redoblar esfuerzos para controlar la inminente pandemia. Entre las medidas que desde entonces se han implementado, destaca el incremento y mejora de la infraestructura y atención hospitalaria y la realización de campañas intensivas de educación sexual dirigidas a la población de riesgo (jóvenes de 15 a 24 años), ambas acciones han permitido observar una reducción en el número de infecciones por año. Aunado a esto, la optimización del Tratamiento Antirretroviral (TAR) cuya finalidad es ampliar la cobertura y mejorar la calidad de vida de los pacientes que lo reciben ha impactado en la disminución del conteo de decesos

asociados a SIDA (**Figura 1.1**), reduciéndolos de 2.2 millones reportados a mediados de los años 2000 a 1.8 millones en 2010 [3].

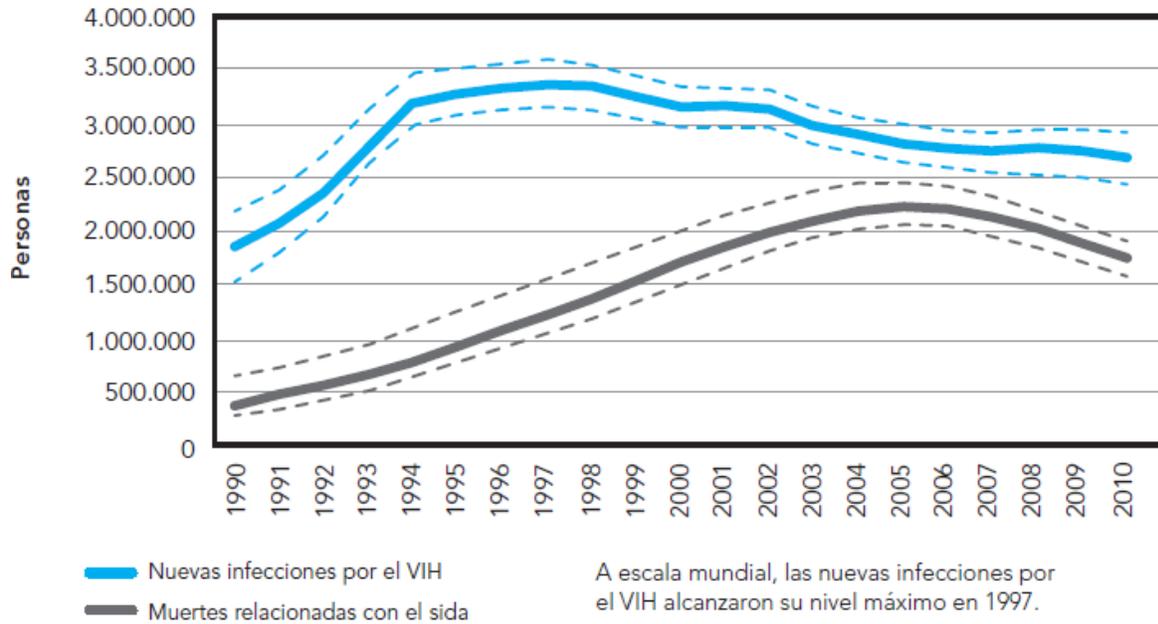


Figura 1.1 Tendencia mundial de nuevas infecciones de 1990 a 2010. Tomada de [3].

A pesar de la reducción en la prevalencia de esta infección, la cantidad de personas que viven con VIH alrededor del mundo es preocupante. Se estima que poco más de 34 millones (31.6 – 35.2 millones) de habitantes portan el virus, 2.7 millones de ellos infectados únicamente en 2010 y 68% pertenecientes al continente Africano, donde se encuentra la región de más alta prevalencia mundial, África sub-Sahariana (**Figura 1.2**).

Las mujeres y niñas siguen representando cerca del 50% de las infecciones por VIH, lo que aumenta el riesgo de transmisión madre-hijo. Las prácticas sexuales sin protección y el uso de drogas inyectables son los dos factores que han jugado un papel preponderante en la diseminación de la enfermedad hasta nuestros días [1].

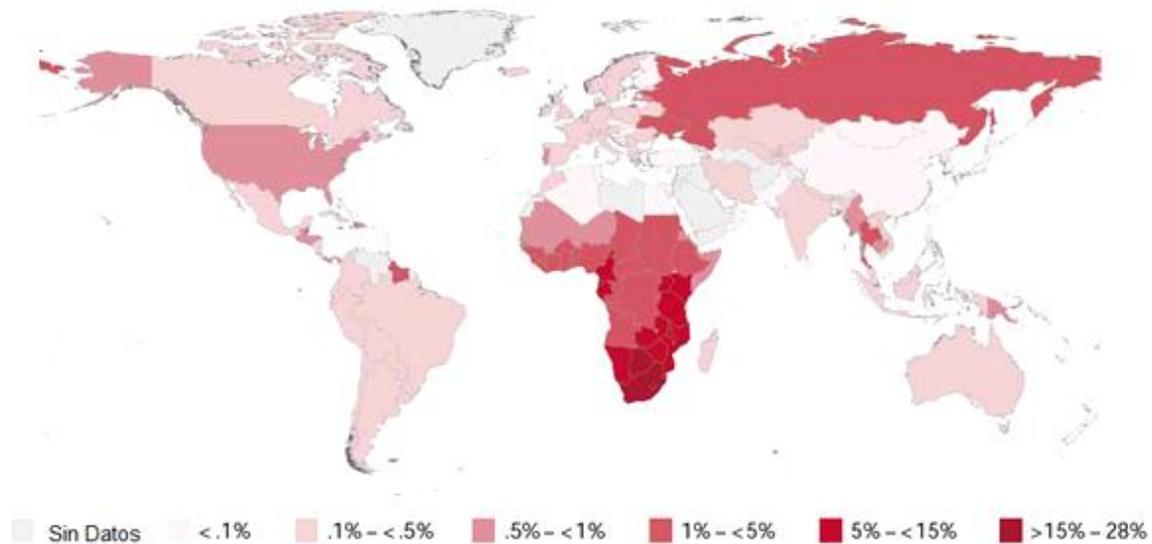


Figura 1.2 Distribución mundial de infección por VIH. Se muestra la proporción de la población total de cada país que ha adquirido la infección. África sub-Sahariana es la región geográfica con mayor prevalencia, específicamente Sudáfrica registra el mayor número de infecciones del mundo, con 5.6 millones. Modificada de [1].

De acuerdo a la “Guía de la Organización Mundial de la Salud sobre el acceso universal al tratamiento para VIH/SIDA” del 2010, la implementación del tratamiento antirretroviral (TAR) ha impactado contundentemente la prevalencia de la infección en 33 países. En Norteamérica, Europa Central y Occidental se ha visto una reducción en las muertes por SIDA desde 1996, en África Sub-Sahariana y el Caribe se ha observado el mismo patrón después de que en 2005 se introdujeran los Antirretrovirales a estas regiones. Sin embargo, en zonas que no han sido cubiertas en su totalidad por el tratamiento, como Europa del Este y Asia Central, se ha registrado un aumento en las muertes relacionadas con SIDA **(Figura 1.3).**

En 2010 se lograron evitar 700,000 muertes asociadas a SIDA gracias al uso de antirretrovirales, pero a pesar de lo alentadores que pudieran resultar estas cifras, únicamente el 35% de las personas infectadas a nivel mundial están bajo un régimen terapéutico; limitando así, las cifras de casos exitosos de manejo farmacológico a aquellas regiones con sistemas de salud solventes. Es por ello

que los esfuerzos globales se han dirigido a aumentar la cobertura en países de medianos y bajos ingresos, basándose principalmente en:

- Establecimiento de un momento óptimo de inicio de tratamiento mediante el uso de indicadores clínicos eficaces (Carga viral y cuenta de linfocitos T CD4+)
- Reducción del costo de antirretrovirales (ARVs) y simplificación de los regímenes actuales.
- Reducción de la incidencia de eventos adversos asociados a toxicidad de los medicamentos actuales.

Dada la magnitud que ha adquirido esta epidemia, los recursos destinados a su investigación, prevención y tratamiento han ido en aumento. Sin embargo, una estrategia prometedora que pueda solucionar este creciente problema aún se ve lejana, por lo que profundizar en el conocimiento del virus, su comportamiento a nivel poblacional y sus interacciones con el hospedero, dirigen a la comunidad científica en la búsqueda de un manejo retroviral adecuado, e incluso, el desarrollo de una vacuna efectiva.

1.1.3 EPIDEMIOLOGÍA DE VIH/SIDA EN EL CONTINENTE AMERICANO Y MÉXICO

La epidemia por VIH en el Continente Americano tiene un comportamiento particular. Los primeros casos se registraron desde 1981 en Estados Unidos, mientras que América Latina es considerada una región de infección reciente, empezando a contabilizarse casos después de 1983.

Tomando en cuenta los casos totales (personas de cualquier edad) por país, Estados Unidos es el país con mayor número de infecciones, seguido de Brasil y en tercer lugar México. Tomando en cuenta únicamente las infecciones en adultos mayores de 15 años, tal como la ONU estima la prevalencia de a infección, nuestro país se ubica en la posición diecisiete de Latinoamérica [4].

Muertes anuales relacionadas con SIDA de 1990 a 2009

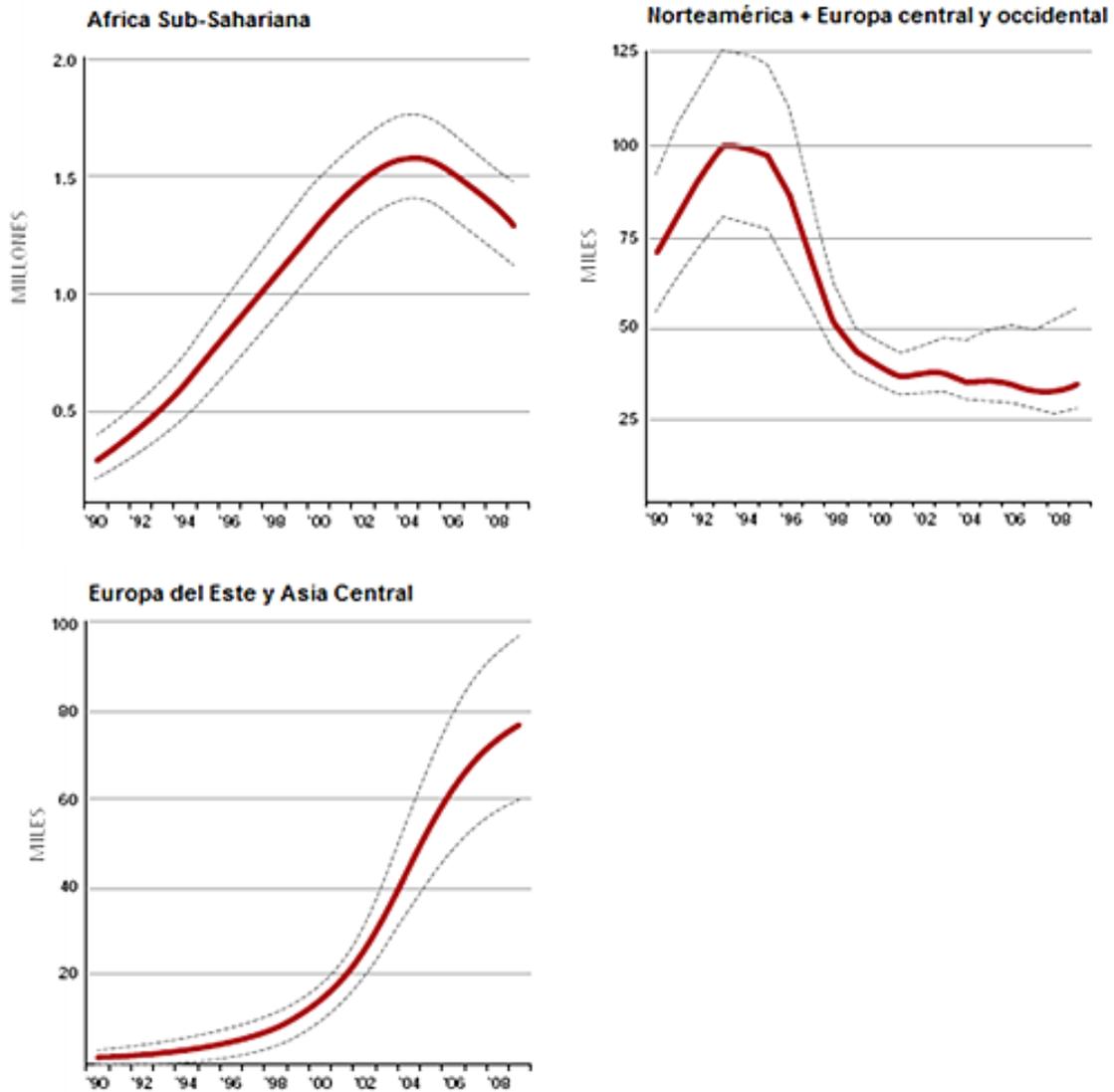


Figura 1.3 Tendencias de muertes relacionadas con SIDA en distintas regiones del mundo. En África sub-Sahariana, Norteamérica, Europa central y Occidental el declive de estas cifras coincide con el inicio del Tratamiento Antirretroviral. Europa del Este y Asia Central tienen limitada cobertura de la atención farmacológica de la infección, impactando en un aumento de la mortalidad. Traducida de [1].

De acuerdo al Centro Nacional para la Prevención y Control del SIDA (CENSIDA), en México hay cerca de 223,000 personas entre 15 y 49 años viviendo con VIH; 151,614 casos acumulados de SIDA y 36,714 casos acumulados de VIH al 30 de septiembre del 2011. Cerca del 80% de estos casos son hombres y aproximadamente 20% mujeres. Solo en 2011 (1 enero – 30 septiembre) se

registraron 2,846 nuevos casos de SIDA y 3,083 casos nuevos de VIH [3]. Estas cifras deben ser tomadas con cautela dado el número de subregistros y el retraso en la notificación de casos que afectan severamente la estadística de la enfermedad.

Los estados de la República Mexicana con mayor incidencia de casos de SIDA son el Distrito Federal (16.1%), Estado de México (11.1%), Veracruz (9.2%) y Jalisco (7.6%). Sin embargo, la incidencia por cada 100 mil habitantes muestra que el Distrito Federal, Guerrero, Baja California, Morelos, Veracruz y Nayarit son los estados más afectados. Se estima una prevalencia relativamente baja en la población general (0.3%) [3].

Los hombres que tienen sexo con hombres continúan representando la mayor cantidad de contagios, seguidos de mujeres heterosexuales (**Figura 1.4**). En nuestro país el sector más afectado son los adultos entre 25 y 34 años [3].

Distribución de adultos infectados con VIH en México, 2009

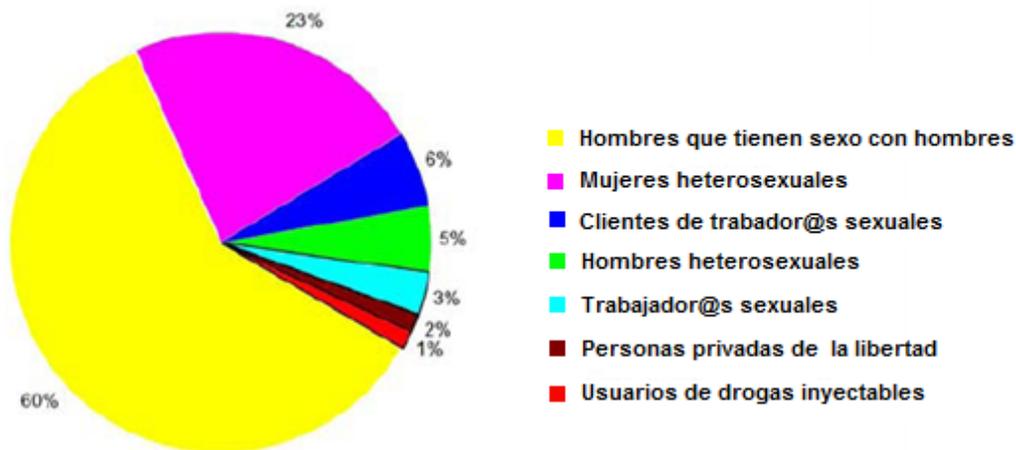


Figura 1.4 Distribución de los pacientes en México estimados de forma conjunta por CENSIDA y ONUSIDA y su distribución por grupos de riesgo. Los hombres que mantienen relaciones sexuales con hombres y las mujeres con relaciones heterosexuales representan los grupos sociales con mayor incidencia de infección por VIH-1 en México. Tomada de [3].

En cuanto a la atención médica que reciben los pacientes en nuestro país, se estima una cobertura del Tratamiento antirretroviral del 78%, y 14% de los paciente infectados son monitoreados sin necesidad actual de un régimen

terapéutico. Es preocupante que cerca del 59% de los casos totales estimados son personas que desconocen su estado serológico [4].

1.2 GENERALIDADES DEL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA

1.2.1 CLASIFICACIÓN DEL VIRUS

El análisis de múltiples secuencias de nucleótidos y proteínas ha permitido diferenciar dos clases de virus, VIH-1 y VIH-2. Filogenéticamente se encuentran un tanto lejos entre ellos, ubicando al tipo 2 más cercano de los Virus de Inmunodeficiencia en Simios (VIS), fortaleciendo la hipótesis del origen de la infección en un fenómeno de zoonosis.

El virus tipo 2 es encontrado principalmente en África, aunque los casos en otras partes del mundo como Brasil e Italia son crecientes. El VIH-1 es el responsable de la actual pandemia, y con base en análisis filogenéticos se ha clasificado en tres grupos, M (Main), O (Outlier) y N (non-M, non-O), siendo cada uno, producto de un evento de zoonosis distinto.

Los grupos O y N han sido aislados principalmente en individuos de Camerún, Gabón y Guinea Ecuatorial, mientras que el grupo M ha sido identificado en la mayor parte del mundo. Dentro de este grupo, se han diferenciado distintos subtipos designados con las letras A-D, F-H, J y K, además de numerosas formas recombinantes. El subtipo C tiene la cifra más alta de prevalencia global por ser predominante en África sub-Sahariana y la India, mientras que el subtipo B el de mayor incidencia en el continente Americano [6] (**Figura 1.5**).

1.2.2 ESTRUCTURA DEL VIH: ORGANIZACIÓN GENÓMICA Y PROTEÍNAS

El VIH pertenece a la familia *Retroviridae*. Todos los miembros de esta familia se caracterizan por la transcripción reversa de su genoma típico de ARN a ADN para poder ser insertado en los cromosomas de la célula hospedera. El VIH está clasificado como Lentivirus ya que la enfermedad que causa tiene una progresión típicamente lenta. Tal como otros miembros de este grupo, tiene como células blanco principalmente linfocitos y macrófagos, causando inmunodeficiencia.

Distribución continental de subtipos de VIH-1



Figura 1.5 Distribución global de subtipos de VIH-1. Se muestra la distribución por continente de los subtipos virales de VIH-1, no se incluyen las formas recombinantes. En mayúsculas se identifica al subtipo dominante y en minúsculas otros subtipos identificados en la región. El subtipo C es el más distribuido por su fuerte presencia en África e India, mientras que el subtipo B está distribuido de forma importante en el continente Americano. Tomada de [7].

El VIH es un virus envuelto, esférico, y con un diámetro aproximado de 100 a 120 nm. La envoltura se obtiene a partir de la membrana de la célula hospedera en el momento de la gemación y sobre ella se proyectan glicoproteínas virales en forma de espícula. Al interior de la cubierta se encuentra una cápside cónica que contiene dos copias, no necesariamente idénticas, de ARN⁺ de cadena sencilla de 9.7 kb aproximadamente. También se empaquetan hasta 50 copias de las enzimas Transcriptasa Inversa (RT) e Integrasa, junto con dos ARN de transferencia (ARNT) que servirán de primers para la actividad de RT (**Figura 1.6**).

Todos los retrovirus contienen tres genes principales responsables de la estructuración de nuevos viriones; éstos son *gag* (group specific antigen), *pol* (polimerasa) y *env* (envoltura). Además de estos tres genes, el VIH-1 posee regiones codificantes de proteínas accesorias con marcos abiertos de lectura (ORF) sobrelapados para *vif*, *vpu*, *vpr*, *tat*, *rev* y *nef*.

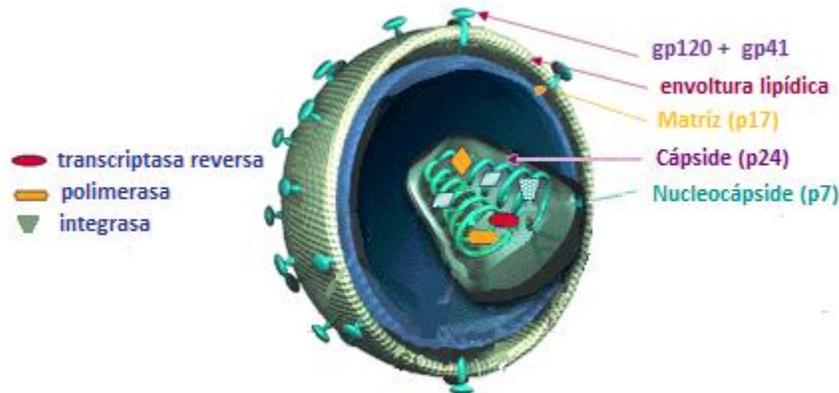


Figura 1.6 Estructura del VIH. Representación de la estructura de un virus maduro y sus componentes proteicos estructurales y enzimáticos principales. Modificada de [8].

A partir del gen *gag* se produce un precursor conocido como Pr55_{Gag}, que al sufrir proteólisis genera cuatro proteínas, p17 (matriz, MA), p24 (cápside, CA), p7 (nucleocápside, NC) y p6; además de p1 y p2 que son péptidos espaciadores **(Figura 1.7)**.

MA recubre la superficie interna de la envoltura viral. Esta proteína está conjugada con ácido mirístico en los residuos de glicina del extremo amino terminal, que es el responsable de la afinidad hacia membranas lipídicas. CA es la protagonista en el ensamblaje de la cápside viral y está conformada por dos dominios y un asa flexible. Seis unidades de p24 se asocian en unidades estructurales que conforman la cápside cónica.

El genoma viral está protegido por la nucleocápside, las proteínas que conforman esta estructura, NC, tienen dos motivos del tipo dedos de zinc que permiten la interacción con el ARN. Aunada a esta función estructural, NC se une a cuatro asas o loops en el ácido nucleico conocidos como “señal de encapsidación” para promover su dimerización y empaquetamiento en los viriones nacientes, actúa como chaperona para la transcripción reversa del material genético protegiéndolo de nucleasas y colocando un ARNt para el inicio de este proceso y coadyuva en la integración del genoma viral [9].

A partir del extremo C-terminal de *gag* se genera p6, una proteína indispensable para la liberación de partículas virales. Específicamente, las secuencias conocidas como “dominios terminales” en p6 son fundamentales en este proceso. Diversos estudios han mostrado que el virus ha usurpado la maquinaria de transporte de vesículas de las células hospederas para su propio escape.

El gen *pol* produce una poliproteína conocida como Pr160^{Gag-pol} a partir de la cual derivan las tres enzimas del virus: proteasa (PR), Transcriptasa inversa (RT) e Integrasa (IN) (**Figura 1.7**).

PR o p10 es una aspartil-proteasa localizada fuera de la cápside y es activa en forma de dímero. Esta enzima es responsable de cortar los precursores Pr55 y autocatalizar el corte de Pr160 en diversos polipéptidos justo después de la gemación del virión. Al generarse distintas proteínas se presentan cambios morfológicos conocidos como maduración del virus, confiriéndole infectividad.

RT, también conocida como p66/p51 es una ADN polimerasa ARN-dependiente que produce una copia de ADN de doble cadena a partir del genoma del virus. Esta enzima posee también actividad de ARNasa H pero no de exonucleasa 3'-5', por lo que la alta variabilidad genética del VIH en gran medida se debe a esta incapacidad de corrección de errores, estimándose una tasa de mutación de 3.4×10^{-5} mutaciones/nucleótido/ciclo. [2]

La tercera enzima generada a partir de *pol* es IN (p32) cuya función es la integración del genoma viral en el ADN de la célula hospedera. Este proceso lo realiza mediante la catálisis de dos reacciones, el procesamiento del extremo 3' de la doble cadena de ADN (provirus) y la integración de éste en el genoma del hospedero.

Por otro lado, el gen *env* es responsable de la producción de la glicoproteína gp160, la cual es cortada por PR en dos subunidades: gp120 (SU) que es un

polipéptido hidrofílico que se encuentra en la superficie de la envoltura y posee cinco asas (V1-V5) cuya secuencia es altamente variable, y gp41 (TM) que atraviesa en siete ocasiones la membrana. Ambas subunidades se ensamblan en trímeros para conformar las 72 espículas características del VIH. El dominio SU es el que se une a las moléculas receptoras de la célula blanco: CD4+ y CCR5/CXCR4. Dicha interacción induce cambios conformacionales en gp41 que promueven la fusión de la membrana celular con la viral para permitir la entrada de la cápside y continuar con el ciclo de replicación del virus.

