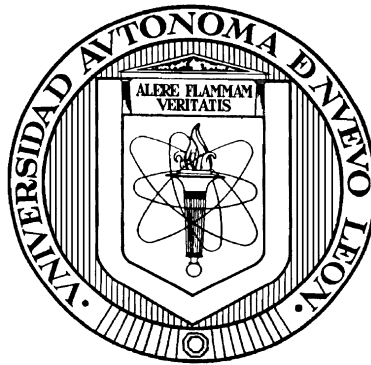


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA  
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS  
DE POSGRADO**



**COMPARACION DE LOS MARCADORES GENETICOS DEL  
VIH-1ASOCIADOS A RESISTENCIA A LOS ANTIRRETROVIRALES EN  
LÍQUIDO CEFALORRAQUIDEO Y SANGRE PERIFERICA**

**PRESENTADO**

**POR**

**Maestro en Ciencias JAVIER RAMOS JIMENEZ**

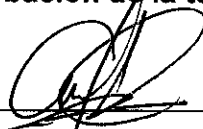
**Como requisito parcial para obtener el grado de**

**DOCTORADO EN MEDICINA**

**Julio de 2011**

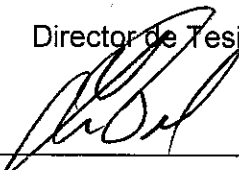
**Comparación de los Marcadores Genéticos del VIH-1 asociados a  
resistencia a los antirretrovirales en líquido cefalorraquídeo y sangre  
periférica**

**Aprobación de la tesis**



---

Dra. C. Ana María G. Rivas Estilla  
Director de Tesis



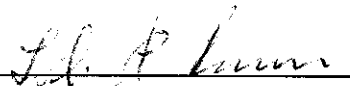
---

Dr. C. Lucio Vera Cabrera  
Miembro



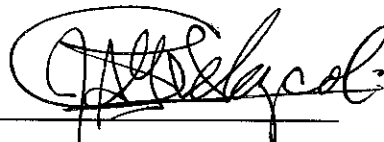
---

Dr. Med. Oliverio Welsh Lozano  
Miembro



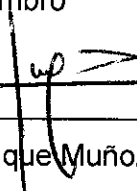
---

Dra. Med. Lilia Cárdenas Ibarra  
Miembro



---

Dr. C. Gerardo Velazco Castañón  
Miembro



---

Dr. Med. Gerardo Enrique Muñoz Maldonado  
Subdirector de Estudios de Posgrado

## **AGRADECIMIENTOS**

**A los miembros de la comisión de tesis** por sus objetivas valoradas y apreciadas observaciones, muy particularmente a la directora de la tesis **Dra. Ana María Rivas Estilla**, la investigadora de mayor capacidad con la que me ha tocado trabajar en mi vida profesional a quien me gustaría expresarle mi admiración y respeto.

**Al Dr. Julio Méndez**, quien a pesar de la distancia por su trabajo en la Clínica Mayo Jacksonville Florida USA. Siempre fue un apoyo académico muy importante y el haber gestionado apoyo material de la compañía Virco.

**Al Dr. Héctor Ramón Martínez Rodríguez**, por su orientación, asesoría y participación en la evaluación neurológica de los pacientes

**Al Dr. Hugo Alberto Barrera Saldaña**, por sus sabios y experimentados consejos y su temporal participación en la comisión de tesis.

**A mi esposa Lilia** por su apoyo no solo afectivo, moral y científico, pero por su comprensión y paciencia, **a mis hijos Javier, Daniel, Lilia y Laura** por su apoyo motivante para continuar superándome académicamente en esta etapa madura de mi vida.

Finalmente a 2 académicos que despertaron y cultivaron en mí el interés por la ciencia en mi etapa formativa. El **Dr. En Ciencias en Microbiología Manuel A. Rodríguez Quintanilla †** jefe del departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la UANL donde realice mi servicio social en 1976-1977. Y al **Dr. En Ciencias en Microbiología Robert P. Williams †** del departamento de Microbiología de Baylor College of Medicine Houston Texas USA.y presidente de la American Society for Microbiology con quien realice trabajo post-doctoral de 1984-1986

# TABLA DE CONTENIDO

<b>CAPITULO I</b>	<b>Página</b>
<b>1. RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>CAPITULO II</b>	
<b>2. INTRODUCCION</b>	<b>3</b>
<b>CAPITULO III</b>	
<b>3. HIPOTESIS</b>	<b>19</b>
<b>CAPITULO IV</b>	
<b>4. OBJETIVOS</b>	<b>20</b>
<b>CAPITULO V</b>	
<b>5. MATERIAL Y METODOS</b>	<b>21</b>
<b>CAPITULO VI</b>	
<b>6. RESULTADOS</b>	<b>31</b>
<b>CAPITULO VII</b>	
<b>7. DISCUSION</b>	<b>46</b>

