

4.2.2 Secuenciación y análisis de las secuencias obtenidas.

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

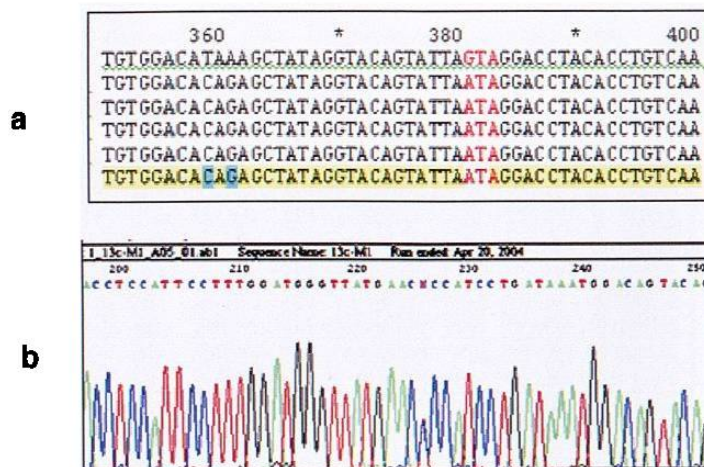


Figura 15. Ejemplo de las secuencias obtenidas

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

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

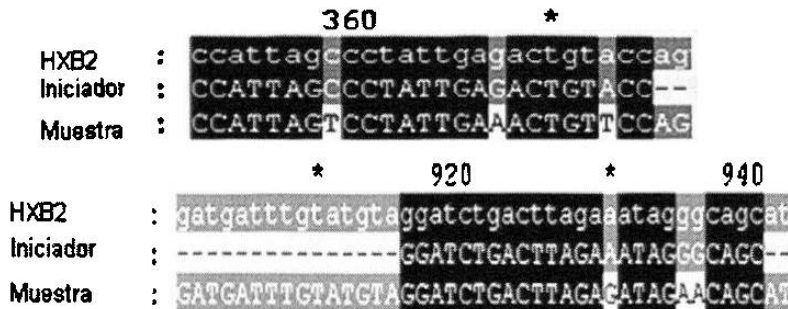


Figura 16. Alineamiento de las muestras con los Iniciadores y con la secuencia HXB2

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

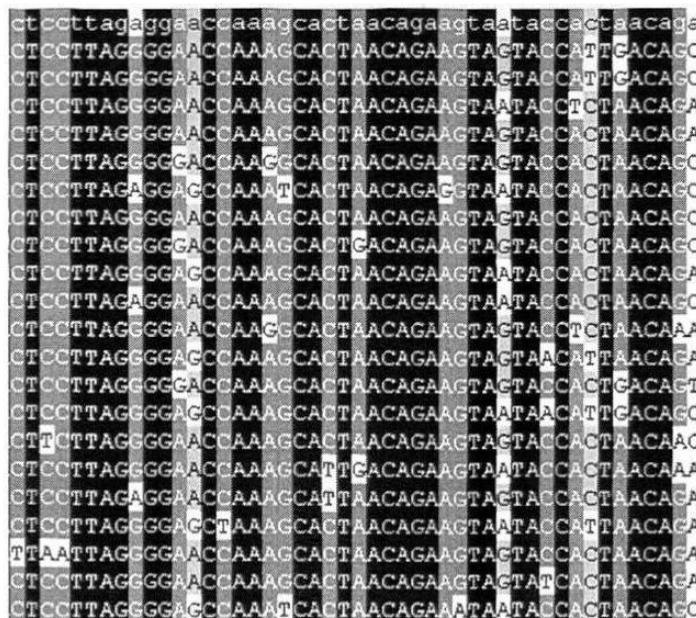


Figura17. Alineamiento de una región de la RT con la secuencia HXB2.