Las proteínas accesorias se encuentran en menor cantidad pero no por ello tienen funciones poco importantes. Vif (Viral infectivity factor) se ha relacionado con la supresión de mecanismos anti-virales montados por el hospedero, principalmente al inhibir la enzima APOBEC3G, una citidin-desaminasa que funciona como factor antirretroviral al causar hipermutación en el VIH.

Vpr es esencial para la replicación del virus principalmente en macrófagos, forma parte del complejo de pre-integración que modula el movimiento del ADN viral recién sintetizado hacia el núcleo de la célula hospedera y además se ha sugerido que causa arresto celular en G2 inhibiendo la apoptosis de la célula infectada, pero permitiendo la expresión de ciertos genes “activadores” de la replicación viral [10, 11]. Por otro lado, Vpr también aparece como un factor soluble secretado por células infectadas que induce la muerte de células no infectadas, contribuyendo a la depleción de linfocitos T CD4+.

Por su parte, Vpu es una proteína exclusiva de VIH-1, la cual presenta dos dominios: el transmembranal y el citoplasmático. Dentro de la célula hospedera existe una proteína denominada enlacina (Tetherin, en inglés) cuya función es impedir la gemación de los viriones mediante el anclaje de éstos a la membrana citoplasmática. Vpu interactúa con la enlacina y bloquea su acción. Por otro lado, dentro de las células infectadas se generan complejos entre gp160 y CD4+ en el retículo endoplásmico, lo que limita el transporte de ambas moléculas a la

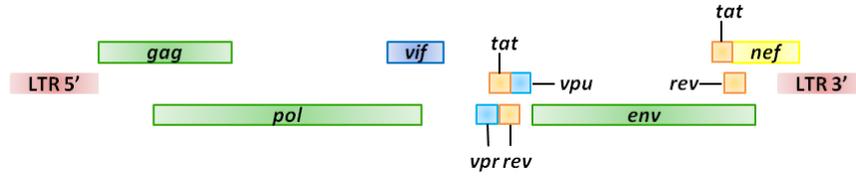
membrana plasmática. Vpu revierte esta unión, dejando libre el polipéptido gp160 y uniendo a CD4+ con proteínas de degradación vía proteosomal.

Nef es una proteína de expresión temprana que potencia la replicación del virus manteniendo altos niveles de viremia en el paciente y regula la expresión de la molécula CD4+ en la superficie del linfocito infectado. Además, se ha visto que puede regular de forma positiva y negativa la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en el linfocito, contribuyendo a la persistencia del virus y evasión del sistema inmune [11].

El genoma viral está flanqueado por repeticiones terminales largas (LTR) que son secuencias idénticas divididas en tres dominios: U3, R y U5. U3 del LTR 5' contiene gran parte de los elementos de control transcripcional, incluido el promotor. R forma estructuras híbridas de ARN-ADN para permitir a RT la transcripción de hebras completas de ADN. En U5 se encuentran sitios de unión a factores de transcripción que regulan la síntesis de ARNm durante la infección. Los LTRs participan también en la integración del provirus en el ADN hospedero [9, 10].

Tat y Rev son enzimas de regulación transcripcional. La primera de ellas potencia la procesividad de la ARN polimerasa aumentando la producción de todas las proteínas virales, además, se ha observado que es liberada por células infectadas y actúa sobre otras no infectadas como transductor de señales facilitando una nueva infección, por ello ha sido denominado "caballo de Troya". Por su parte, Rev se une al ARNm de las proteínas estructurales para regular su producción. Es una enzima sintetizada en la etapa temprana de la infección y aumenta su concentración durante el ciclo de replicación para regular el movimiento y producción del resto de las proteínas virales.

A.



B.

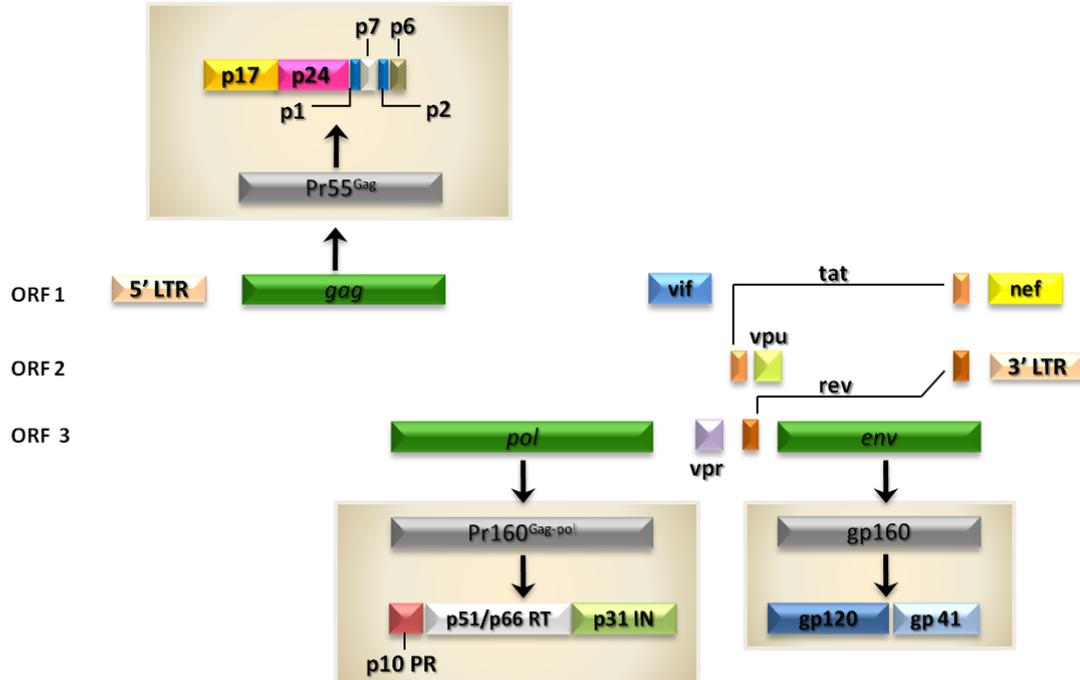


Figura 1.7 A. Organización genómica de VIH-1. El genoma del VIH-1 posee tres marcos distintos de lectura (ORF) que comprenden los genes estructurales (*gag*, *pol* y *env*), genes de proteínas accesorias (*vif*, *vpu* y *vpr*) y genes de proteínas reguladoras (*tat* y *rev*). Además existen dos secuencias de repetición terminales que flanquean el genoma, LTR5' y LTR3' que contienen secuencias promotoras y reguladoras de transcripción. **B. Proteínas del VIH.** Los genes *gag* y *pol* transcriben en dos precursores Pr55 y Pr160 respectivamente. A partir de Pr55 se generan matriz (p17, MA), cápside (p24, CA), nucleocápside (p7, NC), p6 y dos péptidos espaciadores (p1 y p2); y de Pr160 se originan las enzimas proteasa (p10, PR), transcriptasa inversa (p51, RT) e Integrasa (p32, IN). *Env* se traduce en gp160 que es cortada por proteasas celulares en gp120 (Superficie, SU) y gp41 (Transmembranal, TM).

1.2.3 TROPISMO, RECEPTORES Y CO-RECEPTORES

Tras diversos estudios del mecanismo de infección del VIH, se observó que el virus tenía una afinidad marcada por células en cuya superficie estuviera expresada la molécula CD4. Las principales células blanco son Linfocitos T ayudadores (CD4+) cuya depleción es característica de la infección y la progresión a SIDA; sin embargo, las células dendríticas también son susceptibles de ser

infectadas a pesar de la expresión reducida de dicha molécula. Mención aparte son los macrófagos, que se les ha identificado principalmente como reservorios del virus.

El receptor CD4 es miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas, de forma natural estabiliza la interacción entre el receptor del linfocito T y las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC-II) para el proceso de presentación antigénica [9]. En el contexto de la infección, se ha identificado un sitio de unión de alta afinidad hacia la proteína viral gp120 en el fragmento N-terminal de su dominio extracelular. Esta interacción es el primer paso en el ciclo replicativo del VIH.

Se sabe que la simple unión de gp120 y CD4+ no es suficiente para permitir la entrada del virus a la célula, es decir, es necesaria la participación de una serie de correceptores que refuercen la respuesta. Se ha identificado que miembros de la superfamilia de proteínas de siete asas transmembranales acoplados a proteína G cumplen con esta función.

Los dos correceptores principales para VIH son CXCR4 y CCR5. Ambos funcionan normalmente en la célula como receptores de quimiocinas. El uso preferencial de alguno de ellos define el tropismo viral, clasificando al virus en M-trópicos o R5 si el correceptor usado es CCR5 y T-trópicos o X4 si el correceptor CXCR4 es el participante. Se han aislado algunos virus cuya afinidad es intermedia, definiéndose como virus de tropismo dual [7]. El uso de CCR5 se ha asociado a etapas tempranas de la infección, mientras que los virus que usan CXCR4 aparecen típicamente en etapas avanzadas.

Otros receptores de quimiocinas que se han propuesto como posibles correceptores para el VIH incluyen CCR2b, CCR3, CCR8, CCR9, APJ entre otros, sin embargo, su importancia biológica aun no es clara [2].

1.2.4 CICLO DE REPLICACIÓN DEL VIH

Inicialmente, el VIH se une a la molécula CD4+ de la célula blanco mediante gp120. Esta unión induce cambios en la proteína viral, exponiendo los dominios de unión a correceptores (CXCR4 o CCR5). Principalmente se ha asociado al asa V3 de gp120 en esta interacción.

Después del primer contacto entre el virus y la célula, gp120 modifica su conformación para exponer el dominio de fusión de gp41 y así promover el acercamiento de la membrana viral a la bicapa lipídica de la célula blanco. Una vez que ambas membranas se han unido, entra la cápside viral al citoplasma del hospedero (**Figura 1.8**).

El ARN viral es transcrito en una doble cadena de ADN gracias a la actividad de RT. Se ha demostrado que NC juega un papel importante en este proceso, pues está involucrada en el posicionamiento del ARNt usado como iniciador de la transcripción [9]. El dominio con actividad de ARNasa H de RT participa de forma importante, pues degrada la porción de ARN del híbrido formado ARN-ADN dejando únicamente una cadena sencilla de ácido desoxiribinucleico que se complementara para formar el provirus de dos hebras listo para su inserción.

Las proteínas IN, NC y Vpr se asocian para formar el Complejo de Pre-Integración (PIC), que junto con el ADN recién sintetizado migra al núcleo. Una vez dentro, la enzima Integrasa se une a ambos LTRs y corta un dinucleotido altamente conservado de nucleótidos GT de cada extremo (procesamiento 3'), dejando extremos cohesivos que permitirán la inserción del provirus en el cromosoma hospedero (transferencia de hebra) que ya ha sufrido un corte escalonado previo (**Figura 1.8**). Ambas actividades de IN son dependientes de la estructura cuaternaria de la enzima. Para la primera de las etapas se requiere a la enzima dimérica, mientras que para la transferencia de hebra es una Integrasa tetramérica la que actúa [12]. El funcionamiento de esta enzima requiere de un ion divalente como cofactor (Mg^{2+}), al igual que ciertos factores celulares como LEDFG/p75, que se une al centro catalítico de la enzima para dirigirla al sitio correcto de inserción y además la protege de ser degradada [13]. Alternativamente, el ADN

viral puede formar círculos de uno o dos LTRs y permanecer en forma episomal sin generar infecciones productivas [2].

Después de la integración, se lleva a cabo la expresión de los genes virales y el procesamiento (splicing) del ARNm formado. En la etapa temprana se generan las proteínas Tat, Rev, Vif, Vpr y Vpu, mientras que en la etapa tardía el ARN generado puede no sufrir splicing para empaquetarse en las nuevas partículas virales, o sufrir un solo evento de corte y empalme para producir las poliproteínas Pol, Env y Gag [2].

Los precursores proteicos y el genoma viral son transportados a la membrana plasmática y ensamblados para estructurar viriones (**Figura 1.8**). El transporte y salida de las nuevas partículas virales son dependientes de Vpu y las proteínas celulares del sistema ESCRT.

Los virus nacientes son liberados de la membrana sin capacidad infectiva. La proteasa viral, que es generada por autocatálisis del precursor Gag-Pol, corta las otras poliproteínas virales en sus respectivas subunidades y permite la asociación de CA y otras estructuras que derivan en un virus maduro con poder infectivo (**Figura 1.8**).

1.2.5 HISTORIA NATURAL DE LA INFECCIÓN POR VIH

Tras la adquisición del VIH comienza un proceso de replicación continuo que, inicialmente, no suele manifestar alguna sintomatología característica. Sin embargo, existen algunos pacientes que en las primeras etapas de la infección pueden presentar el llamado síndrome retroviral agudo, una enfermedad parecida a la mononucleosis infecciosa que causa fiebre, erupciones, dolor articular e inflamación de los nódulos linfáticos mientras se producen anticuerpos específicos contra el virus, proceso denominado seroconversión [14].

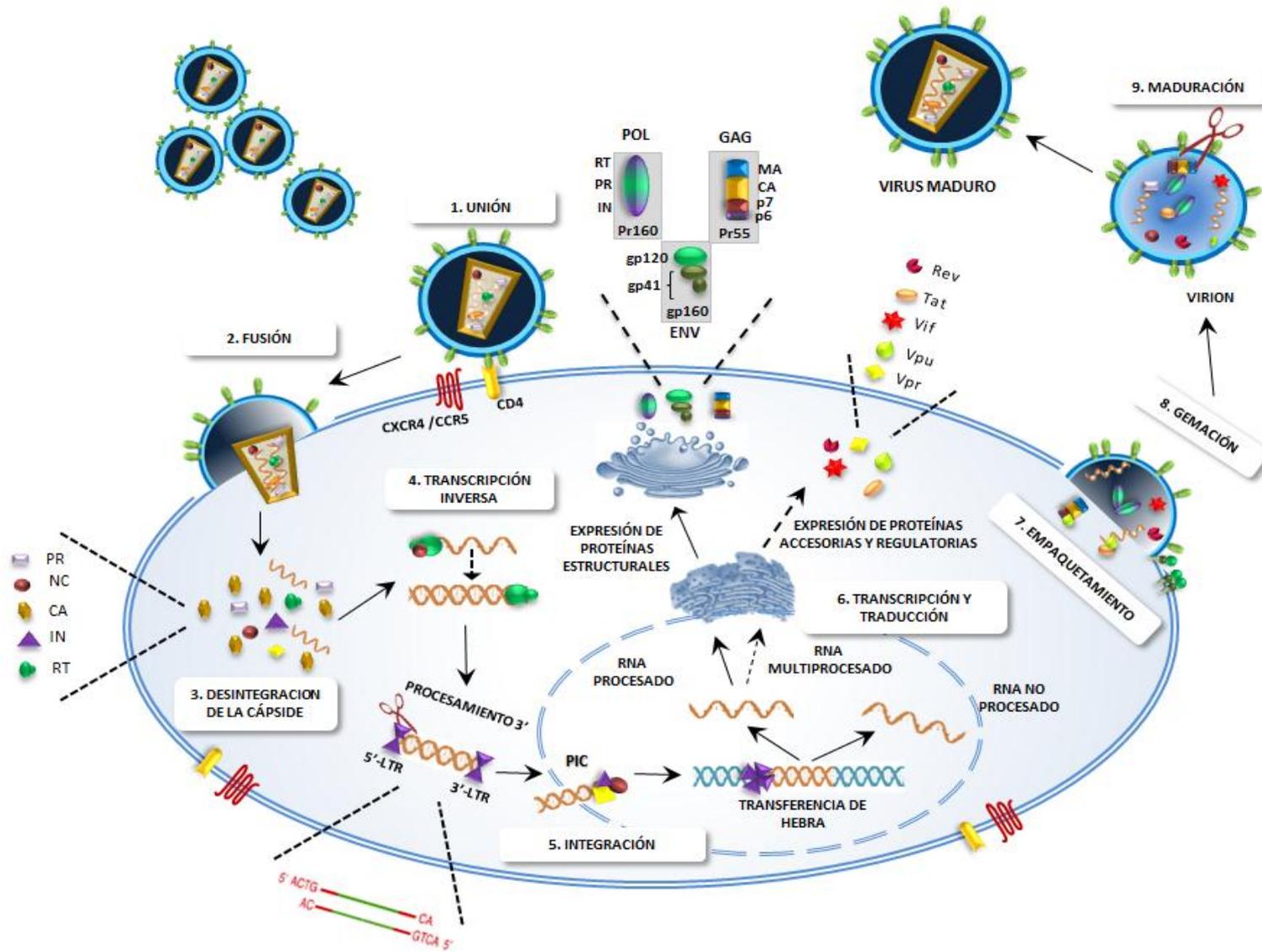
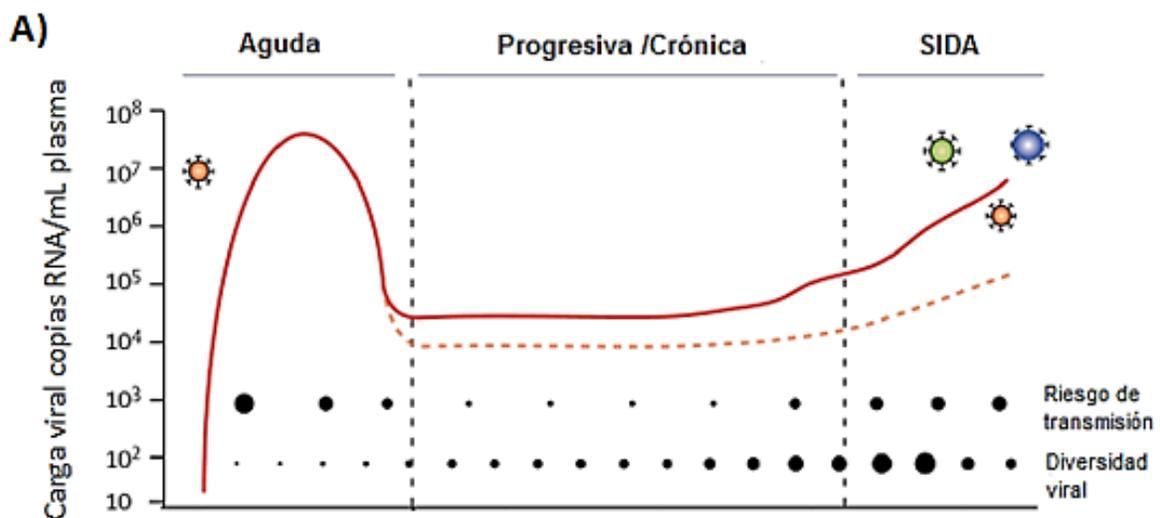


Figura 1.8 Ciclo de replicación del VIH. 1) El virus se une al receptor CD4+ del linfocito blanco a través de gp120, induciendo cambios conformacionales que permiten la unión a correceptores, principalmente CCR5 y CXCR4 y promoviendo la fusión de membranas mediadas por gp41. 2) La cápside viral es liberada en el interior de la célula hospedera. 3) La cápside se desintegra permitiendo la salida del material genético y las enzimas virales. 4) El ARN es transcrito en ADN de doble cadena gracias a la transcriptasa inversa. 5) El ADN es cortado en los extremos 3' por IN y se asocia a Vpr, NC e IN para conformar el complejo de preintegración (PIC) que transloca al núcleo. El provirus es integrado en el genoma de la célula hospedera gracias a IN. 6) La transcripción del ADN viral genera ARN que puede o no ser procesado, generando genomas virales listos para empaquetarse en nuevos viriones, o bien, ARNm que se traduce en las proteínas Tat, Rev, Vpr y Vpu en etapa temprana y Gag-Pol, Gag y Env en etapa tardía. 7) El ARN viral y las proteínas son transportadas a la membrana plasmática para conformar nuevas partículas virales. 8) Los viriones salen de la célula mediante gemación, envolviéndose en una porción de la membrana plasmática. 9) La proteasa viral corta los polipéptidos empaquetados para producir las enzimas y proteínas necesarias para conformar un virus maduro e infectivo.

La persona que es infectada por el virus, independientemente de que presente síntomas o no, es altamente contagiosa, particularmente en la etapa temprana de la infección. La proliferación del virus se lleva a cabo de forma crónica, deteriorando el sistema inmune y haciendo susceptible al individuo de ser blanco de diversas infecciones oportunistas.

El curso de la infección puede dividirse en tres etapas: infección primaria (aguda), infección crónica y avance de la enfermedad (SIDA). La duración de cada etapa es variable de individuo a individuo (**Figura 1.9**).



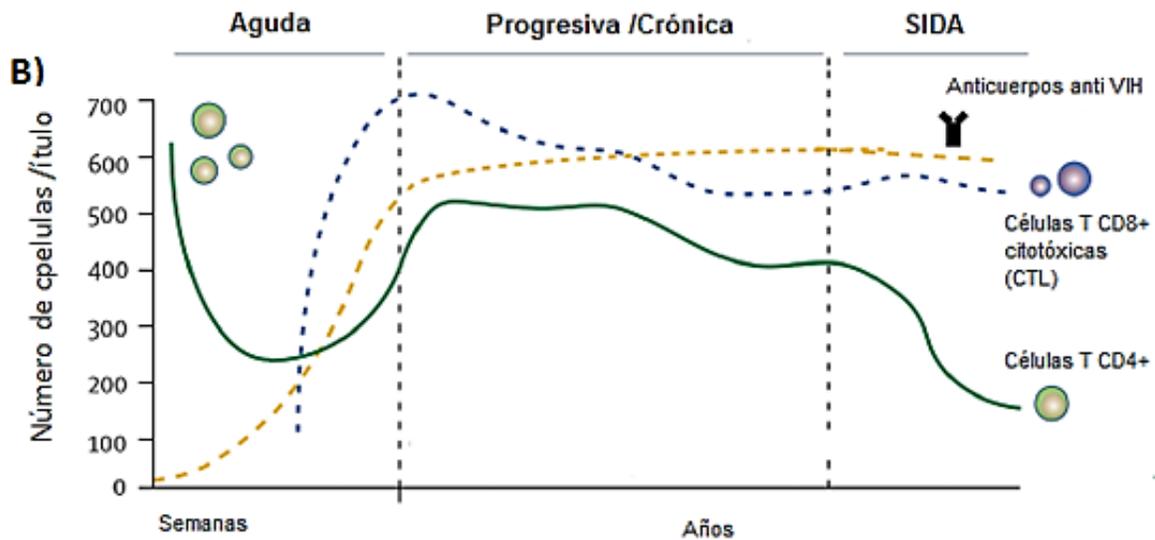


Figura 1.9. Variación de distintos parámetros inmunológicos y virales a lo largo de la infección por VIH. A) progresión de la enfermedad basada en la variación del número de copias de RNA por mL de plasma en cada paciente. El mayor riesgo de transmisión se da en la etapa temprana, mientras que la diversidad de especies virales aumenta hacia la etapa de SIDA. **B)** Progresión en la producción creciente de anticuerpos dirigidos a VIH, y la depleción en las poblaciones celulares de Linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ características del SIDA. Traducida de [15].

La Organización Mundial de la Salud clasifica la infección de acuerdo a datos clínicos y de laboratorio de los pacientes en tres rubros, de los cuales depende el manejo clínico del paciente (**Tabla 1.1**).

Categorías clínicas de la infección por VIH			
	A	B	C
Células CD4⁺	Asintomática, o infección aguda	Sintomática[†]	Clínica[†]
		No categorizada en A o C	SIDA
> 500/mL (> 29%)	A1	B1	C1
200 – 499 /mL (14% - 28%)	A2	B2	C2
< 200/mL (<14%)	A3	B3	C3

♣ Incluye: candidosis vulvovaginal, displasia cervical; fiebre o diarrea persistente, herpes zoster, púrpura trombocitopénica, entre otras.
♠ Infecciones oportunistas persistentes y concomitantes

Tabla 1.1 Categorización de la infección por VIH de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud. Se muestran las categorías clínicas en que se divide la infección por VIH basadas en el parámetro clínico de cuenta de Linfocitos T CD4⁺.

El tratamiento con antirretrovirales y la profilaxis de las infecciones oportunistas han modificado la evolución del SIDA.

Fase inicial

Independientemente de su mecanismo de transmisión las manifestaciones que aparecen tras el ingreso del VIH en el organismo pueden guardar relación con la dosis infectante, la virulencia de la cepa de VIH y la capacidad de respuesta del sujeto infectado.

Normalmente se presentan síntomas inespecíficos de cualquier infección viral, tales como fiebre, faringitis y dolor de cabeza, en algunos casos artralgias y mialgias. Estas situaciones se resuelven de 3 a 5 semanas posteriores a su aparición.

Linfadenopatía, úlceras mucocutáneas y pérdida de peso refuerzan la sospecha sobre infección por VIH. La meningoencefalitis ascéptica es la manifestación neurológica más común en la infección primaria de VIH.

A las 2-6 semanas del contagio se detecta antígeno p24, el cultivo viral se positiviza y existen muchos linfocitos CD4+ infectados; progresivamente van apareciendo los anticuerpos circulantes (4-12 semanas) y el antígeno p24 desaparece. Se presenta una inmunosupresión modesta y el nivel de RNA viral en plasma va en aumento, se presentan pocas variantes virales y la replicación inicial se confina a nodos linfáticos. Dentro de los resultados de laboratorio, se observa un incremento en las células T CD8+ activadas circulantes, la enzima aspartato desaminasa (AST) suele estar también aumentada (**Figura 1.9**).

La eventual migración de linfocitos infectados y viriones a través de la sangre permite la replicación secundaria en sitios como el tracto gastrointestinal, el bazo y la médula ósea, promoviendo un franco incremento en la viremia ($10^6 - 10^7$ copias/mL plasma).

Aproximadamente dos meses después de la infección, se suele presentar un control parcial de la replicación viral al establecerse la respuesta citotóxica, de

esta manera, se establece un equilibrio en la replicación, conocido como “set point” ($10^3 - 10^5$ copias/mL plasma).

Fase crónica

Esta fase tiene una duración variable estimada en varios años y en ella persiste la proliferación viral, aunque a bajo nivel. Se estima que 1 de cada 10,000 linfocitos CD4+ circulantes estaría infectado pero sólo en el 10% de ellos existiría replicación viral persistente [14].

A pesar de existir una pérdida crónica de células T CD4+ aproximadamente de 30 – 60 cél /uL/año, la cuenta general puede permanecer constante por varios años antes de la marcada reducción característica del SIDA.

Existen individuos capaces de permanecer en este estadio por décadas sin necesidad de tratamiento antirretroviral; tal es el caso de los denominados pacientes no progresores o controladores de la infección. La razón de este control sobresaliente de la replicación viral es multifactorial, ya que depende de características intrínsecas de la respuesta inmune del individuo, influencia de factores genéticos como el haplotipo HLA o presencia de polimorfismos en TLRs importantes para la respuesta inmune innata, factores virales, etc [16].

Los pacientes en esta etapa suelen estar asintomáticos, con o sin adenopatías, cifra baja de plaquetas y mínimos trastornos neurológicos.

Aunque existen amplias variaciones individuales, se estima que en 10 años el 50% de los adultos y el 80% de los niños habrán evolucionado a estadios más avanzados, aunque la progresión de la enfermedad puede verse influida por numerosos factores como el inicio de TAR, estado nutricional del paciente, resistencia del sistema inmune, entre otros [14]. Se ha determinado que únicamente de 1 a 2% de los pacientes progresan a SIDA antes de 2 años [16].

SIDA

Esta etapa se caracteriza por un aumento de la replicación del VIH y coincide clínicamente con una profunda alteración del estado general del paciente (síndrome de desgaste), aparición de graves infecciones oportunistas, ciertas neoplasias y alteraciones neurológicas. Además, existe una correlación directa entre la aparición de enfermedades oportunistas como candidosis oral, pneumococcosis, tuberculosis y varicela zoster; y la disminución de células T CD4+ por debajo de 500 células/uL.

El riesgo de tener complicaciones como neumonía por *Pneumocystis jiroveci*, *Candida esophagitis*, histoplasmosis diseminada y otras infecciones fúngicas sistémicas se incrementa sustancialmente cuando el nivel de linfocitos T CD4+ cae a valores cercanos a 200 células/uL,

La aparición de otros trastornos como reactivación de infecciones por citomegalovirus (CMV), criptosporidiosis, entre otras, son indicativas de una franca falla del sistema inmune (50 células T CD4+ /uL) **(Figura 1.10)**.

Existe una variedad de neoplasias que se presentan en pacientes en esta etapa de progresión, entre ellas se incluye el sarcoma de Kaposi causado por un virus de herpes tipo 8, linfoma asociado a infección por virus Eipsten- Barr y carcinoma anal y cervical asociado al virus de papiloma humano (VPH).

El pronóstico de pacientes con SIDA es variable en cuanto a supervivencia. La edad, el mecanismo de contagio, el tratamiento antirretroviral y la capacidad de respuesta del organismo, parecen influir en la sobrevida del individuo.

Diseases related to HIV-infection progression

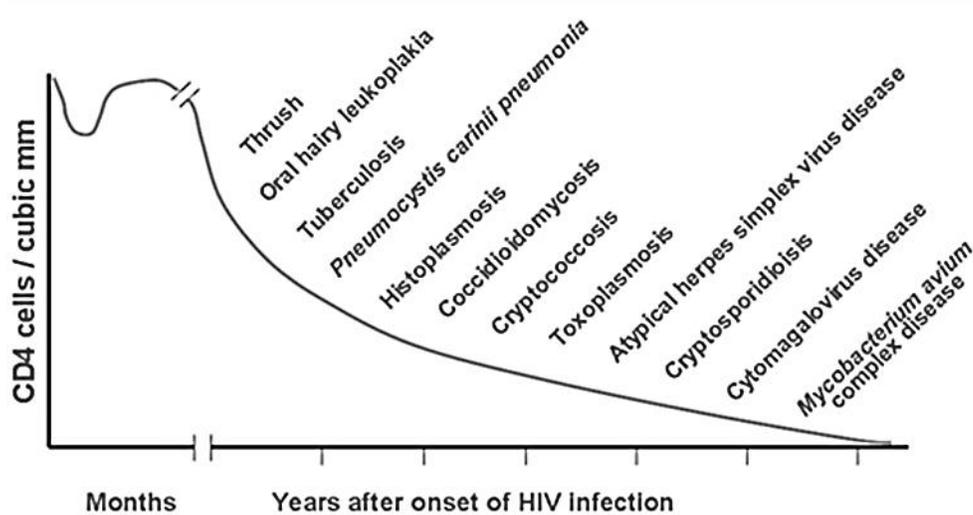


Figura 1.10. Enfermedades relacionadas con la progresión de la infección por VIH. Distintos trastornos en los pacientes con infección por VIH aparecen de forma progresiva y con una correlación directa con el descenso en la cuenta de células T CD4+. La acumulación de infecciones y trastornos inmunes derivan en el desarrollo de Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), generalmente cuando los linfocitos T CD4+ se encuentran por debajo de 500 cél/uL. Modificada de [7].

1.3. TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL (TAR)

1.3.1 DESARROLLO DEL TAR

Desde el primer caso de infección por VIH hasta 1985, la tasa de mortalidad por SIDA aumentaba de forma incontrolable, pues no se conocía tratamiento alguno que fuera efectivo en los pacientes con inmunosupresión.

Con el creciente conocimiento sobre el VIH fue posible identificar blancos terapéuticos prometedores. La primera molécula usada en el tratamiento de estos pacientes fue la azidotimidina (AZT, también conocida como zidovudina) que bloquea de forma eficaz a la transcriptasa inversa y fue aprobada por la FDA a finales de 1986. Con este compuesto nace la primera familia de antirretrovirales denominados inhibidores de transcriptasa inversa análogos de nucleósidos (NRTIs en inglés). Sin embargo, el rápido desarrollo de resistencia en pacientes que recibían este medicamento forzó la búsqueda de nuevos compuestos y en 1991 surge otro NRTI conocido como Didanosina (ddl) que fue efectiva, pero

nuevamente de forma temporal. Poco más tarde es aprobado el tercer antirretroviral con el nombre de Zalcitabina (ddC) [2].

En México fue hasta 1991 cuando AZT estuvo abiertamente disponible, pero con una eficacia discreta. Algunos estudios clínicos demostraron, a mediados de los noventas, que el uso de una terapia combinada de dos NRTIs era más potente que el tratamiento simple con AZT, por lo que se hizo popular la prescripción de este medicamento en combinación con ddl o ddC. Sin embargo, estos esquemas terapéuticos implicaban un elevado número de píldoras y repetidas tomas al día [17].

Con el tiempo, numerosos compuestos se desarrollaron para limitar la replicación del virus. De este modo surgieron nuevas familias de medicamentos: inhibidores de transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos (NNRTIs) e inhibidores de proteasa (PIs). Los NNRTIs afectan directamente a la enzima RT disminuyendo su afinidad por su sustrato, mientras que los NRTIs son pequeñas moléculas que al ser incorporadas en el ADN viral producen un paro prematuro en su síntesis; por su parte los inhibidores de proteasa inhiben la actividad de la enzima evitando el ensamblaje y maduración de los viriones.

El establecimiento de una politerapia antirretroviral, que combina fármacos de distintas familias y permite bloquear más de un punto en la replicación del virus, marcó una nueva era en el manejo terapéutico de los pacientes. Este esquema se popularizó en 1996, denominándose Terapia Antirretroviral Altamente Activa (TARAA).

El TARAA consiste en la combinación de tres o cuatro fármacos, típicamente 2 NRTIs y 1 NNRTI o 1 IP potenciado con ritonavir. La finalidad de este esquema es disminuir la carga viral (CV) a niveles indetectables (<50 copias/ml) y permitir la reconstitución inmune. Son numerosas las ventajas que ha representado la implementación del TARAA, pues se ha reducido la complejidad del manejo terapéutico al reducir las dosis diarias y se han controlado los efectos adversos.

Actualmente existen combinaciones ampliamente usadas de antirretrovirales (ARVs) que han demostrado ser efectivas para tratar la infección. Los NRTIs usados con frecuencia son Lamivudina (3Tc), Zidovudina (AZT) y Tenofovir (TDF) en combinación con Efavirenz (EFV) o Nevirapina (NVP), estos últimos pertenecientes a la familia de los NNRTIs [18]. La elección del esquema está basada en la seguridad, potencia y tolerabilidad que cada combinación represente para el paciente; así como de la accesibilidad y costo.

A pesar del gran avance en el desarrollo de ARVs que existe, el momento adecuado para el inicio del tratamiento aun es controversial. Existen guías de manejo terapéutico que indican que el momento óptimo es cuando el paciente presenta una cuenta de células CD4⁺ entre 200 y 350 cel/ μ l [18-20].

1.3.2 TRATAMIENTO DE SEGUNDA LÍNEA Y ESQUEMAS DE RESCATE

Uno de los factores más importantes para la efectividad de cualquier esquema terapéutico es la adherencia al mismo por parte del paciente, una inadecuada toma de medicamentos (limitada o inconstante) puede repercutir en el fracaso del tratamiento.

Cuando se presenta falla virológica, definida en cualquiera de estas tres situaciones:

- a) CV > 400 copias/mL después de 6 meses de tratamiento
- b) CV > 50 copias/mL después de 12 meses de tratamiento
- c) Aumento repentino de la CV después haber alcanzado <50 copias/mL

O bien, una disminución significativa de la cuenta de linfocitos T CD4⁺ (<100 cel/ μ l), se debe considerar un remplazo en alguno de los componentes del esquema de medicación o bien la sustitución completa de la combinación de ARVs [15].

Normalmente se utilizan Inhibidores de Proteasa potenciados para restaurar la supresión viral, en México la combinación más usada es Lopinavir/Ritonavir para estos casos [20].

Existen pacientes que no responden a una gama amplia de ARVs, por lo que medicamentos más potentes deben usarse para tratar de restaurar el sistema inmunológico y mantener la viremia en niveles controlados. Algunas de las alternativas que existen son NNRTIs o PI de segunda generación, o bien, moléculas recientemente aprobadas cuyos blancos son novedosos, como el inhibidor de fusión (Enfuvirtide), inhibidor de co-receptor CCR5 (Maraviroc) e inhibidor de Integrasa (Raltegravir).

En México hay más de 20 sustancias antirretrovirales incluidas en el Cuadro Básico de Medicamentos, y entre ellas se encuentran las mencionadas para esquemas de rescate. No obstante, su uso está sujeto al criterio del médico que debe contar con evidencia suficiente de multi resistencia para prescribirlos, pues el alto costo de estas sustancias limita su disponibilidad [20, 21].

1.3.3 NUEVAS OPCIONES TERAPÉUTICAS: INHIBIDORES DE INTEGRASA

Dada la importancia que tiene la infección por VIH, existe una enorme necesidad de nuevas moléculas antirretrovirales que mejoren los esquemas de tratamiento actuales, y permitan una reducción de costos y efectos adversos. Muchos han sido los blancos postulados para el desarrollo de nuevos fármacos, tal es el caso de los principales co-receptores CCR5 y CXCR4, el dominio de dimerización de Proteasa para inhibir su actividad, gp120 o la enzima Integrasa [22, 23].

No es de sorprender que IN sea objeto de diversos estudios, pues es un componente esencial del ciclo replicativo del virus. Esta enzima tiene un peso molecular de 32 kDa, compuesta por 288 amino ácidos esta codificada en el extremo 3' de gen *pol*. Está dividida estructuralmente en tres dominios, N-terminal o NTD (aa. 1-50), dominio catalítico o CCD (aa. 51-212) y C-terminal o CTD (aa. 213-288). El primero de los dominios contiene un motivo de dedos de zinc que participa en la oligomerización de la enzima para activarla. Dentro del CCD se encuentran tres amino ácidos altamente conservados conocidos como triada catalítica (D64, D116 y E152) o motivo DDE, un cambio en cualquiera de ellos altera de forma significativa la actividad de la enzima, pues estos aminoácidos participan en la quelación de iones Mg^{2+} que son cofactores enzimáticos; además

están presentes secuencias de unión al PIC y a LEDGF/p75. Finalmente, el extremo carboxilo tiene sitios de unión al ADN viral y celular, resultando importante en las dos actividades principales de la enzima [12, 24-26].

Como se describió con anterioridad, el resultado de la acción de la RT es un fragmento de ADN conocido como provirus. En el citoplasma, la IN se une a una secuencia específica en los LTRs de esta cadena y cataliza el corte de un dinucleótido GT, dejando los nucleótidos CA complementarios libres, esta acción es conocida como procesamiento 3'. Esta cadena procesada se une a diversas proteínas virales conformando el complejo de pre-integración (PIC) que llevara al provirus hasta el núcleo, donde la cadena con extremos cohesivos es usada como sustrato para la inserción covalente del ADN viral en el ADN celular, lo cual ocurre de manera simultánea en ambos extremos. Este segundo paso se llama transferencia de hebra [12, 25]. Una vez que se integra el genoma viral, hay proteínas celulares encargadas de reparar el punto de corte, dejando una secuencia de 5 pb flanqueando el sitio de inserción [26]. (**Figura 1.11**)

Por más de una década se ha estudiado a IN para identificar puntos susceptibles de ser inhibidos, concluyéndose que era más fácil bloquear a la enzima unida a ADN que de forma libre. Diversos compuestos se han propuesto como inhibidores, siendo el complejo ADN-IN el blanco óptimo. Dependiendo de la acción que se buscaba inhibir, estos compuestos fueron divididos en Inhibidores de unión a ADN (INBIs, **I**ntegrase **A**DN-**B**inding **I**nhibitors) e inhibidores de transferencia de hebra (INSTIs, **I**ntegrase **S**trand **T**ransfer **I**nhibitors).

El primero de los grupos fue estudiado por algunos años obteniéndose resultados preclínicos poco favorecedores. Fue así que el estudio se centró en el desarrollo de INSTIs, moléculas que demostraron actividad terapéutica.

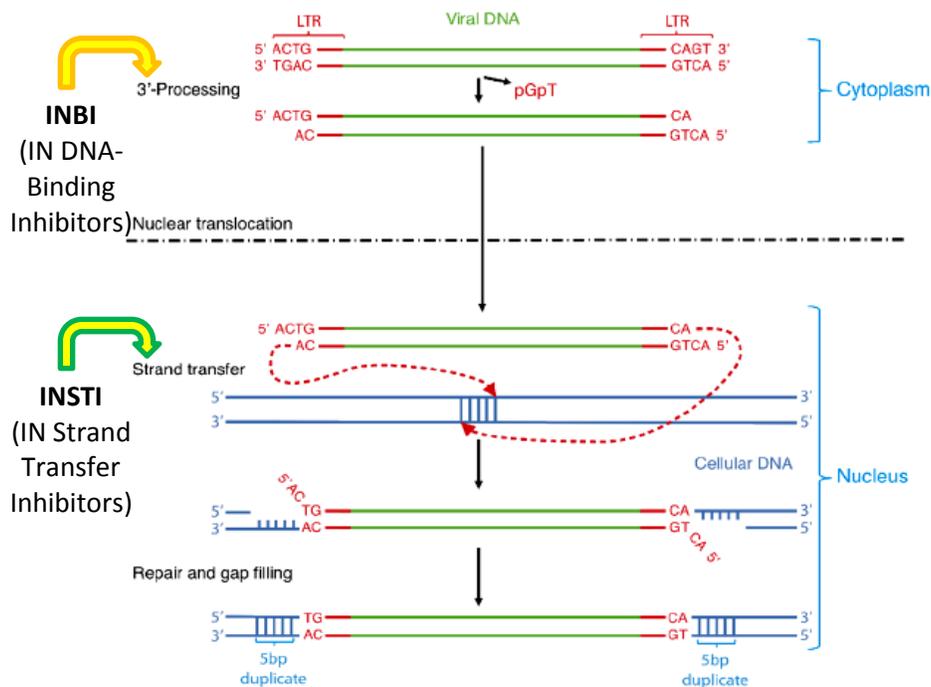


Figura 1.11. Representación de la integración del genoma viral. EL procesamiento 3' ocurre en el citoplasma, dejando extremos cohesivos en el provirus, el cual será transportado al núcleo por medio del PIC. Dentro del núcleo se da la inserción del material viral (verde) en el ADN celular (azul) y tras la reparación de los puntos de corte hay una secuencia de 5 pb flanqueando la cadena recién incorporada. Los ARVs que bloquean la unión al ADN y evitan el procesamiento del provirus se conocen como INBIs, mientras que aquellos fármacos que inhiben la inserción o transferencia de hebra se conocen como INSTIs. Modificada de [26]

Los primeros compuestos que se sintetizaron de este grupo son derivados de dicetoácidos, siendo Raltegravir (Isentress®, MK-0518) de Merck and Co, el único aprobado para su uso clínico por la FDA hasta el momento. Este compuesto se une al ADN desplazándolo ligeramente de su sitio de unión a IN y desestabilizando el complejo IN-ADN, además interactúa con la triada catalítica y los dos iones Mg^{2+} bloqueando así la transferencia [26, 27]. **(Figura 1.12)**

Elvitegravir es una molécula en fase III que se agrupa dentro de los INSTIs. Este compuesto pertenece a Gilead Sciences y parece ser una alternativa terapéutica. Su mecanismo de acción es similar a Raltegravir, y su administración podría ser más cómoda para el paciente, pues es una sola toma al día (125 mg), a diferencia de MK-0518 que está prescrito en dos tomas diarias de 400 mg [27, 28].

La aparición de mutantes resistentes a cualquiera de estos medicamentos, aun sin ser expuestos a ellos, exige el desarrollo de nuevos compuestos. Existen algunas moléculas prometedoras como GSK-1349572 o GSK-1265744 que están siendo probados en fase II y I/IIa respectivamente [26].

Muy recientemente se ha promovido el desarrollo de una nueva generación de INBIs, principalmente del tipo estilquinolonas; estos compuestos han despertado el interés de algunos investigadores, pues *in vitro* han mostrado inhibir efectivamente el procesamiento 3' del provirus [12]. Entre algunos otros, estos compuestos conforman la segunda generación de inhibidores de Integrasa.

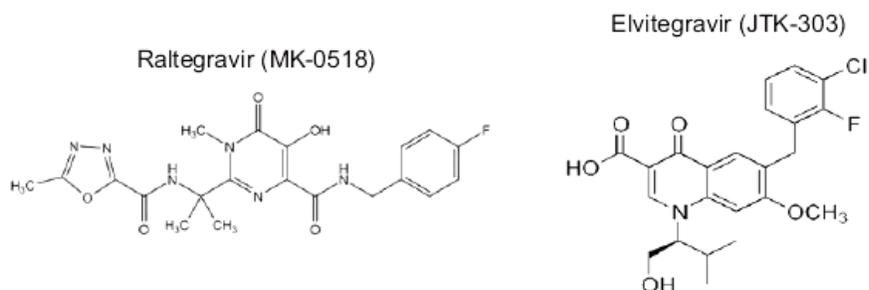


Figura 1.12 Estructuras químicas de inhibidores de Integrasa de primera generación.

Raltegravir aprobado por la FDA en el 2007 para su uso clínico y Elvitegravir en fase III. Tomada de [12]

1.4 RESISTENCIA FARMACOLÓGICA A ANTIRRETROVIRALES

1.4.1 DESARROLLO DE RESISTENCIA

En cada evento de replicación del ARN viral se comete al menos un error, y se estima que en una persona se pueden generar mil millones de virus nuevos cada día [17], por lo que el surgimiento de diversas mutaciones es una consecuencia esperada de estas altas tasas de replicación y el inherente error de la transcripción reversa mediada por una enzima (RT) poco fiel. Además, es una estrategia del virus para evadir la presión ejercida por la respuesta inmune (presión interna) o por la exposición a medicamentos (presión externa).

Los cambios generados durante la transcripción pueden o no tener un impacto fenotípico, pero es un hecho que se generan numerosas variantes o cuasiespecies virales en cada ciclo de replicación. La cuasiespecie dominante está determinada por fenómenos de presión selectiva diversos.

La resistencia farmacológica está definida como la replicación viral activa en presencia de uno o más medicamentos [20], y es un fenómeno que tiene un origen genotípico, es decir, un cambio específico en el ARN del virus confiere esta ventaja, a estos cambios se les denomina “mutaciones de resistencia”. Estas mutaciones, pueden también modificar la capacidad de replicación del virus, reduciendo su tasa de crecimiento, estos acontecimientos promueven la aparición de mutaciones compensatorias o la desaparición de determinada variante viral.

Las mutaciones cuya simple presencia disminuye la susceptibilidad del virus a cierto medicamento son denominadas mutaciones mayores. Mientras que las mutaciones menores o compensatorias son normalmente responsables de aumentar la capacidad replicativa perdida por el cambio principal y, en ocasiones, favorecer el fenómeno de resistencia cruzada del virus [20].

La aparición de mutaciones de resistencia se da en condiciones subóptimas de tratamiento, a este tipo de resistencia se le conoce como **resistencia secundaria o tradicional** [17]. La causa primordial de este fenómeno es una adherencia pobre del paciente a las indicaciones terapéuticas del médico.

El aumento en la frecuencia de uso de ARV, también aumenta la posibilidad de transmisión de virus resistentes. Una persona infectada por alguno de estos virus podría ser resistente a cierto medicamento, aun sin haber sido expuesto nunca a él. A este tipo de resistencia se le denomina primaria o **resistencia transmitida** [17].

Las mutaciones de resistencia son específicas para cada medicamento existente, pero un solo cambio puede dar resistencia a un solo ARV o a varios de forma simultánea, haciendo heterogénea la repercusión de cada cambio registrado.

Es importante hacer mención del concepto de “barrera genética”, que es el número de mutaciones necesarias para generar resistencia hacia un medicamento y la rapidez con que estas aparecen. Cada ARV tiene una diferente barrera genética, i.e medicamentos con una baja barrera requieren de la aparición de una sola mutación para perder efectividad, mientras que otros con una alta barrera genética requieren la acumulación de tres o más cambios en el mismo genoma viral.

1.4.2 RESISTENCIA A FARMACOS DE PRIMERA LINEA

El primer caso de resistencia a ARV se reportó dentro de los dos años posteriores a la aprobación para uso clínico de AZT, y es un fenómeno recurrente para todos los medicamentos.

En el caso de los NRTIs se han clasificado a las mutaciones en dos grandes grupos, el primero de ellos incluye cambios que impiden la incorporación del “primer” de ADN para iniciar la transcripción (mutaciones discriminatorias) y aquellas análogas de timidina (TAMs), éstas últimas son seleccionadas únicamente por AZT y Estavudina (d4T) pero su acumulación tienen repercusión en la susceptibilidad ante otros ARVs.

La mutación más común relacionada con resistencia a NRTIs es M184V, que tiene un impacto importante en la susceptibilidad a 3TC y FTC y menor para ABC y ddI. La aparición de esta mutación no es motivo de suspensión de prescripción de NRTIs, ya que existen ARVs que presentan mayor efectividad cuando este cambio aparece en el genoma viral (**Figura 1.13**). La variante M184I se ha observado como una mutación previa a M184V. En el caso de las TAMs, se dividen en dos subgrupos, el primero de ellos que comprende M41L, L210W y Y215Y cuya presencia se asocia con resistencia cruzada; y el tipo II (67N,70R, T215F y

K219QE) que tienen diferentes efectos en la susceptibilidad a NRTIs. Cualquiera que sea la categoría, la prevalencia de TAMs se ha reducido por el uso poco frecuente de ZDV y d4T.

Hay dos codones en RT relevantes relacionados con el desarrollo de multirresistencia. La posición 69 puede presentar una inserción que tiene alto impacto en la susceptibilidad del virus a diversos medicamentos, mientras que en la posición 151 la mutación Q→M es importante. Se han encontrado dos patrones que determinan la resistencia a múltiples fármacos, (i) Múltiples TAMs + T69ins + M184V y (ii) Q151M + K65R + M184V [29, 30] **(Figura 1.13)**.

Es menor la cantidad de NNRTIs que se han desarrollado, sin embargo existen mutaciones importantes relacionadas con resistencia. Los cambios en la posición 138 son los más comunes, específicamente la mutación E138K tiene alta prevalencia. Las mutaciones que aparecen primero en pacientes resistentes a NNRTIs surgen en las posiciones 103, 106, 181, 188, y 190, seguidas de los cambios L100I y K101EP [29, 30] **(Figura 1.14)**.