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

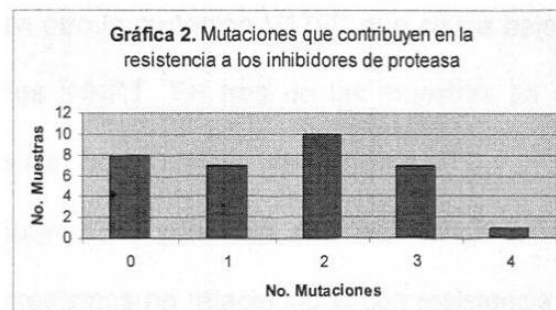
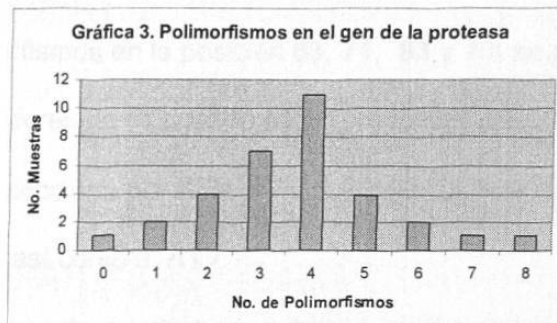


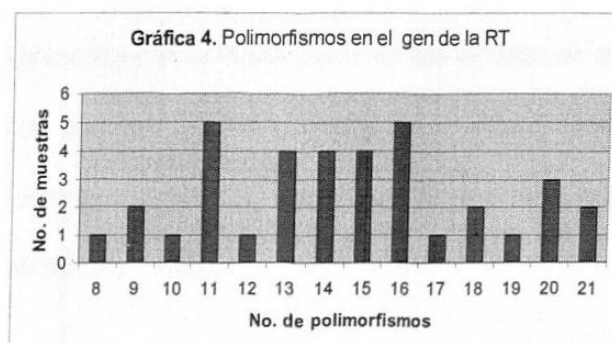
Tabla 9. Frecuencia de mutaciones secundarias en el gen de la proteasa (n=33)

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

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



En relación con el gen de la RT, en uno de los aislados se detectó la mutación M184V que se asocia con alto nivel de resistencia a los INRT (lamivudina y emtricitabina) y en otro la mutación V179D que causa bajo nivel de resistencia a cada uno de los INNRT. En tres de las muestras se detectó la mutación V118I la cual causa bajo nivel de resistencia a 3TC y probablemente al resto de los NRTIs cuando se presenta con la mutación E44A/D. También se encontraron polimorfismos no relacionados con resistencia a los inhibidores de la RT y se muestran en la gráfica 4.



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

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

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

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

4.2.5 Interpretación de las mutaciones en el gen de la RT

Mutaciones asociadas con los INRT

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

Mutaciones asociadas con los INNRT

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

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

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

4.2.7 Subtipo al que corresponden las variantes virales

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

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

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

En los pacientes infectados con VIH, el primer esquema terapéutico es uno de los factores más importantes para producir una supresión virológica eficaz y duradera (11). El conocimiento de la prevalencia de variantes resistentes es una herramienta útil para optimizar dichos esquemas y así obtener una mejor respuesta inmunológica evidenciable por la cuenta de T-CD4. Nuestro interés se enfocó en las mutaciones de los genes de la Pr y de la RT que confieren resistencia a los ARV en pacientes que no han sido tratados previamente. Para tal fin se investigó la frecuencia de dichas mutaciones del VIH, en una muestra de 39 pacientes en una población del noreste de México. El 90% de la muestra se constituyó por sujetos del sexo masculino y en su mayoría desempleados. La mayor parte de los participantes se reportaron como heterosexuales, seguidos por homosexuales, adictos a las drogas por vía endovenosa y bisexuales como factores de riesgo de exposición al VIH. Únicamente 3 pacientes presentaron cuentas de T-CD4 de más de 200 células mm^3 y las cargas virales fueron mayores a 14,000 copias de RNA/ml, excepto en un paciente que tuvo 1000 copias. se esperaría que a mayores cuentas de T-CD4 la carga viral fuera menor sin embargo, aunque la mayoría de los pacientes tienen cuentas de T-CD4 menores de 300, algunos pacientes tuvieron cargas virales altas y otros cargas relativamente bajas, no hay una relación directa entre la cantidad de estas células y la carga viral. La relación entre estos parámetros y la presencia de resistencia a los ARV se ha investigado, sin

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

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

No se detectaron este tipo de mutaciones en 8 muestras. La mayoría de los cambios se observaron en las posiciones 93, 63 y 77 (48, 42 y 39 % respectivamente) y con menor frecuencia se identificaron otras en las posiciones 71, 33, 36 y 10. Estas posiciones polimórficas contribuyen a la resistencia, pero solo en combinación con otras mutaciones de resistencia. Las mutaciones en las posiciones 10, 36, y 71 ocurren en más del 5 al 10% de individuos no tratados infectados con virus subtipo B; pero en pacientes tratados que albergan aislados con otras múltiples mutaciones, la prevalencia incrementa dramáticamente. La posición 63 de la Pr es la más polimórfica, en los no tratados cerca del 45% de los aislados tienen 63L (consenso subtipo B), 45% tienen 63P y el 10% tienen otros residuos en este sitio. La mutación I93L se asocia estadísticamente con múltiples inhibidores de Pr, mientras que V77I