Finalmente, en el caso de los PIs se han encontrado doce posiciones con mutaciones de alto impacto en la susceptibilidad a diversos medicamentos, las posiciones 76, 88, y 90 han mostrado mutaciones que intervienen de forma indirecta con la disminución de la eficacia de PIs, mientras que los cambios en los codones 30, 32, 46, 47, 48, 50, 54, 82, y 84 modifican directamente la respuesta ante un ARV, pues son sitios localizados en el punto de unión de la enzima y su sustrato **(Figura 1.15)**. Esta clase de medicamentos se administran de forma conjunta con Ritonavir para mayor eficacia. Se han descrito además, mutaciones accesorias como L10IVF, V11I, K20TVI, L23I, L24IF, L33F, K43T, F53L, Q58E, A71VTIL, G73STCA, T74PS, N83D, y L89V que exacerban el efecto de una mutación primaria. Y K20R, M36I, I62V, L63P, V77I, and I93L que compensan defectos en el fitness viral.

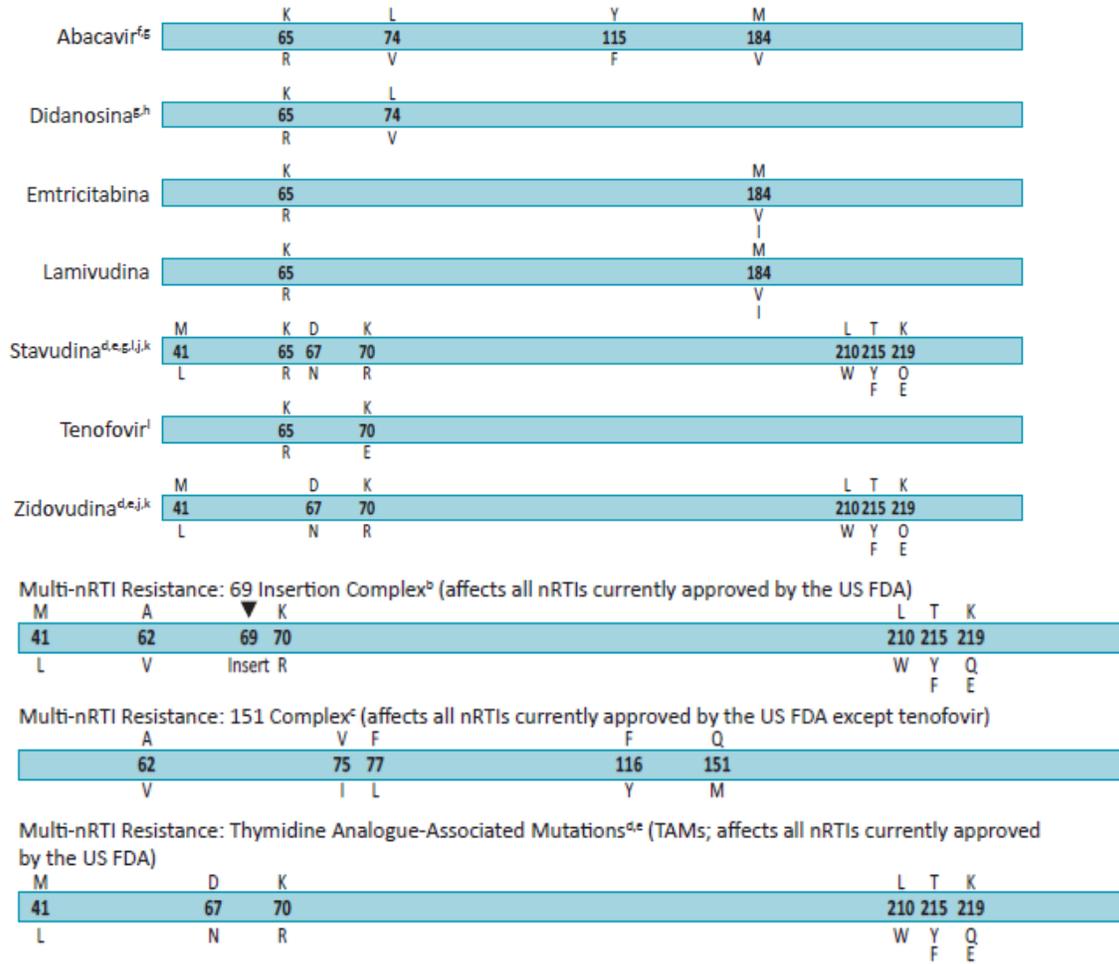


Figura 1.13 Mutaciones mayores de resistencia a NRTIs. Se muestran los cambios relacionados con niveles importantes de resistencia a cada uno de los fármacos indicados. Además, se ha observado que la multi resistencia se establece mediante dos vías la primera de ellas una inserción en el codón 69 y la segunda por la mutación Q151M. Las mutaciones conocidas como TAMs afectan la susceptibilidad ante todos los NNRTIs aprobados actualmente. Tomada de [31].

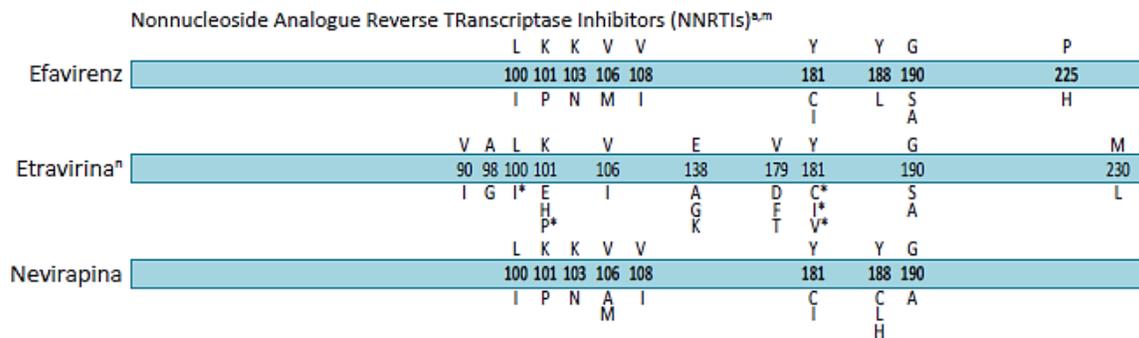


Figura 1.14. Mutaciones de resistencia a NNRTIs. La posición 138 es la más polimórfica, y se han identificado tres cambios que confieren alto nivel de resistencia, siendo E138K el más

frecuente. Los cambios mostrados en la figura son aquellos que tiene el mayor impacto clínico sobre el NNRTI correspondiente. Tomada de [31].

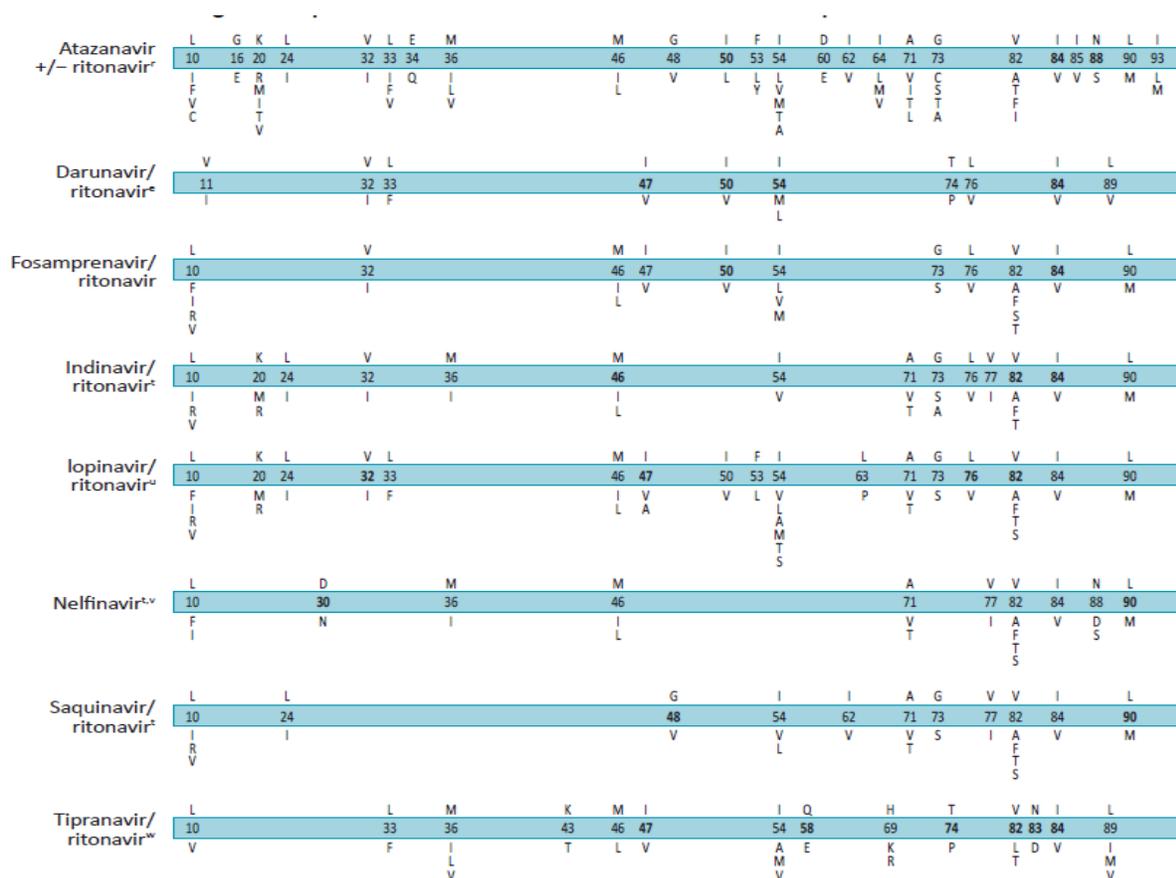


Figura 1.1.5. Mutaciones mayores de resistencia a PIIs. Se muestran los cambios que confieren altos niveles de resistencia al inhibidor de proteasa correspondiente, ya sea por inhibición directa de la enzima o por una inhibición alostérica. Tomada de [31]

1.4.3 RESISTENCIA TRANSMITIDA A ARVs (TDR)

El TARA ha cambiado radicalmente el desenlace clínico de la infección por VIH. En los últimos 5 a 10 años, la mayoría de los gobiernos de los países latinoamericanos y del Caribe, han hecho esfuerzos por implementar programas de acceso al TAR a todos los que lo requieren. Debido a que esta estrategia representa una ventaja en el aspecto costo-beneficio, además de ser la más visible de entre las respuestas de los gobiernos hacia la epidemia, el acceso universal al tratamiento ARV se ha convertido en la meta prioritaria de la mayoría de los países de la región, descuidándose puntos como el acceso universal a la

atención médica, la implementación de programas de prevención y el monitoreo de laboratorio de los pacientes en tratamiento [32].

En países donde se ha logrado la universalidad del TAR, se ha registrado una notable disminución en la morbilidad y la mortalidad asociadas al virus. Sin embargo, también ha llevado a la transmisión de variantes con susceptibilidad reducida a fármacos ARV. Se han registrado casos de infección con VIH resistente a uno o más fármacos ARV por cada una de las vías de transmisión conocidas para el virus [33].

La transmisión de variantes resistentes es preocupante pues contribuye a la reducción de la eficacia de los regímenes de tratamiento al no lograrse supresión completa de la replicación viral. Esta supresión incompleta puede causar a su vez el desarrollo de resistencia más amplia, comprometiendo regímenes terapéuticos subsecuentes [34].

Estudios epidemiológicos permiten estimar la proporción de pacientes infectados con VIH que presentan alguna variante resistente a ARVs antes de ser expuestos a ellos o durante su manejo farmacológico. Gracias a estos estudios se ha observado que la frecuencia de estas mutaciones de resistencia transmitida es relativamente alta en países desarrollados, muchas veces con tendencias de aumento. Por el contrario, en países en vías de desarrollo, en los que la terapia antirretroviral se introdujo posteriormente, las frecuencias de resistencia transmitida tienden a ser menores; sin embargo, es característica la escasez de información sobre este tema [35].

Así, vigilar la presencia de mutaciones de resistencia en virus aislados de pacientes sin exposición previa a fármacos ARV es una preocupación importante para el manejo de la infección por VIH tanto a nivel individual como a nivel poblacional.

1.4.4 PANORAMA DE RESISTENCIA TRANSMITIDA.

Un estudio reciente en México (1655 pacientes) ha permitido estimar una resistencia poblacional de 7.4%, siendo los NRTIs los medicamentos hacia los que se disminuye la susceptibilidad con mayor frecuencia (4.2% de los pacientes incluidos). Los principales mecanismos por los que se ha detectado que surgen virus resistentes a NRTIs son TAMs (M41L, L210W y T215F/Y) cuyo efecto es acumulativo y causan resistencia cruzada. La resistencia a NNRTIs deriva del desarrollo de mutaciones como K101QE, K103R Y V179D. Además, están presentes dos mutaciones importantes aunque de baja frecuencia, M184V para NRTIs y K103N para NNRTIs. En el caso de los IP, existen mutaciones primarias particulares para cada uno de ellos, con algunas excepciones como aquellas en las posiciones 46, 82, 84 y 90 que son comunes a todos los IP de primera generación. L90M parece ser altamente prevalente en nuestra población, seguida de M46I [36].

Estudios en otras poblaciones muestran comportamientos dispares al observado en pacientes mexicanos. En Japón, un estudio de 2573 pacientes diagnosticados entre 2003 y 2008 estimó resistencia mayoritaria a NRTIs (3.7 - 5.9%) resultado de los cambios M184V/I y revertantes de T215. A Inhibidores de Proteasa la resistencia fue del 2.5%, mediada por M46I/L y finalmente muy pocos individuos registraron resistencia a NNRTIs (0.8%), la mayoría por K103N [37]. Por otro lado, Wheeler y cols. estudiaron a 1997 pacientes estadounidenses, de los cuales el 14.6% presentó mutaciones asociadas a resistencia, 7.8% de ellos tuvieron un genotipo resistente a NNRTIs, 5.6% a NRTIs y 4.5% a PIs. Las mutaciones más prevalentes fueron K103N, M41L y L90M para NNRTIs, NRTIs y PIs respectivamente [38].

Los estudios mencionados hacen evidente la disparidad en los patrones de resistencia a diferentes ARVs entre poblaciones. Este fenómeno se ve altamente favorecido por las políticas de uso de los fármacos ARV, de las características del manejo de la infección por VIH, incluyendo el seguimiento clínico de los pacientes bajo tratamiento, los programas de educación de médicos y pacientes y la

promoción de adherencia al tratamiento que es variable de país a país. Sin embargo, la influencia de características inmuno-genéticas propias del grupo étnico y/o ubicación geográfica no puede ser descartada.

1.4.5 RESISTENCIA A INHIBIDORES DE INTEGRASA

A pesar del uso limitado de Raltegravir y la aún carente práctica clínica con Elvitegravir, ya se han encontrado poco más de 47 mutaciones relacionadas en cierto grado con resistencia a estos fármacos. Las once posiciones donde se presentan cambios asociados al menos a resistencia de bajo nivel, es decir, donde la reducción de la susceptibilidad del virus a INSTIs es inminente, se muestran en la **figura 1.13**.

Para el primero de los inhibidores de IN se han descrito tres vías mutacionales principales: Q148R/H/K, N155H y Y143R/C/H [24, 26, 30, 39-41]. La presencia de estos cambios en el genoma viral genera una notable disminución en la susceptibilidad a los medicamentos, no obstante, es evidente una reducción en el fitness.

Cada una de estas mutaciones ha sido asociada a cambios secundarios que exacerbaban el fenotipo resistente del virus o compensan la reducción en la capacidad replicativa viral que el cambio primario representa. N155H se ha asociado típicamente con E92Q, aunque esta última mutación puede estar presente también de manera independiente disminuyendo la susceptibilidad a RAL. Por su parte, Q148R/H/K se encuentra comúnmente acompañada de G140S/A o E138K [39-43].

La presencia de cualquiera de estos cambios tiene un efecto importante en la susceptibilidad del virus ante ambos INSTIs, sin embargo, tres de estas mutaciones son las principales vías de generación de resistencia: Y143R/H/C, Q148K/R/H y N155H/S. Cualquiera de estos cambios aumenta significativamente la persistencia de la replicación viral aun en ambientes saturados de medicamento; sin embargo, la tasa de multiplicación se reduce de manera importante.

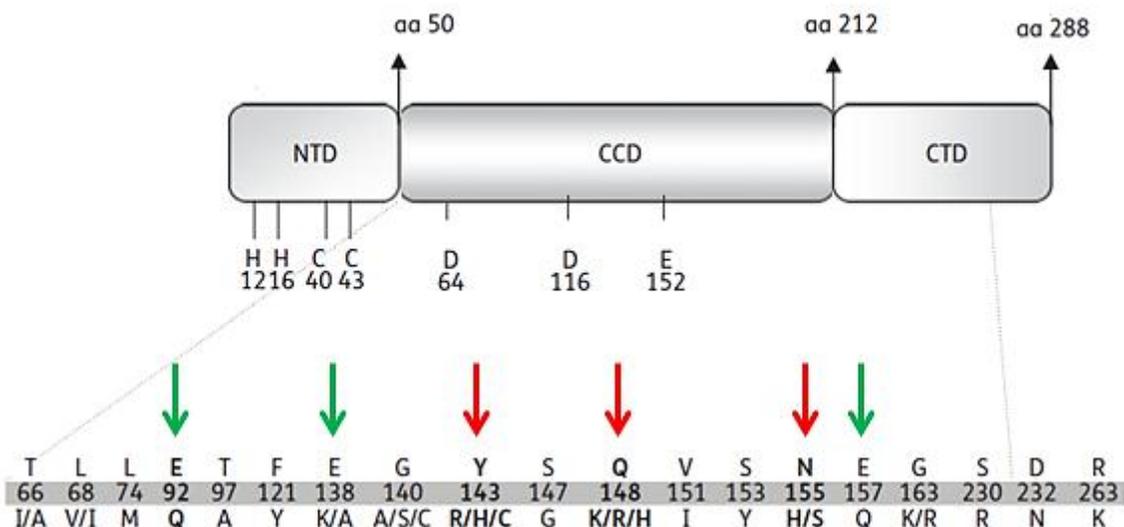


Figura 1.13. Mutaciones mayores de resistencia a Inhibidores de Integrasa. Se han reportado 11 mutaciones que confieren al virus que porta cualquiera de ellas al menos un nivel de baja resistencia ante cualquiera de los dos inhibidores de Integrasa. Todas están localizadas en el dominio catalítico de la enzima; las mutaciones en las posiciones 143, 148 y 155, señaladas con flechas rojas, confieren un alto nivel de resistencia y tienen un impacto directo en el fitness viral. Mutaciones en las posiciones 92, 138 y 157, flechas verdes, han cobrado importancia por el efecto simple de su aparición y por su asociación con mutaciones mayores que exacerban el efecto fenotípico resistente. Tomado de [44]

Algunos estudios sugieren un patrón “evolutivo” entre las tres vías: se ha observado que pacientes con falla virológica temprana portadores de N155H tienden a presentar un “switch” en la población viral resistente hacia un genotipo Q148R/H. Estudios adicionales han mostrado también una evolución de N155H a Y143R en sujetos con supresión virológica incompleta [26, 40, 45-47].

Dado el costo que tiene la aparición de estos cambios sobre la replicación viral, se ha estudiado una tendencia contundente a la aparición de mutaciones compensatorias, es decir, cambios que permiten al virus recuperar e incluso mejorar su fitness [40, 44, 48, 49]. Las asociaciones, o patrones mutacionales reportados hasta ahora son:

Y143R/H/C + T97A	N155H/S + E92Q
Q148 K/R/H + G140S/A	+ L74M
+ E138K	+ G163R

Cabe destacar que las mutaciones E92Q y E138K pueden aparecer también de manera independiente, confiriendo resistencia de intermedia a baja.

En el caso de la primera asociación se ha observado que la replicación viral llega a incrementarse hasta 140%, el perfil de N155 aumenta un 63% y cualquiera de las asociaciones de Q148 permite la recuperación del fitness a un nivel basal, i.e. al del virus antes de cualquier cambio.

Adicionalmente, para EVG se han identificado los cambios T66I y S147G como mutaciones relevantes para el desarrollo de resistencia [24, 26, 41, 42]. Para este compuesto no se han identificado combinaciones que modifiquen el fenotipo de resistencia.

Numerosas mutaciones secundarias y polimorfismos naturales asociados a resistencia ante RAL Y EVG se han descrito, entre ellos: H51Y, T66A/K, Q95K/R, S119R/G, E138K, S153Y K160N, G163K/R, S230R/N y V72I, L74M/I, T97A/S, V151I, M154I/L, E157Q, V165I, V201I, I203M, T206S, respectivamente [24, 26, 30, 41, 42, 50].

A pesar del conocimiento que se ha desarrollado sobre la generación de virus resistentes, la frecuencia de virus resistentes en poblaciones no expuestas a estos ARV es muy baja, numerosos ensayos clínicos [49] y estudios epidemiológicos en USA[40, 42], Italia [41, 50], Francia [43] y Alemania [48] han demostrado que las mutaciones de resistencia mayor para RAL se encuentran en prevalencias $\leq 1\%$ y para EVG en un máximo de 0.8% de los pacientes estudiados. En el caso de los polimorfismos, los de mayor aparición en varias de estas poblaciones son V72I, V201I y T206S.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El fenómeno de resistencia transmitida a ARVs es preocupante por comprometer la efectividad del tratamiento antirretroviral de primera línea, y obliga a los sistemas de salud a una optimización constante de los esquemas de manejo terapéutico. El desarrollo de nuevas moléculas, como los inhibidores de Integrasa, ha representado una alternativa para aquellos pacientes con falla virológica temprana y/o multi resistencia. A pesar de ello, la aparición de virus resistentes a Raltegravir y Elvitegravir ha forzado el desarrollo de moléculas de segunda generación con el mismo blanco terapéutico, aun en fases tempranas de prueba.

Vigilar la presencia de mutaciones de resistencia en virus aislados de pacientes sin exposición previa a fármacos ARV es una medida importante para el manejo de la infección por VIH tanto a nivel individual como a nivel poblacional. La información recolectada a través de pruebas de resistencia a fármacos ARV ayuda a informar y, en su caso mejorar con bases moleculares sólidas, las guías de tratamiento ARV aplicables a nivel regional; así como a identificar deficiencias potenciales en estrategias de prevención y seguimiento clínico de los individuos infectados.

El conocimiento sobre resistencia en virus circulantes en individuos no expuestos a ARVs también ayuda al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas y respalda a las guías de tratamiento que recomiendan la realización de pruebas de resistencia antes del inicio del TAR para una mejor elección de los regímenes de primera línea.

Asimismo, la transmisión de virus resistentes podría indicar que algunos individuos continúan teniendo conductas de riesgo para la transmisión del virus aun conociendo su estatus de seropositividad, lo cual tendría implicaciones en los esfuerzos de prevención centrados en estrategias conductuales y TAR.

El establecimiento de un sistema de vigilancia de farmacorresistencia en el virus circulante en nuestra población podría ayudar a identificar estas fallas potenciales y proveer oportunidades para mejorar los programas de prevención. Aunque existe información previa sobre la prevalencia y tendencias de la TDR hacia NRTIs, NNRTIs y PIs en México, la frecuencia y posibles patrones mutacionales de la resistencia a fármacos inhibidores de Integrasa es desconocida en el país. Es por ello que nuestro grupo de investigación se dio a la tarea de generar una estadística sobre la frecuencia y patrones de estas mutaciones de resistencia en la población mexicana.

3. HIPÓTESIS

Dado el uso reciente y altamente restringido de los inhibidores de Integrasa en México, se espera que la frecuencia de mutaciones asociadas a resistencia a esta familia de fármacos antirretrovirales en virus circulantes en nuestro país sea menor del 2%, correlacionando con los reportes que respaldan la baja incidencia de resistencia a INSTIs en diversas poblaciones.

En caso de que se identifiquen mutaciones de resistencia, y considerando que la presión selectiva farmacológica no está presente, deberá estudiarse la influencia de otras presiones selectivas como factores inmunes del hospedero, características evolutivas del virus o fenómenos geográficos en la aparición de dichos cambios.

4. OBJETIVOS

General

Determinar la frecuencia de mutaciones asociadas a resistencia a inhibidores de Integrasa (RAL y EVG) en VIH circulante entre la población mexicana.

Particulares

- Purificar el ARN del VIH libre en plasma en una cohorte de individuos mexicanos infectados provenientes de diversas regiones de la República Mexicana, sin previa exposición a fármacos ARV.
- Amplificar mediante PCR anidada el gen de la IN de los virus de cada uno de los individuos participantes. Y obtener la secuencia codificante de la enzima.
- Identificar mutaciones primarias y secundarias asociadas a resistencia a inhibidores de Integrasa (INSTIs) en los pacientes analizados y determinar su frecuencia.
- Identificar los polimorfismos de IN más prevalentes en la población mexicana.
- Asociar, en caso de existir, las mutaciones o polimorfismos con fenómenos de presión selectiva inmune y geográfica de la cohorte.
- Analizar la relación filogenética de los virus estudiados.

5. TÉCNICA

5.1 SELECCIÓN DE PACIENTES

Se seleccionaron de manera aleatoria 100 muestras de plasma de pacientes de la Cohorte de Epidemiología Molecular y Evolución del VIH en México del Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIENI) del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER).

Los criterios de inclusión para los pacientes participantes fueron tener infección documentada por VIH y ser vírgenes a Tratamiento Antirretroviral, incluyendo cualquier familia de fármacos.

El reclutamiento de pacientes para la cohorte de Epidemiología se realizó de 2005 a 2010, con la participación de clínicas de VIH y centros de salud en 12 estados de la República. Cada paciente donó una muestra única de sangre a partir de la cual se realizaron los estudios rutinarios de determinación de carga viral plasmática y conteo de linfocitos T CD4+. Todas las muestras sanguíneas fueron enviadas a y procesadas en el CIENI del INER. Todos los pacientes participantes otorgaron consentimiento escrito para la donación de muestras sanguíneas y el protocolo de investigación fue evaluado y aprobado por el Comité de Ciencia y Bioética del INER.

5.2 EXTRACCIÓN DE ARN

A partir de cada una de las muestras de plasma se realizó la extracción de ARN viral con los reactivos de QIAamp Viral RNA Mini kit (QIAGEN, Valencia CA), de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Brevemente, para esta técnica se centrifugaron alícuotas de 1 mL de plasma, para concentrar al virus. Mediante el uso de una solución de lisis altamente desnaturizante de tiocianato de guanidina se realizó la lisis viral y la liberación del ARN. Posteriormente se colocó la muestra en una columna de sílice permitiendo la unión del ácido nucleico viral a la membrana de la columna; ésta se lavó en dos ocasiones con distintas soluciones

amortiguadoras para eliminar contaminantes y finalmente, se eluyó el ARN puro con una solución de baja fuerza iónica.

5.3 AMPLIFICACIÓN

Se utilizó la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) anidada para amplificar un fragmento de 2428 pb del gen *pol*, que comprendía una porción de la enzima Transcriptasa Inversa (RT) incluido el dominio ARNasa H y la enzima Integrasa completa.

Esta técnica supone dos rondas de amplificación: Para la primera de ellas (amplificación externa) se usó como “primer sentido” MW1 - CCACAGGGATGGAAAGGATCACC (Posiciones 2997 a 3019 en virus de referencia HXB2) y como “primer antisentido” MW2rev - CTGGGGCTTGTTCCATCTATCCTCT (5550 a 5574). Para la amplificación interna fueron usados los primers MW3 - TATGTAGGATCTGACTTAGAAATAGGG (3111 a 3137) y MW4rev - TAACACTAGGCAAAGGTGGCTT (5518 a 5539).

Los reactivos utilizados para esta técnica fueron One Step RT-PCR Kit (QIAGEN, Valencia CA) y SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq ADN Polymerase (INVITROGEN, Carlsbad CA) para la primera y segunda ronda de amplificación, respectivamente.

La preparación para ambas rondas de amplificación se realizó con las siguientes concentraciones de cada reactivo:

- Ronda de amplificación externa
 - H₂O 11.5 µL
 - Buffer 5X QIAGEN RT-PCR 5 µL
 - dNTP (10 mM) 1 µL
 - Primer sentido (20 µM) (MW1) 0.75 µL
 - Primer antisentido (20 µM) (MW2rev) 0.75 µL
 - Enzima RT/Taq 1 µL

- Ronda de amplificación interna:
 - H₂O 18 µL
 - Buffer 10X 2.5 µL
 - MgCl₂ (50 mM) 0.75 µL
 - dNTP (10 mM) 0.5 µL
 - Primer sentido (20 µM) (MW3) 0.25 µL
 - Primer antisentido (20 µM) (Mw4rev) 0.25 µL
 - Enzima 0.25 µL

El protocolo de la primera amplificación inició con 30 min a 45° C y 15 min a 95°C, seguido de 35 ciclos de 10s a 94°C, 30 s a 50°C y 2.5 min a 68°C; finalmente, 10 min a 68°. Para la segunda ronda, el inicio de la reacción fue de 2 min a 94°C, posteriormente 35 ciclos de 30 s a 94°C, 30 sec a 55°C, 2.5 min a 72°C y la elongación final fue de 5 min a 72°C.

5.4 ELECTROFORESIS Y PURIFICACIÓN

Para comprobar la amplificación del fragmento deseado, se utilizó una electroforesis en gel de Agarosa al 1%. Se purificaron aquellos amplicones que mostraron una banda ligeramente por arriba de las 2000 pb (**Figura 5.1**), usando el material de QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Valencia CA), de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Brevemente, el kit está compuesto de columnas con una membrana de sílice que permite la adsorción del ADN en presencia de una solución saturada de sales y un pH cercano a 7.5. Una vez lavada la membrana para eliminar contaminantes de la PCR como primers, enzima o nucleótidos no incorporados, se eluyó el ADN en condiciones de poca saturación de sales y un pH alcalino (8.5) con una solución de Tris.

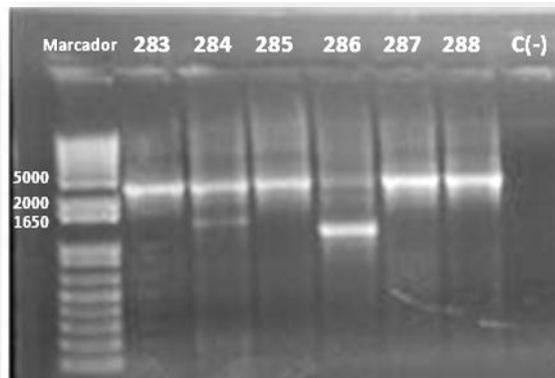


Figura 5.1. Ejemplo de un gel de Agarosa obtenido durante el estudio. Los fragmentos considerados positivos fueron aquellos que aparecían ligeramente por arriba de 2000 pb, en cada gel se utilizó un control negativo.

5.5 SECUENCIACIÓN

El producto purificado fue sometido a secuenciación automática, basada en la técnica Sanger. Este procedimiento permite la generación de fragmentos de ADN de distintas longitudes tomando como molde una cadena sencilla de ADN de interés. Los fragmentos se van formando por la unión de desoxinucleótidos (dNTPs) mediante un enlace fosfodiéster entre el extremo 3'-OH de uno y el extremo 5'-P de otro. A la reacción también se añade una cantidad mínima de dideoxinucleótidos (ddNTP) que están marcados con un fluorocromo y carecen del grupo OH; de este modo, los ddNTPs limitan la elongación de la cadena y van dejando una marca en el extremo de cada fragmento. El equipo automatizado hace pasar los fragmentos por un capilar en orden creciente de tamaño (electroforesis capilar) y hace incidir un láser sobre cada fragmento, de esta manera, va registrando el nucleótido del extremo de cada cadena y formando la secuencia del fragmento original de interés.

Para este procedimiento se usaron ocho primers que aseguraban obtener al menos dos secuencias a lo largo de toda la región de interés. Los primers sentido usados fueron MW3 (3111 a 3137), AV59 (3545 a 3562), INPCRA (4176 a 4196), INSEQ3 (4473 a 4494), INSEQ4 (4738 a 4757); mientras que los antisentido se identificaron como INSEQ1rev (4727 a 4748), INPCRBrev (5120 a 5139) y MW4rev (5518 a 5539). Las reacciones de secuenciación se realizaron

empleando la química BigDye terminator v. 3.1 (Applied Biosystems, Carlsbad CA) en las siguientes proporciones:

Big Dye v3.1	4 uL
Oil Buffer 5X	2 uL
Primer (2uM)	2 uL
DNA (Diluido 1:5)	2 uL

El protocolo de la PCR de secuenciación inició con 1 min a 96°C, y posteriormente 25 ciclos de 10 s a 96°C, 5 s a 50°C y finalmente 4 min a 60°C.

Se utilizó el secuenciador capilar automático Hitachi 3730xl ADN Analyzer (Applied Biosystems, Carlsbad CA) para obtener el arreglo de bases mediante la técnica antes descrita. Una vez obtenidas las secuencias, éstas se ensamblaron usando el software Geneious 5.3.4 para obtener una sola secuencia consenso para cada paciente participante, que fue editada para analizar únicamente la región correspondiente a Integrasa (864 pb), de interés en el presente estudio.

5.6 SUBTIPIFICACIÓN

Las secuencias de los pacientes participantes se introdujeron al programa REGA de la Base de Datos de Resistencia de VIH de la Universidad de Stanford, disponible en línea (<http://hivdb.stanford.edu/>), para obtener el subtipo viral al que correspondían. Para la subtipificación, el programa comparó la secuencia problema con secuencias consenso de 10 subtipos de VIH (A-K) y algunas formas recombinantes hasta encontrar la de mayor coincidencia.

Aquellas secuencias que coincidieron con más de un subtipo viral, se sometieron a un análisis de recombinación con la herramienta RIP disponible en la Base de datos de Los Alamos (<http://www.hiv.lanl.gov>). Esta aplicación compara la secuencia del virus del paciente con las secuencias consenso de los subtipos A1, A2, B, C, D, F1, F2, G, H, J, K y CRF01, graficando el porcentaje de similitud entre cada secuencia consenso y la secuencia problema, para cada nucleótido. La

confianza de los resultados de esta aplicación está basada en el uso de algoritmos informáticos como el cálculo de la distancia de Hamming.

5.7 ANÁLISIS DE MUTACIONES DE RESISTENCIA

Se utilizó el programa HIVdb de la Base de Datos de Resistencia de VIH de la Universidad de Stanford (<http://hivdb.stanford.edu/>) para determinar la presencia de mutaciones asociadas a resistencia en las secuencias virales del gen de la Integrasa bajo estudio. Se buscaron mutaciones relacionadas con resistencia ante los dos principales fármacos Inhibidores de Integrasa, RAL y EVG.

Las mutaciones fueron clasificadas por el software como i) Mutaciones Mayores, (Cuya presencia individual esta relacionadas con resistencia *in vivo* o *in vitro*), ii) Mutaciones Menores (Requieren asociarse entre ellas o con una mutación mayor para conferir resistencia) y iii) Otras mutaciones (En este rubro se dividieron los polimorfismos en aquellos cambios no relacionados con resistencia o propios de otros subtipos virales y polimorfismos que han sido encontrados en pacientes con falla a RAL aunque no alteran la susceptibilidad del virus al medicamento, estos podrían estar asociados a resistencia).

Para la interpretación de la resistencia genotípica, el algoritmo de la Base de Resistencia de VIH de la Universidad de Stanford asigna a cada mutación un puntaje para cada fármaco antirretroviral de interés basado en reportes de estudios *in vitro* con virus mutantes. En caso de presentarse más de una mutación asociado a resistencia, los puntajes de cada una se suman para dar un puntaje final. Los puntajes se interpretaron de la siguiente manera: 0-9: susceptible; 10-14 resistencia potencial de bajo nivel; 15-29: nivel bajo de resistencia; 30-59: nivel intermedio de resistencia; 60 o más: nivel alto de resistencia. Todas las muestras fueron analizadas con la última actualización disponible del algoritmo de Stanford (Versión 6.0.11).

5.8 PREDICCIÓN DE RESISTENCIA FENOTÍPICA

Para corroborar el efecto fenotípico de los cambios hallados en el genoma viral, se sometieron las secuencias a un análisis con el programa Geno2Pheno disponible

en línea (<http://www.geno2pheno.org/>). El programa posee una base de datos que correlaciona los reportes de mutaciones asociadas a resistencia y la evidencia de resistencia fenotípica de cada cambio, de este modo, analiza una secuencia problema y predice un nivel de resistencia fenotípica para los cambios importantes encontrados.

Los resultados arrojados por esta aplicación fueron comparados con la estimación de resistencia obtenida a partir del análisis realizado con la Base de Datos de la Universidad de Stanford. Las equivalencias en los resultados entre ambos programas son:

Geno2Pheno		HIVdb, Universidad de Stanford
Susceptible	→	Susceptible
Susceptibilidad reducida	→	Bajo nivel e intermedia
Resistente	→	Alto nivel

5.9 ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Con la ayuda del programa ClustalW del software Mega 5 [51] se realizó el alineamiento de las secuencias virales previamente obtenidas y se construyó un árbol filogenético para el análisis evolutivo, añadiendo las secuencias consenso del subtipo B y subtipo C obtenidas de la Base de datos de VIH de Los Alamos (<http://www.hiv.lanl.gov>). Para la construcción del árbol se utilizó el método Neighbor-Joining [52], calculando las distancias evolutivas con el modelo de dos parámetros de Kimura [53]. La significancia fue determinada mediante 1000 réplicas de bootstrap.

5.10 ANÁLISIS DE PRESIÓN SELECTIVA POR MODELO DE CODONES.

Usando el servidor Data Monkey (www.datamonkey.org) se sometió el alineamiento obtenido a un análisis de presión selectiva por determinación de razón de sustituciones sinónimas (dS) y no sinónimas (dN), utilizando el método SLAC (Single-Likelihood Ancestor Counting); el cual está basado en la

construcción de secuencias ancestrales sitio por sitio, utilizando métodos de máxima verosimilitud (maximum likelihood, ML), hasta obtener la de mayor congruencia, estimando valores de variación asociados a cada posición. Mediante el uso de esta herramienta se obtuvo una lista de posiciones en Integrasa donde la razón de sustituciones no sinónimas fue significativamente mayor a la de sustituciones sinónimas ($dN>dS$) ($p<0.05$), lo cual indica la influencia de algún fenómeno de presión selectiva.

5.11 ANALISIS DE PRESIÓN SELECTIVA MEDIADA POR HLA.

Se utilizó la Base de Datos de Inmunología de los Álamos (<http://www.hiv.lanl.gov/content/immunology>) para analizar el papel del sistema del Antígeno Leucocitario Humano (HLA) (quien define y restringe la respuesta de linfocitos T citotóxicos, CTL, CD8+) en la posible selección de mutaciones con impacto en la susceptibilidad a fármacos inhibidores de Integrasa en VIH circulante en México. Para ello, se localizó en un mapa de epítomos (**Figura 5.2**) la posición de la proteína Integrasa en la que se presentó una mutación de relevancia clínica, buscando posibles alelos HLA que pudieran ejercer presión selectiva sobre dicha posición de acuerdo a epítomos previamente comprobados experimentalmente. Utilizando datos obtenidos previamente de la Base de Datos de Epidemiología Molecular y Evolución del CIENI, se buscó una correlación entre dicha información y el haplotipo HLA de cada paciente estudiado.

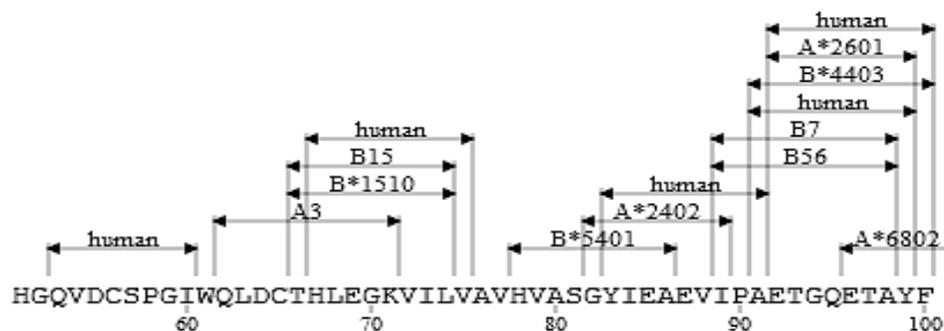


Figura 5.2. Mapa de epítomos de linfocitos T citotóxicos en la enzima Integrasa de VIH. Se muestran los aminoácidos de la posición 51 a 100 de la proteína Integrasa. Las flechas delimitan el epítomo correspondiente a distintos alelos HLA, los cuales se muestran por encima de la línea. Todos los epítomos mostrados han sido previamente comprobados experimentalmente.

6. RESULTADOS

6.1 CARACTERÍSTICAS DE LA COHORTE

Para este estudio se utilizaron muestras sanguíneas de 100 pacientes mexicanos con infección por VIH pertenecientes a la cohorte de Epidemiología Molecular y Evolución del VIH en México del CIENI. Los pacientes tuvieron en promedio 31 años de edad y en su mayoría fueron varones (**Tabla 6.1**). Los individuos participantes presentaron una progresión típica de la infección por VIH, confirmado por los parámetros clínicos de carga viral y conteo de células de CD4+, cuyas medianas fueron 44,153 copias/mL y 318 cel/uL respectivamente. Todos los pacientes eran vírgenes a tratamiento con cualquier fármaco antirretroviral, incluyendo Inhibidores de Integrasa al momento de ser reclutados.

TABLA 6.1. Información demográfica y parámetros clínicos relevantes de los 100 pacientes incluidos en el estudio.

Género	
Femenino	19%
Masculino	81%
Promedio de edad	31 años (18 – 57)
Mediana de Carga Viral (CV)	44,153 copias/mL (156- 1,000,000)
Mediana de Cuenta de CD4+	314 células/uL (0 - 1099)

En cuanto a la distribución geográfica, los pacientes fueron procedentes de 12 estados de la república. El 45% de ellos pertenecientes a la zona sur del país, 31% a la zona central y 24% a la zona norte. El estado con más pacientes dentro del estudio fue Oaxaca con el 21%. La distribución global se muestra en la **Figura 6.1**.

Gracias a la herramienta REGA se identificó que el 99% de los pacientes fue portador de virus subtipo B, mientras que el 1% restante presentó una forma recombinante de los subtipos B y H, confirmado mediante el análisis con la aplicación RIP. Este paciente no presentó ningún comportamiento particular.

ZONA NORTE	
Baja California	
Sonora	24%
Nuevo León	
ZONA SUR	
Oaxaca	
Guerrero	45%
Chiapas	
ZONA CENTRO	
Ciudad de México	
Estado de México	
Puebla	
Morelos	31%
Veracruz	
Jalisco	

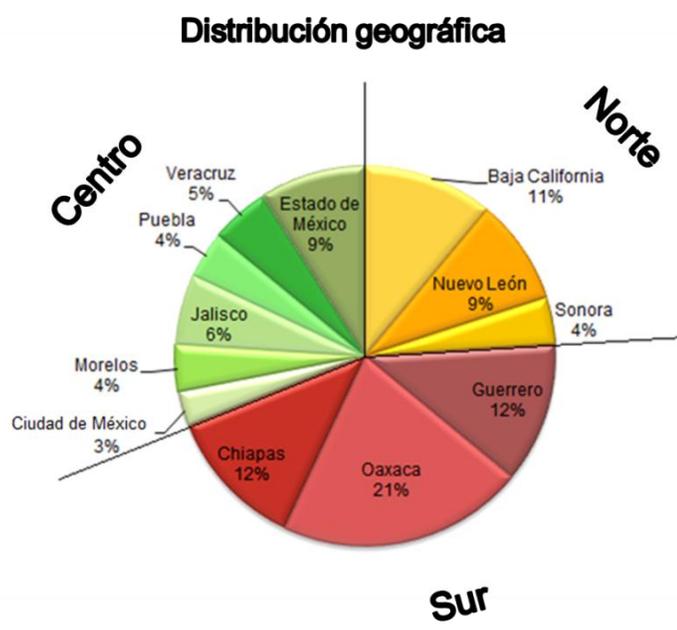


Figura 6.1. Distribución geográfica de los pacientes estudiados. Se muestra la residencia de los 100 pacientes incluidos en el estudio por estado y agrupados en regiones. La mayoría de los individuos participantes fueron provenientes de la zona Sur de la República Mexicana.

6.2 ANÁLISIS DE VARIABILIDAD EN IN

Mediante el programa HIVdb se realizó un análisis de cambios genéticos clasificados como polimorfismos naturales de la enzima IN. De los 288 amino ácidos que la componen, 175 presentaron al menos un polimorfismo (relacionado o no a resistencia). Por otro lado, el 55.9% (161 a.a.) de las 288 posiciones de la enzima presentó polimorfismos que podrían estar asociados a resistencia, siendo el dominio N-terminal (NTD) el que albergó la mayor cantidad de cambios (**Tabla 6.2**).

TABLA 6.2. Variabilidad genética de IN.

	Amino ácidos comprendidos	% de variación (aa variables/aa totales)	Posiciones más polimórficas
Dominio N-terminal (NTD)	1 – 49	81.6% (40/49)	E11 , L45
Dominio Catalítico (CCD)	50-212	51.9% (84/162)	T112 , S119, T125
Dominio C-terminal (CTD)	213-288	48.1% (37/77)	--

Se realizó una gráfica de todas las posiciones con algún cambio para determinar las posiciones más polimórficas (**Figura 6.2**). Se identificó al Ácido Glutámico de la posición 11 (E11) y Leucina en la posición 45 (L45) dentro del dominio N-terminal, como los más polimórficos con 8 y 5 variantes respectivamente. Dentro de los aminoácidos comprendidos en el dominio catalítico, las posiciones 112, 119 y 125 presentaron cinco variantes; mientras que dentro del dominio C-terminal no se observaron posiciones con más de tres polimorfismos. Todos los aminoácidos mencionados han sido encontrados en pacientes con falla a RAL.

De cada uno de los cambios identificados, se determinó su prevalencia en la cohorte estudiada (**Figura 6.3**). En el caso de aquellas posiciones con más de un polimorfismo, se utilizó al más prevalente para su inclusión en la gráfica. El análisis se centró en aquellas mutaciones que pudieran estar asociadas a resistencia. Se encontraron tres polimorfismos en el dominio N-terminal de IN con frecuencia superior al 15%, ocho en el dominio catalítico y dos en el extremo carboxilo-terminal.

En la **Figura 6.4** se muestran los polimorfismos más frecuentes (candidatos a asociarse con resistencia), el cambio Leucina ↔ Isoleucina en posición 101 (L101I) y Valina ↔ Isoleucina en posición 201 (V201I) fueron los de mayor frecuencia en la cohorte de pacientes con porcentajes de 59% y 52% respectivamente. Se detectó en numerosas ocasiones la variante G189X, donde X puede ser cualquier aminoácido, la inespecificidad del aminoácido sustituyente podría atribuirse a la presencia de bases ambiguas en este codón.

Para los polimorfismos presentes en al menos 15% de la cohorte estudiada se realizó el análisis de la naturaleza química de los aminoácidos sustituyentes y los silvestres. Únicamente se encontró divergencia en las posiciones 124 y 125 donde el cambio fue de un aminoácido polar (Treonina), a uno no polar (Alanina).

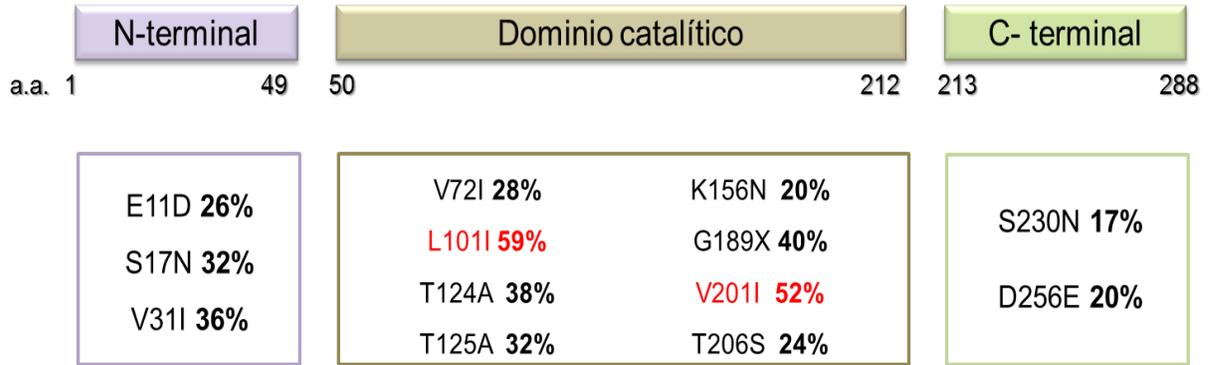
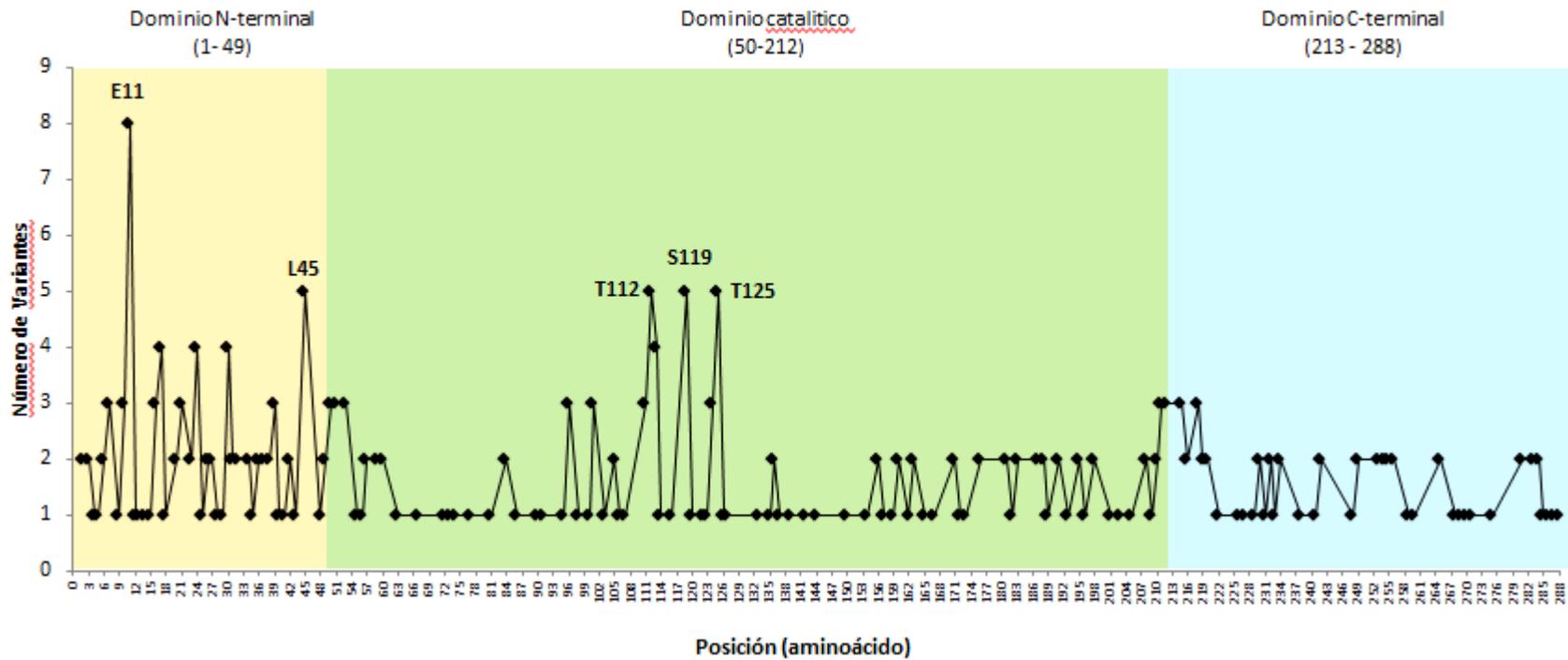


Figura 6.4. Análisis de polimorfismos en IN de virus circulantes en México. Se encontraron 13 polimorfismos con una frecuencia mínima de 15%. La región catalítica presentó los polimorfismos de mayor prevalencia, siendo los cambios L101I y V201I los más frecuentes.