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

En el gen de la RT se detectó una mutación asociada con alto nivel de resistencia a los INRT (M184V) con una prevalencia de 3% y una mutación asociada con bajo nivel de resistencia a los INNRT (V179D) con prevalencia también de 3%. La mutación M184V por si sola causa alto nivel (>100 veces) de resistencia a lamivudina y emtricitabina y bajo nivel de resistencia a didanosina, zalcitabina y abacavir; además incrementa la susceptibilidad a zidovudina, estavudina y tenofovir. La mutación emerge rápidamente en pacientes recibiendo monoterapia con lamivudina y también generalmente es la primera en desarrollarse en aislados de pacientes recibiendo tratamientos no completamente supresivos (75, 76,77). La posición 184 se encuentra en una región conservada de la RT cercana al sitio activo. La mutación resulta de una sustitución A por G que cambia el nucleótido ATG (metionina) por GTG (valina) (78), generándose impedimento estérico entre el anillo de lamivudina y la cadena ramificada de la valina, afectando de esa manera la unión del inhibidor.

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

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

La mutación V118I observada en 3 de los aislados, ocurre normalmente en el 2% de los pacientes no tratados, pero su frecuencia aumenta en personas recibiendo INRT. En un estudio se encontró que las mutaciones V118I y E44D fueron más comunes en virus de pacientes tratados con zidovudina y se asociaron con alto nivel de resistencia a zidovudina cuando se presentan ambas (92). El efecto de V118I y E44D cuando se presentan en forma aislada no es todavía claro. En los aislados que presentaron la mutación V118I no se encontró la mutación E44A/D y por sí misma al parecer no limita la actividad virológica de los regímenes que contienen lamivudina (83). En la mayoría de las secuencias de los genes de la Pr y de la RT se encontraron polimorfismos que hasta la fecha no se han relacionado con resistencia. La mutación K103R de la RT se presentó en 6 de las muestras, dicha mutación ocurre aproximadamente en 1% de portadores no tratados y por sí misma no causa resistencia (84). El gen de la RT presentó mayor número de polimorfismos por secuencia (8-21) comparado con el de Pr (0-13)

La prevalencia de mutaciones que confieren alto nivel de resistencia a los ARV observada en esta investigación es baja (3%) comparada con la reportada en otros estudios similares, en los que se ha reportado hasta un 27% (53), sugiriendo estos resultados que la transmisión de cepas resistentes del VIH es todavía rara en pacientes recién diagnosticados en esta región del país. Si bien en los reportes de América y Europa existen diferencias en la prevalencia de las variantes resistentes en personas con primoinfección, la mayoría de ellas pueden explicarse por los diferentes métodos utilizados para detectar la resistencia, por la variabilidad geográfica en los patrones de uso de los ARV y la variación en los factores de riesgo para la exposición al VIH. En un estudio sobre resistencia en pacientes libres de tratamiento en 40 ciudades de EE.UU, se encontró una asociación significativa entre la prevalencia de resistencia y la raza: 27%, 23% y 6% de blancos, negros e hispanos respectivamente, fueron portadores de cepas resistentes al menos a un agente antirretroviral. Esta asociación está probablemente relacionada con el acceso al tratamiento (59). Otros datos en EE.UU también sugieren que las mutaciones primarias asociadas con resistencia a los INRT, INNRT o IP (4.7%, 1.3% o 5.6% respectivamente, fueron poco comunes en sujetos sin tratamiento en poblaciones poco representativas (mujeres, usuarios de drogas intravenosas y prisioneros) (85). En Israel, analizaron 176 pacientes recién infectados por VIH sin tratamiento previo con ARV y encontraron que de los no portadores de mutaciones de resistencia, al menos 55% fueron pacientes infectados en ciudades donde no había disponibilidad de tratamiento y encontraron virus resistentes en 14.8% en los pacientes que tuvieron disponibilidad de los ARV