Variación genética en IN



Posición	E11	L45	T112	S119	T125
Variantes	E11D E11I	L45V	T112I	S119P	T125A
	E11V E11L	L45Q	T112A	S119G	T125P
	E11A E11G	L45I	T112V	S119T	T125M
	E11F E11Q	L45K	T112R	S119R	T125V
		L45M	T112M		T125S

Figura 6.2. Número de polimorfismos por posición en la Integrasa de VIH de 100 individuos mexicanos. Se muestran aquellas posiciones en las que se registró al menos un polimorfismo. Para cada posición, se graficó el número de variantes encontradas, únicamente se muestran las etiquetas de aquellos aminoácidos con más de cinco variantes. Las posiciones 11,45, 112, 118 y 125 fueron las más polimórficas.

Frecuencia de polimorfismos en Integrasa

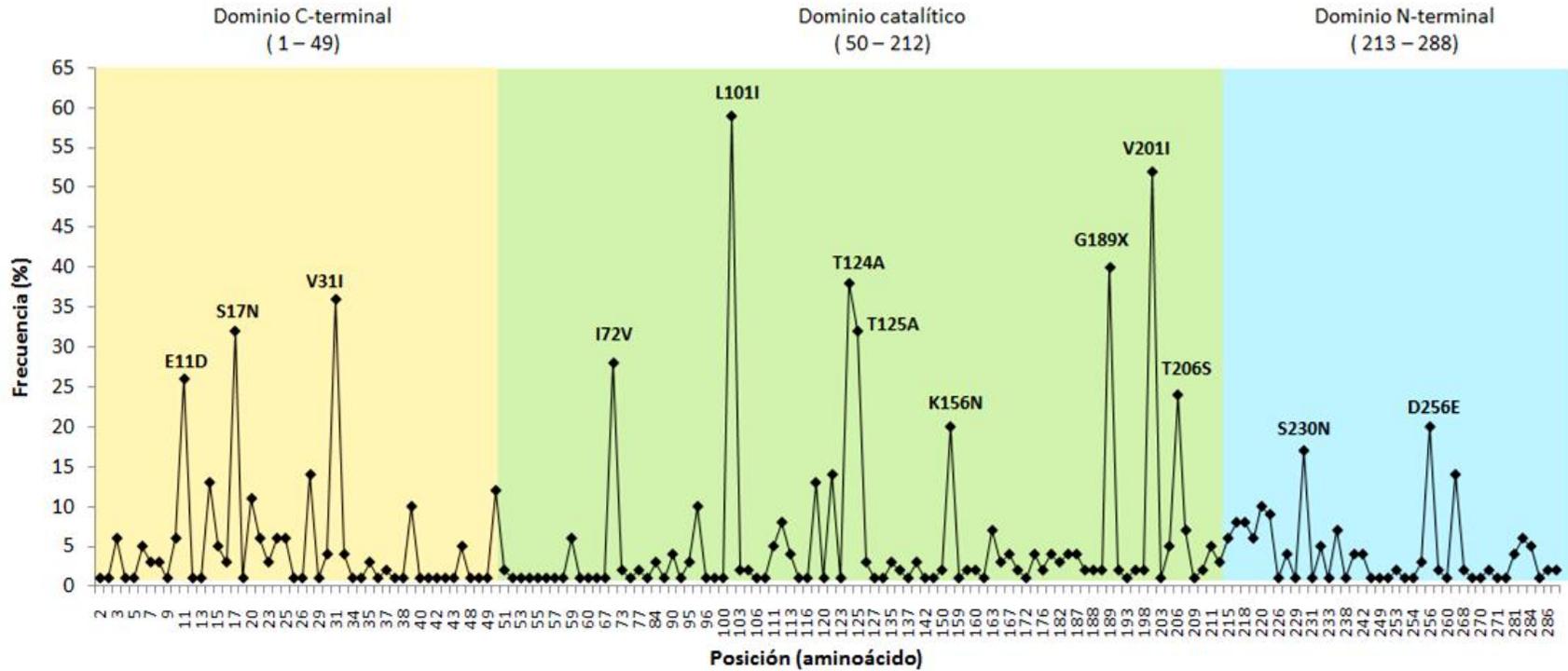


Figura 6.3. Frecuencia de polimorfismos por posición en la Integrasa de VIH de 100 individuos mexicanos. Se muestra la frecuencia (%) de cada polimorfismo registrado. Las etiquetas corresponden a polimorfismos con prevalencias superiores a 15%. En el dominio C-terminal el polimorfismo más frecuente fue V131I, en el dominio N-terminal D256E. En el centro catalítico estuvieron presentes los dos polimorfismos de mayor frecuencia global, L101I (59%) y V201I (52%).

6.3 ANÁLISIS DE RESISTENCIA A INHIBIDORES DE INTEGRASA EN VIH CIRCULANTE EN MÉXICO

Considerando exclusivamente las posiciones de IN con cambios considerados como mutaciones menores de resistencia, se detectó la presencia de 8 mutaciones dentro de IN en la cohorte mexicana. El cambio más común fue la sustitución en la posición 138 de Ácido Glutámico por Glicina o Ácido Aspártico (E138G/D), sin embargo, a esta mutación no se le asigna un puntaje de relevancia para resistencia en la Base de Datos de Stanford. Por otro lado, se observaron dos mutaciones que llamaron la atención por el puntaje que les confiere el algoritmo de Stanford para resistencia hacia RAL y EVG. El cambio E157Q (Glu ↔Gln), presente en el 2% de la población, fue asociado a una potencial resistencia de bajo nivel ante ambos inhibidores de Integrasa (Puntaje = 10), y la sustitución R263K (Arg ↔Lys), presente en un solo paciente, fue asociada a resistencia de bajo nivel ante EVG (Puntaje = 15). El virus del paciente que presentó la mutación R263K fue considerado como resistente hacia inhibidores de Integrasa para posteriores análisis (**Tabla 6.3**).

Tabla 6.3. Prevalencia de mutaciones de resistencia en población mexicana Y tipo de resistencia presente n=100

MUTACION	FRECUENCIA (%)	PUNTAJE EVG	RESISTENCIA EVG	PUNTAJE RAL	RESISTENCIA RAL
MUTACIONES MENORES					
V54I	5	0	S	0	S
Q95K	1	5	S	5	S
F121LP	2	0	S	0	S
E138GD	10	0	S	0	S
V151I	4	5	S	5	S
N155K	1	0	S	0	S
E157Q	2	10	PBN	10	PBN
R263K	1	15	BN	0	S
MUTACIONES MAYORES					
E92V	1	60	AN	30	I
E138K	2	15	BN	15	BN
Q148R	1	60	AN	60	AN
N155S	1	30	I	15	BN

S: Susceptible, **PBN**: Potencial de Bajo Nivel, **BN**: Bajo Nivel, **I**: Intermedio, **AN**: Alto Nivel

resistencia intermedia a EVG y resistencia de bajo nivel a RAL. Este cambio es una variante rara de la vía de resistencia N155H reportada en diversos estudios. Finalmente, dos individuos fueron portadores del cambio E138KA asociado con resistencia de bajo nivel a ambos inhibidores (**Tabla 6.3**). Cabe mencionar que los 5 cambios encontrados, clasificados como mutaciones mayores, recaen en el Dominio Catalítico de IN.

Los pacientes considerados en análisis subsecuentes fueron aquellos que presentaron un puntaje ≥ 15 , al menos resistencia de bajo nivel, para cualquiera de los dos, o ambos INSTIs. Así, el grupo se conformó por seis pacientes portadores de distintas mutaciones, a excepción de dos individuos que presentaron el cambio E138K provenientes de estados vecinos (Baja California y Sonora respectivamente) (**Figura 6.6**).

Distribución Geográfica de Mutaciones Mayores



Figura 6.6. Procedencia de los virus que presentaron mutaciones mayores a inhibidores de Integrasa. Se muestra la distribución geográfica de los pacientes con resistencia mayor. Cuatro de ellos se localizan en el sur de la República Mexicana, los dos restantes se localizan en estados vecinos del Noroeste de México y son portadores de la misma mutación E138K.

Existen asociaciones muy conservadas entre mutaciones mayores y ciertas mutaciones secundarias que aportan un efecto compensador al virus mutado (Q148R + G140S/E138K o N155H + L73M/E92Q /G163R). Extrañamente, ninguno de los sujetos de estudio presentó alguna de estas asociaciones. La información se muestra en la **Tabla 6.4**. Tampoco se identificó ninguna relación entre la resistencia conferida por cada mutación y los parámetros clínicos del paciente (carga viral y cuenta de CD4+).

TABLA 6.4. Información de los 6 pacientes con VIH resistente a inhibidores de Integrasa

Paciente	Procedencia	Mutación Mayor	Mutaciones Adicionales	CV (copias/mL)	CD4+ (cel/uL)
0284	Gro	N155S	E138G, V201I, T206S	106,480	13.81
0515	BC	E138K	M154IL, V201I	1,410	508.84
1087	Oax	E92V	E138D	22,498	386.04
1516	Méx	Q148R	V72I, V201I, T206S	103,837	324
1543	Son	E138K	M154IL, V201I, T206S	120,465	31
1315	Oax	R263K	V201I, S230NR, V72I	149,644	134.89

Gro: Guerrero, BC: Baja California, Oax: Oaxaca, Mex: Estado de México, Son: Sonora
CV: Carga viral, CD4+: Cuenta de linfocitos T CD4+

Para corroborar el impacto fenotípico de las mutaciones encontradas, asociadas genotípicamente a resistencia, se utilizó el programa Geno2Pheno. Los resultados se resumen en la **Tabla 6.5** y se comparan con el nivel de resistencia obtenido a partir de la aplicación HIVdb de la base de datos de la Universidad de Stanford.

Para la mayoría de las mutaciones analizadas se encontró una correlación entre las estimaciones hechas por ambos programas. Sin embargo, en el caso de la mutación E92V el programa HIVdb estima un nivel de resistencia mucho mayor que el algoritmo de análisis de Geno2Pheno; se debe tomar en cuenta que esta posición ha sido asociada a resistencia, pero el cambio específico E92V es una variante rara, por lo que no se cuenta aún con suficiente información. Esta discrepancia podría ser dilucidada por ensayos fenotípicos *in vitro* de resistencia con este virus mutante.

TABLA 6.5. Correlación genotípica y fenotípica de resistencia.

Mutación	Resistencia genotípica de acuerdo al programa HIVdb*		Estimación de resistencia fenotípica por Geno2Pheno	
	Raltegravir	Elvitegravir	Raltegravir	Elvitegravir
N155S	Intermedia	Bajo Nivel	Susceptible	Susceptibilidad reducida
E138K	Bajo Nivel	Bajo Nivel	Susceptibilidad reducida	Susceptibilidad reducida
E92V	Alto Nivel	Intermedia	Susceptible	Susceptible
Q148R	Alto Nivel	Alto Nivel	Resistente	Resistente
E138K	Bajo Nivel	Bajo Nivel	Susceptibilidad reducida	Susceptibilidad reducida
R263K	Susceptible	Bajo Nivel	Susceptible	Susceptible

Finalmente, el análisis de la distribución global de las mutaciones mayores y menores, en conjunto, coincidió con la distribución de los pacientes del estudio, descartando un fenómeno regional de resistencia. **(Figura 6.7).**

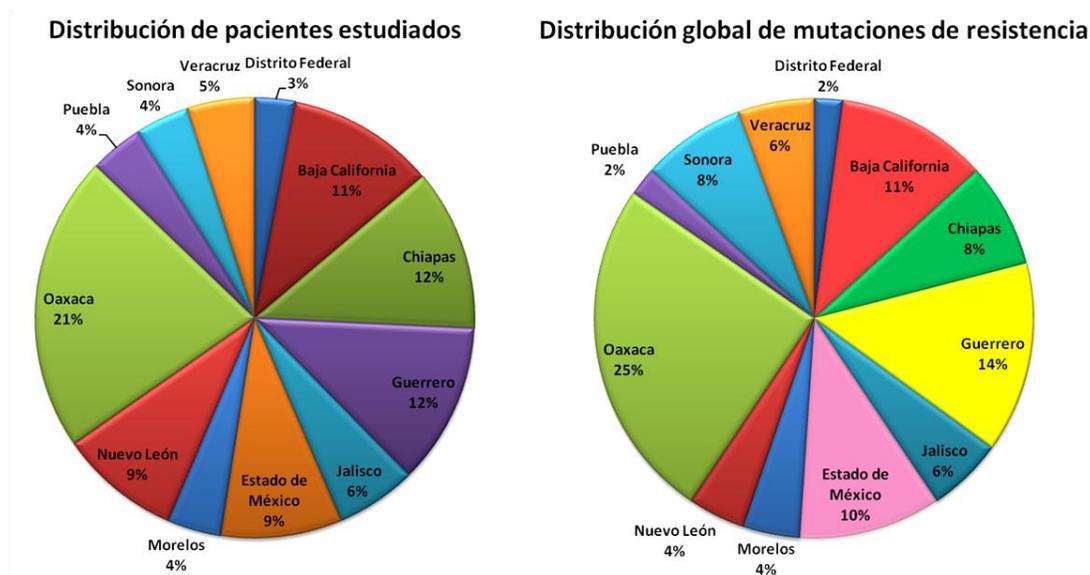


Figura 6.7. Correlación entre la distribución geográfica de los pacientes incluidos en el estudio y la procedencia de los virus con mutaciones de resistencia a inhibidores de Integrasa. Se muestra la distribución de los pacientes enrolados en el estudio y la distribución de las mutaciones mayores y menores de forma conjunta. Se observó correspondencia entre ambas características.

6.4 ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Se construyó un árbol filogenético para analizar las características evolutivas de los virus incluidos en el estudio, así como para determinar posibles clusters de diferenciación que pudieran dar información sobre la transmisión de virus con resistencia a inhibidores de Integrasa. De los seis cambios asociados con resistencia únicamente dos estuvieron relacionados filogenéticamente, con un bootstrap o valor relativo de confianza de 68, ambos pacientes presentaron la mutación E138K y aunque no provenían del mismo estado, si son procedentes de estados vecinos (**Figura 6.8**).

A pesar de la amplia distribución de los diversos polimorfismos asociados a resistencia a INSTIs, se localizaron pocos clusters o agrupamientos de secuencias relacionadas evolutivamente. En las figuras 6.7 y 6.8 se muestran únicamente las secuencias genéticamente relacionadas con bootstraps mayores a 50, es decir, aquellas en que la relación evolutiva tiene mínimo un 50% de confiabilidad, para los polimorfismos más abundantes.

El cambio L101I fue el más frecuente en la cohorte, pero únicamente se identificaron dos grupos de transmisión, ninguno mostró coincidencia geográfica entre los pacientes que lo componen (**Figura 6.9**).

Distribución filogenética de mutaciones mayores

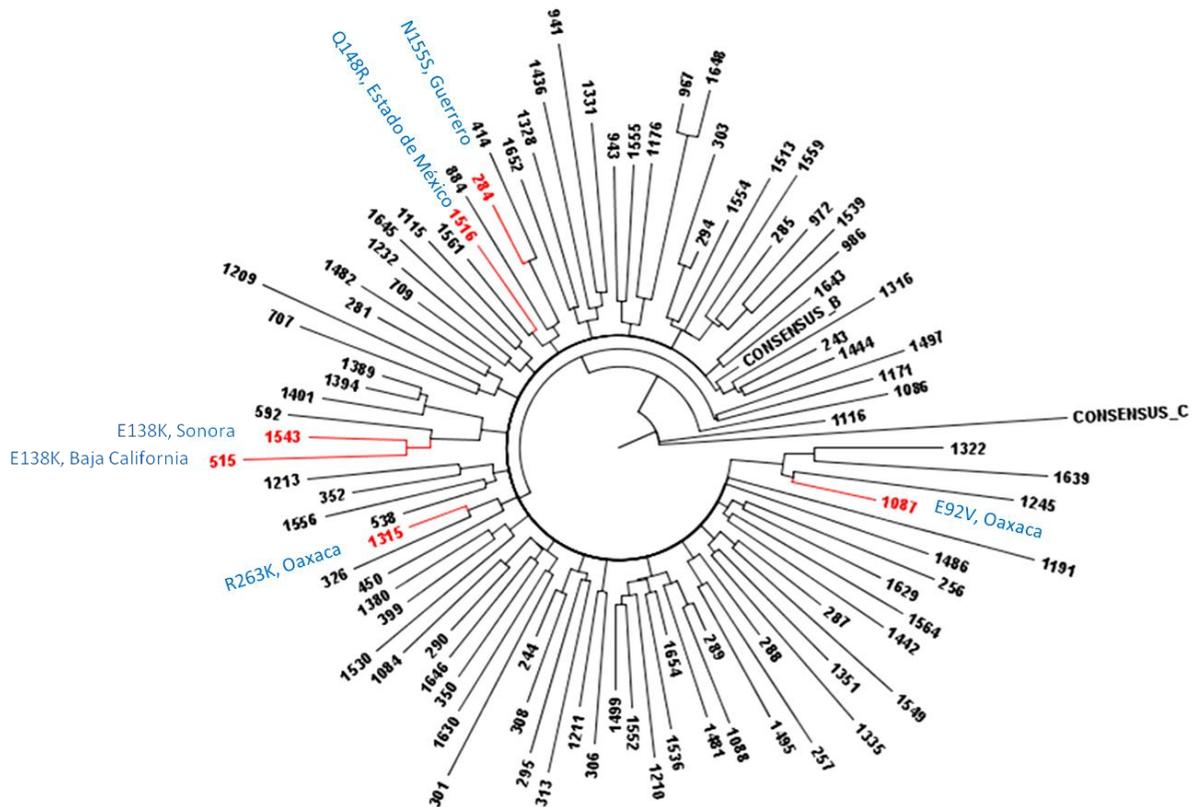


Figura 6.8. Análisis filogenético de pacientes resistentes. Se construyó un árbol filogenético de 95 secuencias, mediante el software MEGA 5 utilizando el método Neighbor-Joining, calculándose el valor de bootstrap a partir de 1000 réplicas. La distancia evolutiva se estimó con el método de Kimura 2-parámetros. Se resaltan las secuencias de virus portadores de mutaciones de resistencia. Las únicas secuencias con relación filogenética corresponden a los virus de los pacientes 515 y 1543, con un bootstrap de 67.

Distribución filogenética de L101I

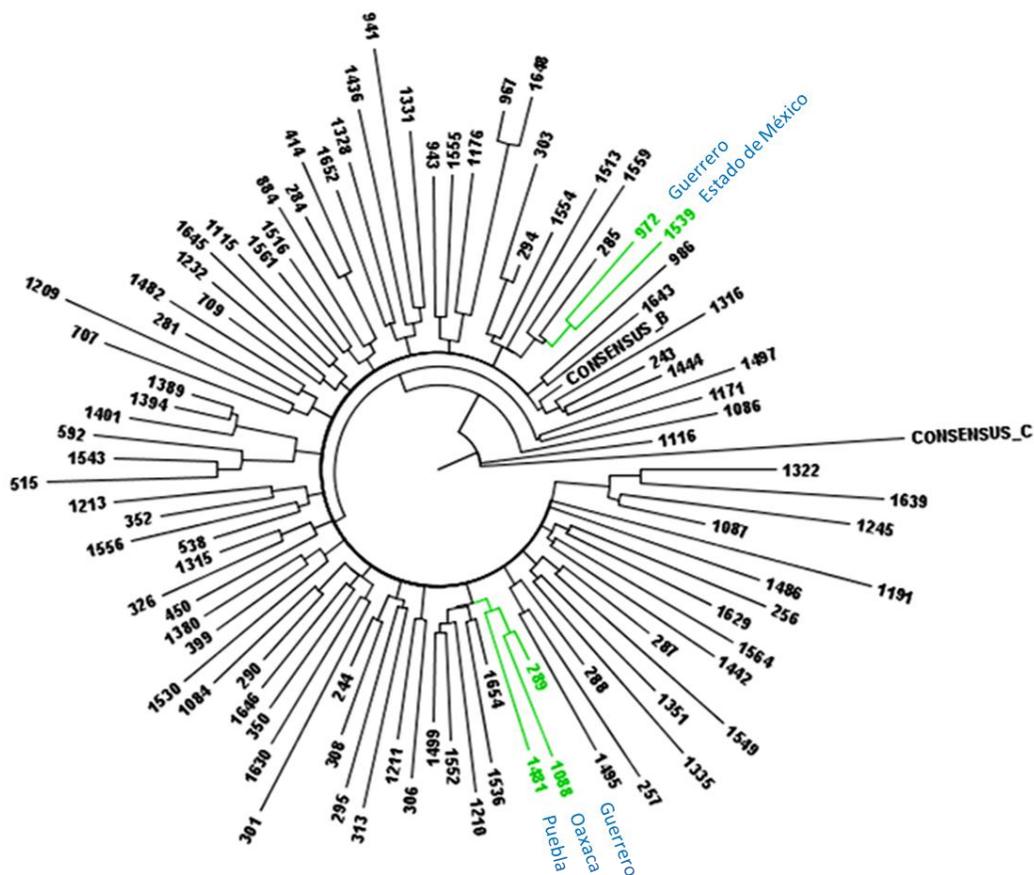


Figura 6.9. Análisis filogenético del polimorfismo L101I. Se construyó un árbol filogenético de 95 secuencias, mediante el software MEGA 5 utilizando el método Neighbor-Joining, calculándose el valor de bootstrap a partir de 1000 réplicas. La distancia evolutiva se estimó con el método de Kimura 2-parámetros. Únicamente se localizaron dos grupos de transmisión, uno de ellos con bootstrap de 76 compuesto por dos secuencias de los estados de Guerrero y Estado de México, y otro compuesto por tres secuencias de virus de pacientes provenientes de Puebla, Oaxaca y Guerrero con un bootstrap de 58.

En la **figura 6.10** se muestra la distribución de las secuencias con relación evolutiva de V201I. Se localizó un cluster compuesto por tres secuencias de virus de pacientes provenientes de Veracruz (bootstrap 96), esta asociación puede relacionarse con eventos de transmisión o un evento fundador del polimorfismo. Por otro lado, estuvieron presentes dos pares de secuencias relacionadas con coincidencia geográfica, los cuatro pacientes involucrados procedían de Guerrero, uno de los pares de transmisión mostró una relación de 91 (pacientes 414 y 284) y otro de 100 (pacientes 967 y 1648).

Adicionalmente se encontraron dos pares más de transmisión, uno de ellos entre las secuencias virales 1543 y 515 (bootstrap 67) y otro entre 1315 y 326 (bootstrap 50). No hubo coincidencia geográfica en ninguno de los casos.

Se localizaron grupos de transmisión para otras mutaciones menos frecuentes. En la **figura 6.11** se representan únicamente aquellas secuencias relacionadas con bootstrap superior a 50.

En primer lugar, se encontraron dos grupos de secuencias virales con relación evolutiva portadoras de un cambio en la posición 138. La mutación E138G/D está considerada como mutación menor o compensatoria y tuvo una frecuencia global de 10%. Esta mutación se encontró en virus con distintos grados de evolución. Los pacientes portadores de los virus relacionados fueron procedentes de estados del centro y sur del país sin coincidencia geográfica en los grupos de transmisión.

Analizando aquellos polimorfismos con frecuencias mayores a 15% (**Figura 6.4**), se encontraron dos secuencias portadoras del cambio V31I que corresponden a virus de pacientes provenientes de Guerrero. Por otro lado se identificó al grupo de pacientes provenientes de Veracruz (**Figura 6.10**) también como portadores del cambio T206S, mutación que estuvo presente también en los pacientes 592 y 1543 portadores de virus evolutivamente relacionados y provenientes del norte del país. Los pacientes 1315 y 326 fueron infectados por virus filogenéticamente cercanos, ambos, portadores de la sustitución S230NR.

Finalmente, el polimorfismo M154IL, encontrado únicamente en el 4% del a cohorte, estuvo presente en dos secuencias virales relacionadas, correspondientes a los pacientes 1543 y 515 provenientes de Sonora y Baja California respectivamente.

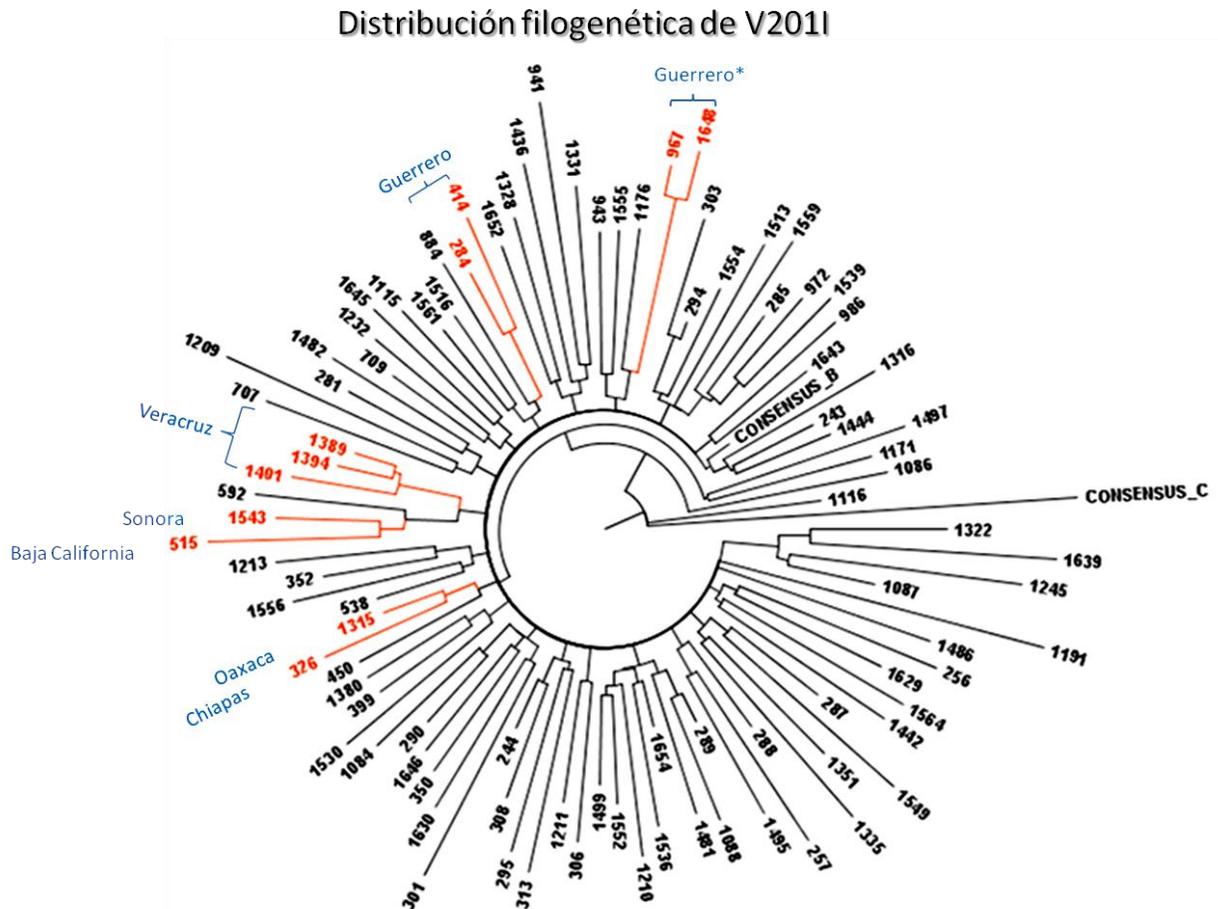


Figura 6.10. Análisis filogenético del polimorfismo V201I. . Se construyó un árbol filogenético de 95 secuencias, mediante el software MEGA 5 utilizando el método Neighbor-Joining, calculándose el valor de bootstrap a partir de 1000 réplicas. La distancia evolutiva se estimó con el método de Kimura 2-parámetros. Fue localizado un cluster de transmisión con bootstrap de compuesto por tres pacientes provenientes del estado de Veracruz, dos pares de transmisión compuestos por pacientes provenientes del estado de Guerrero mostraron relaciones de (pacientes 414 y 284) y de 100 (pacientes 967 y 1648). Se localizaron otros dos pares de transmisión sin coincidencia geográfica entre las secuencias virales que los componen.

Análisis filogenético de mutaciones poco frecuentes

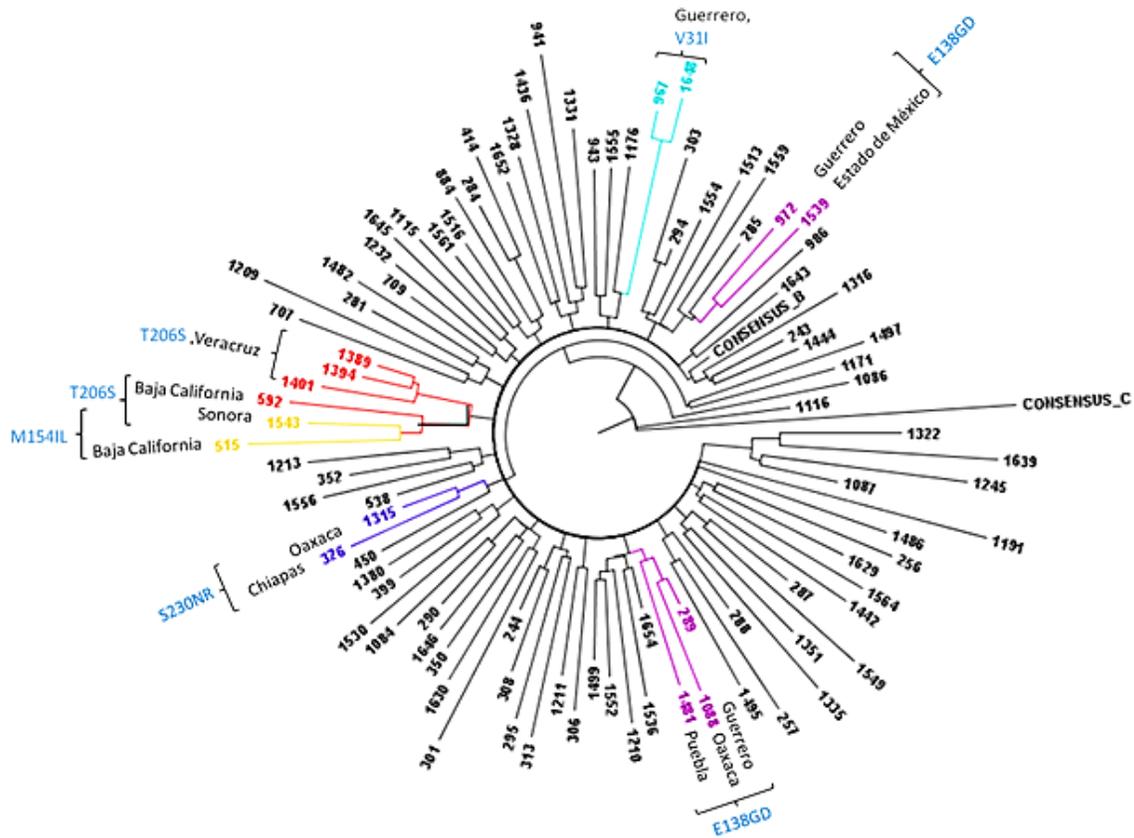


Figura 6.11. Análisis filogenético de mutaciones poco frecuentes. Se construyó un árbol filogenético de 95 secuencias, mediante el software MEGA 5 utilizando el método Neighbor-Joining, calculándose el valor de bootstrap a partir de 1000 réplicas. La distancia evolutiva se estimó con el método de Kimura 2-parámetros. Se muestra el árbol filogenético de algunas mutaciones con baja frecuencia en la población que conformaron pares o grupos con relación evolutiva. Se encontraron dos grupos de transmisión de la mutación menor E138GD, resaltada en morado, sin coincidencia geográfica entre los pacientes que conforman ambos grupos. El valor de bootstrap para el grupo conformado por las secuencias 972 y 1539 tuvo fue de 72, mientras que para el segundo grupo fue de 58. En el caso de los polimorfismos V311, marcado en azul claro, y S230NR, resaltado en azul fuerte, se encontró un par de transmisión para cada cambio; con bootstrap de 100 y 50 respectivamente. Se identificaron dos clusters portadores del polimorfismo T206S, el primero de ellos conformado por las secuencias 592 y 1543 con bootstrap de 80 y el segundo compuesto por tres pacientes de Veracruz con bootstrap de 96. Ambos clusters están representados en líneas rojas. El cambio M154IL estuvo presente en dos secuencias relacionadas, resaltadas en amarillo, con bootstrap de 68.

6.5 ANÁLISIS DE PRESIÓN SELECTIVA POR MODELO DE CODONES

Se aplicó un modelo de codones para buscar posiciones dentro de IN bajo presión selectiva con el fin de evaluar el posible papel de la evolución del VIH circulante en México en la resistencia transmitida a inhibidores de Integrasa. Los sitios con evidencia de selección positiva se determinaron con el programa SLAC y se definieron como aquéllos donde la tasa de sustituciones no sinónimas era significativamente mayor que de sustituciones sinónimas ($dN > dS$) (ver sección de Métodos).

Se localizaron seis codones bajo presión positiva ($p < 0.05$) aunque ninguna correlacionó con las posiciones de mutaciones de resistencia mayor halladas en los pacientes estudiados (**Tabla 6.6**).

TABLA 6.6. Análisis de presión selectiva por razones de sustituciones sinónimas y no sinónimas en la región de IN.*

Codón	dN-dS Normalizado	Valor p
112	1.58079	0.00858945
206	1.48403	0.00233823
218	0.778825	0.0428993
220	0.76786	0.046039
230	1.10795	0.0345047
265	1.08594	0.0111248

*El análisis se realizó utilizando el programa DataMonkey, disponible en línea, mediante el método SLAC (para detalles ver la sección de Métodos). Se muestran seis posiciones en las que la tasa de mutaciones no sinónimas (dN) fue significativamente mayor a la tasa de mutaciones sinónimas (dS) ($p < 0.05$)

6.6 ANALISIS DE PRESIÓN SELECTIVA MEDIADA POR HLA.

Se realizó el análisis de presión selectiva ejercida por HLA usando la base de datos de Los Álamos. En la figura 6.10 se enmarcan las posiciones de las cinco mutaciones de resistencia mayor encontradas a lo largo de la secuencia de aminoácidos de Integrasa.

Al compararse el haplotipo de alta resolución de HLA de cada paciente resistente, con los alelos selectores reportados, solo se encontró coincidencia en el paciente 1087 portador de la mutación E92V; es decir, la aparición de esta mutación está altamente influenciada por el efecto del alelo B*4403 (**Figura 6.12**).

Para la posición 155 aún no se han asociado alelos HLA a la aparición de mutaciones primarias de resistencia.

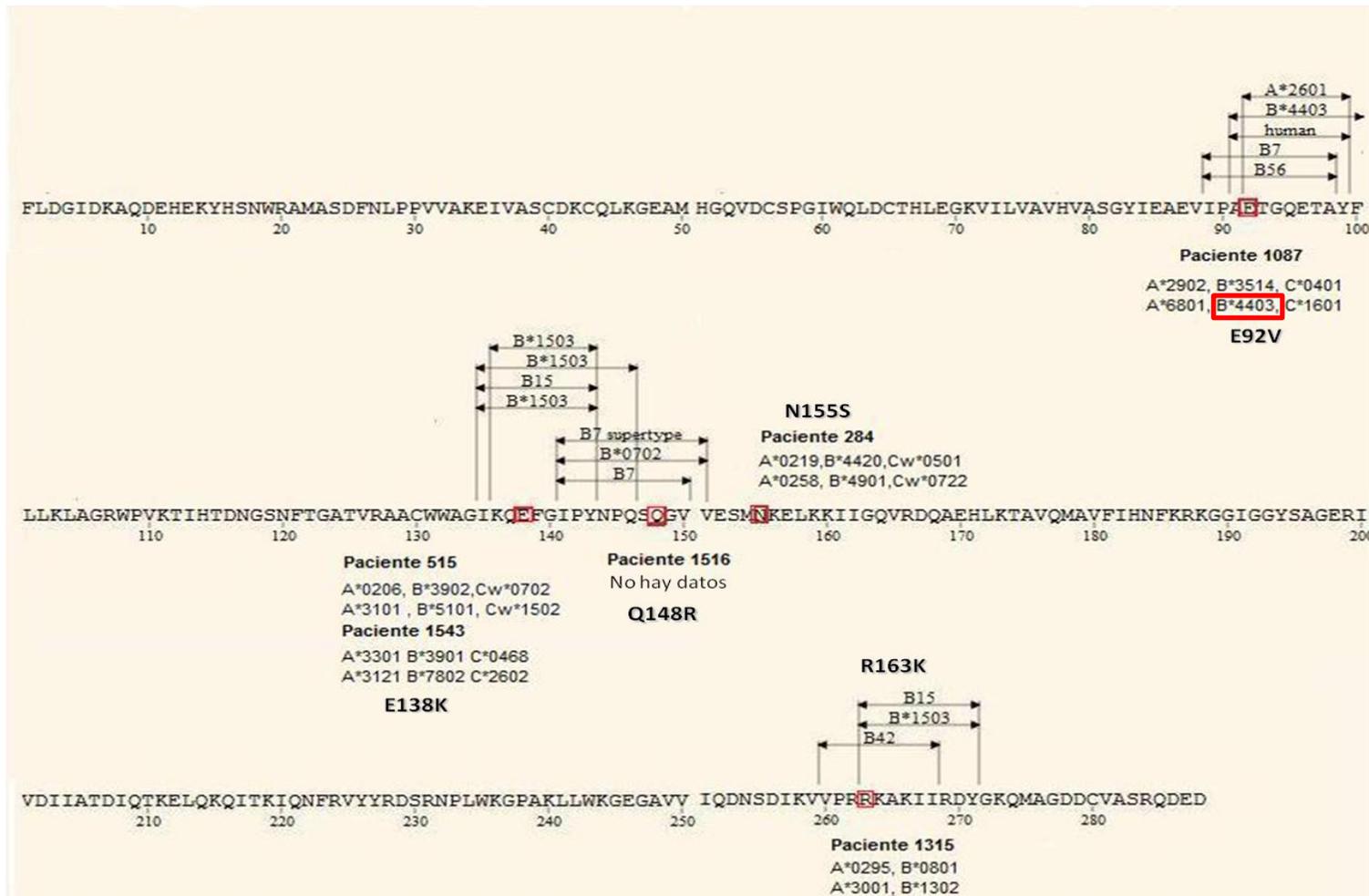


Figura 6.12. Mapa de epítomos de linfocitos T citotóxicos en IN de VIH. Se comparó el haplotipo HLA de cada paciente resistente con alelos reportados como selectores de mutaciones en Integrasa. Se observó coincidencia únicamente en el paciente portador de E92V, siendo B*4403 el alelo selector que explicaría la aparición de dicha mutación de resistencia. No se cuenta con los datos del paciente 1516. No se han encontrado alelos HLA que ejerzan presión selectiva en la posición 155 relacionada con la aparición de mutaciones de resistencia a ARVs.

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

7.1 CARACTERÍSTICAS DE LA COHORTE

Para este estudio se seleccionó una muestra de 100 pacientes mexicanos infectados por VIH-1 de la cohorte de Epidemiología y Evolución del CIENI. Al igual que CENSIDA ha estimado en México, en este grupo de pacientes predominaron los individuos de género masculino (81%), con una proporción de 4.2 hombres infectados por cada mujer.

Se ha observado que hombres con relaciones homosexuales y mujeres heterosexuales son los sectores mas afectados por la infección, sin embargo, no se pudo obtener esta información de los pacientes enrolados en el presente estudio para confirmar esta tendencia.

En cuanto al estado clínico de los pacientes, el 51% se encontraban en etapa crónica de infección (200-500 células CD4+/uL) y 30% presentaron cuentas de linfocitos CD4+ severamente reducidas (<200 cel/uL) que aumentan enormemente la probabilidad de desarrollo de SIDA.

Estos datos sugieren un diagnóstico tardío que ya ha sido reconocido en México[36] . El hecho de que los pacientes VIH positivos reciban atención médica en etapas avanzadas de la enfermedad aumenta el riesgo de transmisión y disminuye la probabilidad de éxito del tratamiento farmacológico. Por ello, es imprescindible que se refuercen las campañas de promoción de diagnóstico temprano de VIH, lo cual derivaría en una mejor atención médica (oportuna y efectiva).

En cuanto a la distribución geográfica de los pacientes incluidos en el estudio, a pesar de no tener gran representatividad de los estados con mayor incidencia de VIH, se pudieron observar fenómenos geográficos interesantes en algunas otras zonas del país. Aun con la limitante que esto representa, los resultados que se discuten más adelante nos dan un panorama general de la resistencia en nuestro país, predominantemente de la zona sur, región que se ha mantenido entre los

estados de incidencia media de casos de VIH/SIDA a lo largo de los últimos años. Considero que es importante realizar estudios subsecuentes de resistencia a este y otros tipos de medicamentos novedosos, tomando en cuenta de forma importante, aquellos estados que registran el mayor número de casos de VIH y SIDA.

Tal como se esperaba, el subtipo predominante en la cohorte estudiada fue el B. Ya se sabe que éste es el subtipo mas prevalente en el continente Americano. Se ha descrito la vía de llegada del VIH-1B de África a América [54], y su amplia diseminación se ha debido principalmente a fenómenos de migración. En México, en un estudio llevado a cabo por el CIENI en años recientes, se demostró que existe una homogeneidad de virus subtipo B circulando entre la población , a pesar de la proximidad con países como Estados Unidos y Canadá que presentan un número creciente de virus no-B [36].

7.2 VARIABILIDAD DE LA ENZIMA INTEGRASA EN MÉXICO

Uno de los requisitos más importantes para incluir las muestras de los pacientes en el presente estudio fue la nula exposición a fármacos antirretrovirales de cualquier tipo, de ésta forma se aseguraba que las posibles mutaciones presentes en el genoma viral no fueran inducidas por la presión selectiva que ejerce el TAR de primera línea.

Al analizar las secuencias se observó un 55.5% de variabilidad promedio en la enzima, porcentaje cercano a lo reportado en algunas publicaciones [24, 42, 48]. Este porcentaje respalda el hecho de que IN es una enzima menos polimórfica que PR, RT, y por supuesto, un gen mucho menos variable que Env. Sin embargo, IN presenta diversos cambios cuya importancia aun no es bien establecida.

Como era esperado, las posiciones más polimórficas de la enzima se localizaron fuera del dominio catalítico, y aunque estos cambios no se han asociado con una falla en la función enzimática de IN o con un impacto en resistencia farmacológica, es un claro ejemplo de que el virus evoluciona manteniendo los residuos indispensables para su función catalítica lo mas estable posible. A pesar de la alta

variabilidad encontrada en los tres dominios de la enzima, las posiciones involucradas con la función catalítica (triada DDE), unión al factor celular LEDGF/p75, el motivo de unión de zinc HHCC, el motivo de dimerización KRK y los codones de unión inespecífica a DNA (a.a 220-270) no presentaron alteraciones que se relacionen con un impacto significativo en la función enzimática de Integrasa.

En numerosos estudios con pacientes vírgenes a TAR con INSTIs y pacientes con falla virológica a Raltegravir se han encontrado como polimorfismos muy frecuentes a V72I, L101I, T125A, V201I, T206S y S230N[41, 42, 48, 50, 55]; de éstos, L101I y V201I fueron los polimorfismos más prevalentes en la cohorte estudiada. Ninguno de estos cambios ha sido asociado, hasta el momento, con resistencia *in vivo* a RAL o EVG, sin embargo, se ha visto que están involucrados en la disminución de susceptibilidad *in vitro* a otros inhibidores de IN [24].

El cambio V201I parece altamente conservado, pues fue encontrado en múltiples grupos de transmisión (Figura6.8). La aparición de este cambio en secuencias relacionadas geográficamente nos habla de un fenómeno regional de transmisión y posiblemente de un efecto fundador, mismo que podría ser corroborado si al aumentar el número de pacientes estudiados se observara la misma tendencia de aparición.

El análisis filogenético de virus con otras mutaciones muestra secuencias virales relacionadas, sin embargo es difícil establecer un patrón de transmisión por la divergencia geográfica de los pacientes portadores de virus mutantes. Sin embargo, se encontraron varios agrupamientos de secuencias de virus procedentes de regiones geográficas cercanas, lo cual sugiere un posible papel de eventos fundadores en la transmisión de virus con mutaciones importantes para la susceptibilidad a inhibidores de integrasa en México. Estas observaciones se tendrán que confirmar en cohortes más grandes y con mayor representatividad.

Aunque los polimorfismos aquí analizados no se han relacionado contundentemente con la susceptibilidad viral ante un INSTI, llama la atención su

alta prevalencia. Garrido y colaboradores [44] observaron que existen cambios menores que favorecen la aparición de mutaciones mayores después de un fallo virológico, por lo que no debe descartarse que estas dos mutaciones (V201I y L101I) pudieran tener alguna relevancia en el patrón evolutivo de la resistencia viral o en la actividad catalítica de la enzima, más aún en una población que ha mostrado tasas de resistencia muy elevadas y presencia de mutaciones mayores poco conocidas.

A nivel bioquímico, el único cambio que podría tener un impacto en la funcionalidad de la enzima es la sustitución de Treonina (a.a polar/hidrófilo) por Alanina (a.a no polar/hidrófobo) en las posiciones 124 y 125. En primer lugar este cambio en posiciones contiguas podría modificar la interacción de la enzima con el medio y quizá repercutir en el plegamiento de la proteína; adicionalmente, Treonina es un aminoácido que al sufrir fosforilación contribuye en la actividad enzimática y en estas posiciones fue remplazado por un aminoácido de menor tamaño y poco reactivo, que aunque no está en las posiciones consideradas dentro de la triada catalítica, podría tener alguna repercusión en la funcionalidad de Integrasa.

De acuerdo a la base de datos de la Universidad de Stanford, se han reportado 27 mutaciones secundarias [55, 56]. En las secuencias analizadas en el presente trabajo, se encontraron ocho de ellas, siendo el cambio E138G/D el más frecuente. Cabe destacar que este polimorfismo no es común, sin embargo, recae en una posición donde se puede desarrollar un cambio importante, la mutación E138K/A que compensa el defecto de Q148K/R/H.

La mutación E157Q aunque solo se reportó en el 2% de la cohorte, no puede descartarse que sea un cambio menor muy frecuente en nuestro país, pues se ha observado que predomina en el subtipo B [44, 48]. Llama la atención que esta mutación ha sido encontrada únicamente en pacientes vírgenes a tratamiento con RAL o bien, pacientes con exposición a inhibidores de RT o Proteasa. Se ha observado que existen mutaciones compensatorias a un defecto enzimático en regiones génicas distantes, E157Q podría estar compensando un defecto de RT o

Proteasa generado por una mutación de escape o resistencia, o bien, ser un cambio que desaparece con la exposición a RAL por disminuir la susceptibilidad viral ante este medicamento o moléculas similares.

El papel más importante de las mutaciones menores es compensar la función enzimática o la capacidad replicativa perdida por la alteración de algún aminoácido importante [26, 44]. Con diversos estudios de prevalencia, se han establecido seis mutaciones menores de relevancia para la conformación de patrones o perfiles de resistencia [40, 44, 48, 49]. Es notable, que en el estudio de la cohorte mexicana no se encontró ninguna de las asociaciones mencionadas. Sin embargo, se identificaron mutaciones mayores y compensatorias de manera independiente con prevalencias mayores a las esperadas [26, 41, 48-50, 55]. La presencia exclusiva de mutaciones menores o compensatorias como V54I, E138G/D y V151I es relevante ya que disminuye la barrera genética para la aparición de resistencia en presencia de la presión selectiva por inhibidores de integrasa, tal como se ha comprobado con V165I y N155H y T97A con Y143R [44].