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

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

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

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES

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

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

BIBLIOGRAFÍA

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

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

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

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

- VIRA3001 Study Team. A randomized trial assessing the impact of phenotypic resistance testing on antiretroviral therapy. *AIDS* 2002; 16:579–588.
44. Tural C, Ruiz L, Holtzer C, Schapiro J, Viciano P, Gonzalez J, Domingo P, Boucher C, Rey-Joly C, Clotet B; Havana Study Group. Clinical utility of HIV-1 genotyping and expert advice: the Havana trial. *AIDS* 2002; 16:209–218.
 45. Meynard J L, M.Vray L, Monard-Joubert S, Matheron G, Peytavin F, Clavel F, Brun-Vezinet and PM, Girard. 40th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Toronto, Canada, abstract 698, p. 294, 2000.
 46. Melnick D J, Rosenthal M, Cameron M, Snyder S, Griffith-Howard K, Hertogs W, Verbiest N, Graham, and S.Pharm, Abstract 786, 7th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, San Francisco, Calif., 2000.
 47. EuroGuidelines group for HIV Resistance. 2001. Clinical and laboratory guidelines for the use of HIV-1 drug resistance testing as part of treatment management: recommendations for the European setting. *AIDS* 15:309–320.
 48. Hirsch MS, Brun-Vezinet F, D'Aquila RT, Hammer SM, Johnson VA, Kuritzkes DR, Loveday C, Mellors JW, Clotet B, Conway B, Demeter LM, Vella S, Jacobsen DM, Richman DD. Antiretroviral drug resistance testing in adult HIV-1 infection: recommendations of an International AIDS Society-USA Panel. *JAMA* . 2000; 283:2417–2426
 49. Alcorn TM, Faruki H. HIV resistance testing: methods, utility and limitations. *Mol Diagn* 2000; 5: 159-168.
 50. D'Aquila RT, Johnson VA, Welles SL, Japour AJ, Kuritzkes DR, DeGruttola V, et al. Zidovudine resistance and HIV-1 disease progression during antiretroviral therapy. AIDS Clinical Trials Group Protocol 116B/117 Team and the Virology Committee Resistance Working Group. *Ann Intern Med* 1995;122:401-8.
 51. Zolopa AR, Shafer RW, Warford A, Montoya JG, Hsu P, Katzenstein D, et al. HIV-1 genotypic resistance patterns predict response to saquinavir-ritonavir therapy in patients in whom previous protease inhibitor therapy had failed. *Ann Intern Med* 1999;131:813-21.
 52. Boden D, Hurley A, Zhang L, Cao Y, Guo Y, Jones E, Tsay J, Ip J, Farthing C, Limoli K, Parkin N, Markowitz M. HIV-1 drug resistance in newly infected individuals. *JAMA* 1999;282:1135-41.
 53. UK Collaborative Group on Monitoring the Transmission of HIV Drug Resistance Analysis of prevalence of HIV-1 drug resistance in

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

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

62. Susan J Little, Is transmitted drug resistance in HIV on the rise? *BMJ* 2001;322;1074-1075
63. Havlir DV, Hellmann NS, Petropoulos CJ, et al. Drug susceptibility in HIV infection after viral rebound in patients receiving indinavir-containing regimens. *JAMA*. 2000;283:229-234.
64. Sambrook J, Russel W.D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press USA. 83.
65. http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi
66. Rhee SY, Gonzales MJ, Kantor R, Betts BJ, Ravela J, Shafer RW. Human immunodeficiency virus reverse transcriptase and protease sequence database. *Nucleic Acids Res*. 2003; Jan 1;31(1):298-303.
67. http://hivdb6.stanford.edu/asi/deployed/hiv_central.pl?program=hivdb.
68. Hertogs K, Bloor S, Kemp SD, Van den Eynde C, Alcorn TM, Pauwels R, Van Houtte M, Staszewski S, Miller V, Larder BA. Phenotypic and genotypic analysis of clinical HIV-1 isolates reveals extensive protease inhibitor cross-resistance: a survey of over 6000 samples. *AIDS* 2000; Vol. 14, 1203-10.
69. Wu TD, Schiffer CA, Gonzales MJ, Taylor J, Kantor R, Chou S, Israelski D, Zolopa AR, Fessel WJ, Shafer RW. Mutation patterns and structural correlates in human immunodeficiency virus type 1 protease following different protease inhibitor treatments. *J Virol*. 2003; Vol. 77, 4836-47.
70. Perez EE, Rose SL, Peyser B, Lamers SL, Burkhardt B, Dunn BM, Hutson AD, Sleasman JW, Goodenow MM. Human immunodeficiency virus type 1 protease genotype predicts immune and viral responses to combination therapy with protease inhibitors (PIs) in PI-naive patients. *J Infect Dis*. 2001;Vol. 183, 579-88.
71. Alexander CS, Dong W, Chan K, Jahnke N, O'Shaughnessy MV, Mo T, Piaseczny MA, Montaner JS, Harrigan PR. HIV protease and reverse transcriptase variation and therapy outcome in antiretroviral-naive individuals from a large North American cohort. *AIDS*. 2001;Vol. 15, 601-7.
72. McCallister S, Kohlbrenner V, Squires K, Lazzarin A, Kumar P, DeJesus E, Nadler J, Gallant J, Walmsley S, Yeni P, Leith J, Dohnanyi C, Hall D, Sabo J, MacGregor T, Verbiest W, McKenna P, Mayers D. Characterization of the impact of genotype, phenotype,