7.3 RESISTENCIA A INHIBIDORES DE INTEGRASA

Ya se ha observado en múltiples ensayos clínicos y estudios epidemiológicos en diversas poblaciones [40-43, 48-50], que las mutaciones mayores no son frecuentes en pacientes vírgenes a TAR. Contrario a lo esperado, en nuestra población se identificaron seis pacientes resistentes. Dos de ellos portadores de mutaciones muy raras en posiciones importantes que se describen a continuación.

En la posición 92 se identificó la variante E92V. De acuerdo a la base de datos de Stanford, este cambio se ha identificado únicamente al exponer al virus *in vitro* a antirretrovirales, y se reporta una disminución de la susceptibilidad de 10 veces ante RAL y 40 veces ante EVG en comparación con virus no mutados. Pero no había sido observado en pacientes con falla al tratamiento ni en aquellos vírgenes a TAR. En esta posición, se creía que el único cambio con relevancia era la mutación E92Q que compensa el defecto en fitness que promueve la mutación N55H; pero poco a poco se han ido estableciendo cambios muy específicos,

aunque de frecuencias muy bajas, que pueden asociarse de forma importante a resistencia. Por ejemplo, en 2010 el grupo de investigación de la doctora Francesca Ceccherini identificó al cambio E92G como una mutación importante de resistencia fenotípica a EVG. No se tiene suficiente información sobre el efecto que pueda tener la variante rara encontrada en nuestra población; por lo que sería necesario evaluarlo en ensayos de capacidad replicativa viral y corroborar su importancia con una prueba de resistencia fenotípica.

Por otro lado, se observó la presencia del cambio N155S. Se sabe que modificaciones en esta posición no son comunes, sin embargo la sustitución de Asparagina por Histidina (N155H) se reporta como una de las vías principales de desarrollo de resistencia al reducir la susceptibilidad a INSTIs más de 20 veces y reducir el fitness hasta 75% [24, 42, 49].

En pacientes que han desarrollado resistencia a INSTIs se ha observado que la mutación N155H es inestable, pues aparecen rápidamente cuasiespecies portadoras de otra mutación de resistencia (Q148R/K/H o Y143R/C/H) [40, 47, 48]. Esto se podría explicar porque el cambio de N155 a H155 o S155 solo involucra la sustitución de una base del codón, mientras que los cambios en las posiciones Q148 y Y143 se originan por la modificación de dos bases del codón correspondiente (**Figura 7.1**). La aparición de N155H/S supondría un estado transitorio para disminuir la susceptibilidad ante RAL o EVG que le permita al virus continuar replicándose hasta la aparición de mutaciones compensatorias de N155H o bien, hasta que haya una conversión a mutantes de Q148 o Y143 cuya aparición es simultánea con mutaciones secundarias que disminuyen el impacto en fitness.

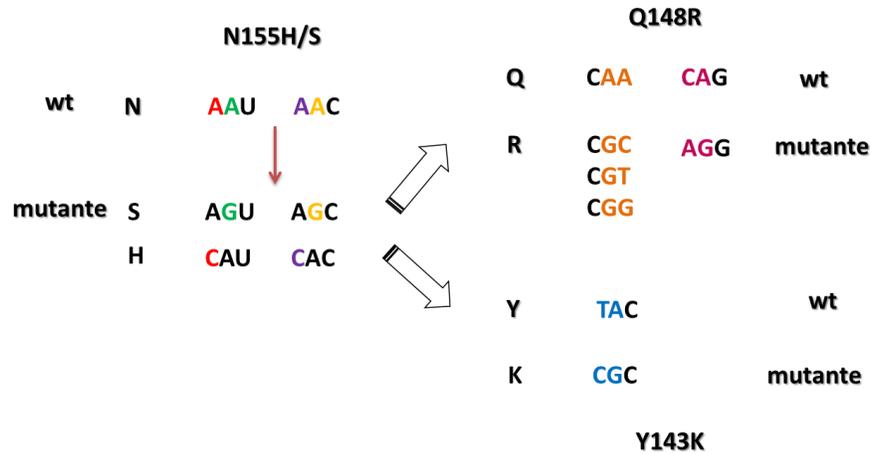


Figura 7.1 Desarrollo de mutaciones de resistencia. La sustitución N155H parece ser inestable debido al alto costo en fitness, siendo sustituida la mayoría de las veces por la mutación Q148R o Y143K con sus respectivas mutaciones compensatorias. La aparición inicial de N155H se explica por la “facilidad” que representa para el virus el cambio de un solo nucleótido en el codón correspondiente, mientras que para cambios en 148 y 143 son requeridas dos mutaciones en el mismo codón. En colores se muestra la correspondencia entre el nucleótido wild type (wt) y el mutante.

La base de datos de la Universidad de Stanford clasifica la variante N155S como una mutación no polimórfica de aparición poco frecuente, se sabe que reduce la susceptibilidad a antirretrovirales, pero no se tienen suficientes datos sobre el impacto que tiene en la tasa de replicación del virus.

La disminución de la replicación de virus portadores de N155H se ve compensada por algunas mutaciones secundarias que no estuvieron presentes en el paciente portador del cambio Asparagina → Serina, lo que podría sugerir que la aparición del cambio N155S no tiene un costo suficientemente alto en el virus. Esta hipótesis tendría que ser comprobada con un seguimiento del paciente, para establecer asociaciones entre esta mutación y cambios compensatorios, y observar si el cambio N155S es más estable.

Adicionalmente, la mutación R263K fue encontrada en un solo paciente. Creemos que ha sido clasificada como mutación menor por representar impacto en la susceptibilidad del virus únicamente ante Elvitegravir, sin embargo, al ser calificada con un puntaje de 15 se decidió contemplar este paciente como resistente. Esta mutación confiere resistencia genotípica de bajo nivel ante EVG,

reduciendo su susceptibilidad 5 veces. Hay divergencia sobre la importancia de este cambio, pues algunas publicaciones lo toman como mutación primaria [50], mientras que otras lo clasifican como polimorfismo natural [48]. Independientemente de su clasificación y a pesar de su poca frecuencia, debe considerarse que esta mutación tiene un impacto en el desarrollo de resistencia ante un medicamento que aún no está en uso clínico, lo que comprometería la efectividad del mismo. Ya se ha observado que algunas de las mutaciones que confieren resistencia a EVG, incluido este cambio, disminuyen la efectividad de inhibidores de Integrasa de segunda generación como Dolutegravir [57], por lo que el estudio sobre estos cambios debería profundizarse para asegurar la efectividad de medicamentos de última generación.

E138K es una mutación de frecuencia máxima de 0.1% en pacientes vírgenes a tratamiento [24, 49] y aproximadamente el 1.9% de los pacientes expuestos a RAL la presentan [49]. Esta mutación tiene un efecto mínimo por sí misma, y ha sido asociada a cambios en Q148 como mutación compensatoria. Llama la atención que en la población estudiada su frecuencia fue de 2% y en ninguno de los casos estuvo asociada con otra mutación mayor. No se sabe si su aparición es simultánea o posterior al surgimiento de cambios en la posición 148, pero pareciera que en la población mexicana este cambio se desarrolla de manera independiente y además se transmite. Los dos pacientes que fueron portadores de E138K mostraron una relación filogenética cercana, por lo que podría sospecharse del contagio de un virus levemente resistente.

Los cambios en la Glutamina 148 se han reportado como frecuentes en aquellos pacientes con falla terapéutica de RAL, clasificándose como la mutación de mayor impacto tanto en la resistencia como en el fitness. Este cambio está alojado en una región altamente conservada del gen *pol* relacionada con la estabilidad el extremo 5' del ADN proviral después de la inserción [24]. La región entre G140 y G149 forma un haz que se ha observado que pierde su flexibilidad si presenta alguna mutación, afectando la actividad catalítica de la enzima. Es por ello que mutaciones en la posición 148 tienen alto impacto en el fitness viral, por lo que es

promovida la aparición de mutaciones compensatorias. A pesar del efecto que tienen cambios en este residuo sobre la replicación del VIH, su aparición aumenta la resistencia a EVG más de 1000 veces [26, 40, 41, 56], confiriendo una ventaja evolutiva al virus portador.

En un paciente de la cohorte estudiada se observó el cambio Q148R que ha sido descrito en pacientes con falla temprana a tratamiento antirretroviral [26, 40, 49]. La evolución de este paciente podría derivarse en un cambio a otra vía de resistencia (típicamente Y143R), un cambio de aminoácido en el mismo residuo (Q148H o Q148K) o el desarrollo de cambios compensatorios, principalmente G140A/S; la evolución de este perfil de resistencia sería resultado de la presión inmune que el paciente tenga sobre el virus y evidentemente de la exposición que pudiera tener a RAL.

Se comprobó con ayuda de centros de salud estatales a través del análisis de los expedientes respectivos, que cinco de los seis pacientes portadores de mutaciones mayores eran vírgenes a tratamiento antirretroviral al momento de la toma de la muestra analizada; por lo que se descarta que estos cambios sean resultado de la presión selectiva ejercida por algún otro medicamento antirretroviral. El paciente de quien no se tiene la información necesaria no era portador de ninguna mutación relacionada con resistencia a IP, NRTI o NNRTI.

7.4 ANÁLISIS DE PRESIÓN SELECTIVA

Aunque la aparición de mutaciones en el genoma viral es un fenómeno azaroso, se ha comprobado que existen algunos factores alternos al virus que favorecen la aparición de cambios.

La presión selectiva ejercida por medicamentos antirretrovirales es uno de los factores más estudiados. La exposición prolongada o intermitente de un virus a cierto fármaco se relaciona con el desarrollo de resistencia y disminución de la efectividad. Raltegravir no es un medicamento que se use de forma regular en nuestro país, además de haberse corroborado que los pacientes incluidos en el estudio nunca hubieran estado en contacto con él; por lo que encontrar otro factor

que pudiera asociarse con la aparición de un número sorprendente de mutaciones de resistencia resulta trascendental.

En la infección por VIH, se sabe que la respuesta citotóxica de Linfocitos T CD8+ (CTL) es mayoritaria sobre otros mecanismos de defensa del sistema inmune [58-60]. Esta respuesta está mediada por el reconocimiento de epítomos a lo largo del genoma viral por parte de moléculas de HLA. Las mutaciones de escape que el virus desarrolla para evadir la respuesta inmune pueden conferir también resistencia a algunos ARVs.

En el análisis que se realizó a este respecto, únicamente se identificó que la mutación E92V estaba dentro de un epítomo reconocido por el alelo B*4403. Este alelo es medianamente frecuente en la población mexicana pero no ha sido asociado con efectos protectores o de riesgo en la progresión de la infección por VIH en nuestra población. Debemos recordar que esta mutación es una variante muy poco frecuente sobre la que no se tiene mucha información, por lo que no debe descartarse que el desarrollo de resistencia a INSTIs por esta vía este asociado a un alelo específico de HLA.

Dado que no se puede explicar la aparición de todas las mutaciones como resultado del escape a HLA, y contemplando que existen presiones selectivas como el reconocimiento de epítomos por parte de linfocitos T CD4+ o anticuerpos, entre otras, se buscó una coincidencia de posiciones bajo presión positiva y residuos con mutaciones mayores mediante la aplicación Data Monkey (ver métodos). Ninguno de los residuos bajo alguna presión selectiva coincide con posiciones de resistencia encontradas, por lo que no se pudo explicar la aparición de los cambios N155S, Q148R y R263K.

En el caso de la mutación E138K se observó una asociación geográfica entre los dos pacientes portadores. Con los análisis descritos no se puede dilucidar si existe alguna característica étnica o una característica propia de la región que pudiera relacionarse con el desarrollo de este cambio, pero no debe descartarse. La aparición de este cambio en secuencias evolutivamente relacionadas y

pacientes de la misma región del país podría sugerir un efecto fundador comprobable únicamente con análisis más profundos y una cohorte mas amplia.

Los resultados mostrados en el presente estudio deben tomarse con cautela, primeramente por la distribución heterogénea de los pacientes, lo cual limita el establecimiento de relaciones geográficas certeras; y en segundo lugar, por la cantidad de pacientes incluidos (n=100). A pesar de estos factores, la estadística generada a partir de este análisis nos da una visión preliminar del comportamiento de la resistencia a inhibidores de Integrasa del VIH-1 circulante en nuestra población y promueve la realización de estudios más detallados que permitan establecer el origen de mutaciones tan importantes que no habían sido observadas con frecuencias importantes hasta el momento.

Es un hecho que los pacientes infectados por VIH-1 en la República Mexicana muestran un patrón de resistencia ante diversos ARVs muy distinto al de otras poblaciones, por lo que es de gran relevancia el ahondar en el análisis de estas mutaciones mayores para aproximar la causa de su aparición, ya que su alta frecuencia podría repercutir en la efectividad de los esquemas actuales de tratamiento.

La confirmación de las tendencias aquí presentadas, podría sugerir la inclusión de una prueba genotípica de resistencia en los estudios primarios de todo paciente infectado con VIH y la modificación de los esquemas terapéuticos en busca de una mejora de acuerdo a las características étnicas y genotípicas específicas de nuestra población.

8. CONCLUSIONES

- ⌘ En la población mexicana se observó una prevalencia de mutaciones mayores de resistencia superior a la reportada en cualquier otra población. Obteniéndose a nivel poblacional, 5% de resistencia a RAL y 6% a EVG.

- ⌘ Se observaron asociaciones filogenéticas que podrían estar relacionadas con fenómenos de transmisión, tanto en mutaciones menores como en polimorfismos.

- ⌘ La alta prevalencia de los polimorfismos L101I y V201I reportada en poblaciones caucásicas coincidió con la tendencia de la población mexicana. No debe descartarse un papel relevante de estos cambios en la evolución de resistencia a INSTIs.

- ⌘ La presión selectiva ejercida por el sistema inmune podría estar relacionada con la aparición de resistencia transmitida, sin embargo se requiere profundizar en este análisis para establecer una asociación certera.

- ⌘ No deben descartarse otros fenómenos de presión selectiva como origen de mutaciones mayores raras que confieren resistencia en virus circulantes en México ante inhibidores de Integrasa.

9. PERSPECTIVAS

Debido a la importancia que representa un alto porcentaje de resistencia transmitida a fármacos de reciente uso, se pretende ampliar la cohorte de estudio para aumentar el poder estadístico y confirmar las tendencias preliminares obtenidas.

Algunas de las variantes que se encontraron son mutaciones raras sobre las que se tiene poca información, por lo que se pretende incluir a los virus portadores en ensayos fenotípicos *in vitro* de resistencia para definir su impacto en la respuesta ante inhibidores de Integrasa de primera línea.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. UNAIDS, *Report of the global AIDS epidemic*. 2010.
2. Córdoba Villalobos J. A., P.d.L.R.S., Valdespino J. L., *25 años de SIDA en México. Logros, desaciertos y retos*. Segunda ed. 2009, Cuernavaca, Morelos, México: Instituto Nacional de Salud Pública.
3. ONUSIDA, *ONUSIDA, REPORTE POR EL DIA MUNDIAL DEL SIDA, 2011*. 2011.
4. CENSIDA, *VIH/SIDA en México, 2009*. Primera ed. 2009, México, D.F.: CENSIDA.
5. CENSIDA. *Panorama Epidemiológico del VIH/SIDA e ITS en México*. 2009 [cited; Available from: <http://www.censida.salud.gob.mx/interior/panorama.html>.]
6. Hemelaar, J., et al., *Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000-2007*. AIDS. **25**(5): p. 679-89.
7. Richard, H., *Virology*, U.o.S.C.S.o. Medicine, Editor. 2007: USA.
8. Büchen-Osmond, C. *International Committee on Taxonomy of Viruses*. 2002 Abril 2006 [cited; Available from: <http://www.ictvdb.org/ictv/index.htm>].
9. Freed EO, M.M., *HIVs and their replication*. Quinta ed. Vol. II. 2007, Philadelphia: Knipe DM.
10. Coffin M. J, H.S.H., Varmus H.E., *Retroviruses*. 1997, NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
11. Acosta, G.C., *Biología molecular de las proteínas accesorias del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1)*. salud uninorte, 2005(021).
12. Delelis, O., et al., *Integrase and integration: biochemical activities of HIV-1 integrase*. Retrovirology, 2008. **5**: p. 114.
13. Cherepanov, P., et al., *Structural basis for the recognition between HIV-1 integrase and transcriptional coactivator p75*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(48): p. 17308-13.
14. Salud, O.M.d.I. *ONUSIDA*. [cited 2011 Noviembre, 30]; Available from: <http://www.unaids.org/es/>.

15. Simon, V., D.D. Ho, and Q. Abdool Karim, *HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment*. Lancet, 2006. **368**(9534): p. 489-504.
16. Soto Nava, M., *Evolución de Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) en México: Impacto de los genes HLA de clase I en diferentes regiones de la República Mexicana*, in *Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIENI)*. 2010, Universidad Nacional Autónoma de México: México D.F.
17. CIENI, C.d.I.e.E.I., *30 años del VIH-SIDA, perspectivas desde México*. Primera ed. 2011, México.
18. WHO, *Antiretroviral therapy for HIV infection in adults and adolescents: recommendations for a public health approach*. 2010 rev., W.H. Organization, Editor. 2010, WHO Library Cataloguing-in-Publication Data.
19. SSA, S.d.S., *NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-010-SSA2-1993, PARA LA PREVENCIÓN Y CONTROL DE LA INFECCIÓN POR VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA*. 1993: México.
20. CONASIDA, C.N.p.I.P.y.C.d.S., *Guía de manejo antirretroviral de las personas con VIH/SIDA*. 2009, Secretaría de Salud: México.
21. General, C.d.S., *Cuadro Básico y Catálogo de Medicamentos*. 2010: México.
22. Eron, J.J., Jr., *Antiretroviral therapy: new drugs, formulations, ideas, and strategies*. Top HIV Med, 2009. **17**(5): p. 146-50.
23. Tan, J.J., et al., *Therapeutic strategies underpinning the development of novel techniques for the treatment of HIV infection*. Drug Discov Today. **15**(5-6): p. 186-97.
24. Ceccherini-Silberstein, F., et al., *Characterization and structural analysis of HIV-1 integrase conservation*. AIDS Rev, 2009. **11**(1): p. 17-29.
25. Jegede, O., et al., *HIV type 1 integrase inhibitors: from basic research to clinical implications*. AIDS Rev, 2008. **10**(3): p. 172-89.
26. Metifiot, M., et al., *Resistance to Integrase Inhibitors*. Viruses, 2010. **2**(7): p. 1347-1366.

27. Okeke, N.L. and C. Hicks, *Role of raltegravir in the management of HIV-1 infection*. HIV AIDS (Auckl), 2011, **3**: p. 81-92.
28. Jones, G.S., et al., *Preclinical evaluation of GS-9160, a novel inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 integrase*. Antimicrob Agents Chemother, 2009. **53**(3): p. 1194-203.
29. Rhee, S.Y., et al., *Human immunodeficiency virus reverse transcriptase and protease sequence database*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(1): p. 298-303.
30. Shafer, R.W., *Rationale and uses of a public HIV drug-resistance database*. J Infect Dis, 2006. **194 Suppl 1**: p. S51-8.
31. Afani, S.A. and O.A. Gallardo, *[Antiretroviral resistance in human immunodeficiency virus infection]*. Rev Chilena Infectol. **28**(5): p. 461-9.
32. Soto-Ramirez, L.E., *HIV/AIDS in Latin America*. Science, 2008. **321**(5888): p. 465.
33. Little, S.J., et al., *Reduced antiretroviral drug susceptibility among patients with primary HIV infection*. JAMA, 1999. **282**(12): p. 1142-9.
34. Harrigan, P.R., et al., *World-wide variation in HIV-1 phenotypic susceptibility in untreated individuals: biologically relevant values for resistance testing*. AIDS, 2001. **15**(13): p. 1671-7.
35. Bennett, D.E., et al., *Recommendations for surveillance of transmitted HIV drug resistance in countries scaling up antiretroviral treatment*. Antivir Ther, 2008. **13 Suppl 2**: p. 25-36.
36. Avila-Rios, S., et al., *National Prevalence and Trends of HIV Transmitted Drug Resistance in Mexico*. PLoS One., 2011, **6**(11): p. e27812.
37. Hattori, J., et al., *Trends in transmitted drug-resistant HIV-1 and demographic characteristics of newly diagnosed patients: nationwide surveillance from 2003 to 2008 in Japan*. Antiviral Res, 2010. **88**(1): p. 72-9.
38. Wheeler, W.H., et al., *Prevalence of transmitted drug resistance associated mutations and HIV-1 subtypes in new HIV-1 diagnoses, U.S.-2006*. AIDS, 2010. **24**(8): p. 1203-12.

39. Delelis, O., et al., *Impact of Y143 HIV-1 integrase mutations on resistance to raltegravir in vitro and in vivo*. Antimicrob Agents Chemother, 2010, **54**(1): p. 491-501.
40. Fransen, S., et al., *Loss of raltegravir susceptibility by human immunodeficiency virus type 1 is conferred via multiple nonoverlapping genetic pathways*. J Virol, 2009. **83**(22): p. 11440-6.
41. Ceccherini-Silberstein, F., et al., *Secondary integrase resistance mutations found in HIV-1 minority quasispecies in integrase therapy-naive patients have little or no effect on susceptibility to integrase inhibitors*. Antimicrob Agents Chemother.2010, **54**(9): p. 3938-48.
42. Low, A., et al., *Natural polymorphisms of human immunodeficiency virus type 1 integrase and inherent susceptibilities to a panel of integrase inhibitors*. Antimicrob Agents Chemother, 2009. **53**(10): p. 4275-82.
43. Malet, I., et al., *Mutations associated with failure of raltegravir treatment affect integrase sensitivity to the inhibitor in vitro*. Antimicrob Agents Chemother, 2008. **52**(4): p. 1351-8.
44. Garrido, C., et al., *Integrase variability and susceptibility to HIV integrase inhibitors: impact of subtypes, antiretroviral experience and duration of HIV infection*. J Antimicrob Chemother., 2010, **65**(2): p. 320-6.
45. Da Silva, D., I. Pellegrin, G. Anies, D. Breith, L. Wittkop, P. Morlat, M. Dupon, D. Neau, J. L. Pellegrin, H. Fleury, B. Masquelier., *Mutational patterns in the HIV-1 integrase related to virological failures on raltegravir-containing regimens*. Antiviral Ther., 2008. **13**(A14).
46. Miller, M.D., R. M. Danovich, Y. K. E., M. Witmer, J. Zhao, C. Harvey, B.-Y. Nguyen, D. J. Hazuda, *Longitudinal analysis of resistance to the HIV-1 integrase inhibitors raltegravir: results from P005 a Phase II study in treatment-experienced patients*. . Antiviral Ther., 2008. **13**(A8).
47. Mbisa, J.L., S.A. Martin, and P.A. Cane, *Patterns of resistance development with integrase inhibitors in HIV*. Infect Drug Resist., 2011, **4**: p. 65-76.
48. Sichtig, N., et al., *Evolution of raltegravir resistance during therapy*. J Antimicrob Chemother, 2009. **64**(1): p. 25-32.

49. Blanco J-L., V.V., Rhee S-Y., Gallet J.M., Shafer R.W., *HIV-1 integrase inhibitor resistance and its clinical implications*. The journal of infectious diseases, 2011. **203**: p. 1204-14.
50. Piralla, A., et al., *HIV integrase variability and genetic barrier in antiretroviral naive and experienced patients*. Virol J.,2011, **8**: p. 149.
51. Tamura, K., et al., *MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0*. Mol Biol Evol, 2007. **24**(8): p. 1596-9.
52. Saitou, N. and M. Nei, *The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees*. Mol Biol Evol, 1987. **4**(4): p. 406-25.
53. Kimura, M., *A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences*. J Mol Evol, 1980. **16**(2): p. 111-20.
54. Junqueira, D.M., et al., *Reviewing the history of HIV-1: spread of subtype B in the Americas*. PLoS One., 2011, **6**(11): p. e27489.
55. Rhee, S.Y., et al., *Natural variation of HIV-1 group M integrase: implications for a new class of antiretroviral inhibitors*. Retrovirology, 2008. **5**: p. 74.
56. Liu, T.F. and R.W. Shafer, *Web resources for HIV type 1 genotypic-resistance test interpretation*. Clin Infect Dis, 2006. **42**(11): p. 1608-18.
57. Quashie, P.K., et al., *Characterization of the R263K mutation in HIV-1 integrase that confers low-level resistance to the second-generation integrase strand transfer inhibitor Dolutegravir*. J Virol, 2011
58. Carlson, J.M. and Z.L. Brumme, *HIV evolution in response to HLA-restricted CTL selection pressures: a population-based perspective*. Microbes Infect, 2008, **10**(5): p. 455-61.
59. Espinosa, E., *[Finding the traces of the HIV selection]*. Rev Latinoam Microbiol, 2006. **48**(2): p. 84-90.
60. Goulder, P.J., et al., *Evolution and transmission of stable CTL escape mutations in HIV infection*. Nature, 2001. **412**(6844): p. 334-8.