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

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

82. Young SD, Britcher SF, Tran LO, Payne LS, Lumma WC, Lyle TA, Huff JR, Anderson PS, Olsen DB, Carroll SS, et al. L-743, 726 (DMP-266): a novel, highly potent nonnucleoside inhibitor of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995; Vol. 39, 2602-5.
83. Perno CF, Cozzi-Lepri A, Balotta C, Forbici F, Violin M, Bertoli A, Facchi G, Pezzotti P, Angarano G, Arici C, Narciso P, Orani A, Rause E, Scalzini A, Poggio A, Ippolito G, Moroni M, Monforte AD. Impact of mutations conferring reduced susceptibility to lamivudine on the response to antiretroviral therapy. *Antivir Ther.* 2001; Vol. 6, 195-8.
84. Rhee SY, Gonzales MJ, Kantor R, Betts BJ, Ravela J, Shafer RW. Human immunodeficiency virus reverse transcriptase and protease sequence database. *Nucleic Acids Res.* 2003; Vol. 31, 298-303.
85. McClemon D, Danehower S, Thompson M, Fischl M, H essentialer S, St. Clair M, Hernandez J. Low Prevalence of Key Resistance Mutations in Under-Represented and Incarcerated, Antiretroviral Therapy Naive, HIV-1 Infected Adults in North America. The 1st. IAS Conference on HIV Pathogenesis and Treatment 2001 Buenos Aires 2001.
86. Z. Grossman, M. Lorber, S. Maayan, N. Bar-Yacov, I. Levy, D. Averbuch, V. Istomin, M. Chowder, Z. Sthoeger, D. Ram, H. Rudich, F. Mileguir, R. Pavel, R. Almaliach, F. Schlaeffer, Z. Kra-Oz, E. Mendelson, J. M. Schapiro, and K. Riesenber. Drug-Resistant HIV Infection among Drug-Naive Patients in Israel. *HIV/AIDS • CID* 2005;40): 294-302.
87. Holodniy M, Charlebois ED, Bangsberg DR, Zolopa AR, Schulte M, Moss AR. Prevalence of antiretroviral drug resistance in the HIV-1-infected urban indigent population in San Francisco: a representative study. *Int J STD AIDS.* 2004 Aug;15(8):543-51.
88. Ribeiro RM, Bonhoeffer S, Nowak MA: The frequency of resistant mutant virus before antiviral therapy. *AIDS* 1998, 12:461-465.
89. Trabaud MA, Leriche-Guerin K, Regis C, Bordes I, Cotte L, Detmer J, Kolberg J, Ritter J, Trepo C. Prevalence of primary resistance to zidovudine and lamivudine in drug-naive human immunodeficiency virus type-1 infected patients: high proportion of reverse transcriptase codon 215 mutant in circulating lymphocytes and free virus. *J Med Virol.* 2000 Jul;61(3):352-9.
90. Stanley A. Schwartz* and Madhavan P. N. Nair Current Concepts in Human Immunodeficiency Virus Infection and AIDS. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, May 1999 6 (3): 295-305.

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

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Olivia M. Valle Bahena

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

Tesis:

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

Campo de estudio: Biología Molecular

Biografía

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

Padres: Antonio Valle Flores, Isaías Bahena Torrecilla

Educación:

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

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