## **CAPITULO VIII**

<b>8. CONCLUSION</b>	<b>50</b>
----------------------	-----------

## **CAPITULO IX**

<b>9. ANEXOS</b>	<b>51</b>
------------------	-----------

## **CAPITULO X**

<b>10. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>55</b>
-------------------------	-----------

## **CAPITULO XI**

<b>11.RESUMEN AUTOBIOGRAFICO</b>	<b>60</b>
----------------------------------	-----------

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
<b>1</b>	<b>Antirretrovirales 2011</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>Características de los 18 pacientes estudiados</b>	<b>32</b>
<b>3</b>	<b>Mutaciones detectadas en LCR y Plasma del mismo Paciente</b>	<b>34</b>
<b>4</b>	<b>Relación de mutaciones en LCR y Plasma en los 9 Pacientes con ambas amplificaciones</b>	<b>35</b>
<b>5</b>	<b>Mutaciones detectadas únicamente en LCR o Plasma</b>	<b>37</b>
<b>6</b>	<b>Mutaciones frecuentes con MMSE bajo</b>	<b>41</b>
<b>7</b>	<b>Mutaciones frecuentes con MMSE bueno</b>	<b>42</b>
<b>8</b>	<b>Mutaciones con distribución Indiferente al MMSE</b>	<b>43</b>
<b>9</b>	<b>Resumen de Mutaciones y MMSE Bajo Y bueno</b>	<b>44</b>
<b>10</b>	<b>Mutaciones según aminoácido reemplazante y MMSE</b>	<b>45</b>

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
<b>1</b>	<b>Foto de Microscopia Electrónica del VIH-1</b>	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>Organización genómica del VIH-1</b>	<b>7</b>
<b>3</b>	<b>Grupos y Subtipos Genéticos del VIH-1</b>	<b>8</b>
<b>4</b>	<b>Distribución Mundial de Sub-tipos del VIH-1</b>	<b>9</b>
<b>5</b>	<b>Cambios en la incidencia de la Infección por VIH-1</b>	<b>13</b>
<b>6</b>	<b>Estimación de personas que viven en México y su Relación con los servicios de salud, 2009</b>	<b>14</b>
<b>7</b>	<b>Mutaciones primarias y secundarias en los 18 Pacientes y MMSE</b>	<b>39</b>



## **LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>LCR</b>	<b>Líquido Cefalorraquídeo</b>
<b>SNC</b>	<b>Sistema Nervioso Central</b>
<b>VIH-1</b>	<b>Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1</b>
<b>VIH-2</b>	<b>Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 2</b>
<b>CENSIDA</b>	<b>Centro Nacional para la Prevención y Control del VIH/SIDA</b>
<b>TAC</b>	<b>Tomografía Axial Computarizada</b>
<b>RMN</b>	<b>Resonancia Magnética Nuclear</b>
<b>ADN</b>	<b>Acido Desoxirribo Nucléico</b>
<b>PCR</b>	<b>Reacción en Cadena de la Polimerasa</b>
<b>ARV</b>	<b>Antirretrovirales</b>

## CAPITULO I

### 1. RESUMEN

**Introducción:** Uno de los estímulos más potentes para el desarrollo de resistencia del VIH-1 es la exposición a bajas concentraciones del medicamento, considerando la dificultad que tienen la mayoría de los medicamentos antirretrovirales actuales en penetrar la barrera hematoencefálica. (8) Exploramos la posibilidad de encontrar diferentes patrones de resistencia del VIH-1 en plasma y en líquido cefalorraquídeo (LCR) en los mismos individuos.

**Material y Métodos:** Veinte pacientes que ya habían recibido tratamiento antirretroviral fueron incluidos en el estudio. Una historia clínica completa y una evaluación neurológica incluyendo la aplicación del Mini-Mental de Folstein. (17) 10 ml de sangre y 2cc de LCR para realizar conteo de linfocitos CD4 y el genotipo de resistencia en ambos líquidos por Cartometría de Flujo y RT-PCR respectivamente.

**Resultados:** 18 hombres y 2 mujeres con al menos 2 tratamientos se incluyeron, la cuenta absoluta de linfocitos CD4 mostro un rango de 17 a 198 con un promedio de 75 células /mm<sup>3</sup>. El rango en el puntaje del Mini-Mental fue de 10 a 32 con un promedio de 24 puntos. La mayoría de las mutaciones encontradas en ambos sitios fueron iguales pero hubo algunas encontradas solo en LCR o en plasma. La mutación K103R que en Estados Unidos (EU) se presenta solo en 2 a 5% se encontró en el 33% de los pacientes estudiados. Todos los pacientes mostraron un severo daño inmunológico pero este no se pudo relacionar con alguna mutación en particular. El puntaje del Mini-Mental fue normal en 12 y anormal en 8 pacientes, las anomalías no se correlacionaron con ninguna mutación en especial.

**Conclusiones:** Una posible explicación para no haber encontrado diferencias significativas en los patrones de resistencia en ambos líquidos es que posiblemente la presión selectiva para el desarrollo de resistencia por parte de los antirretrovirales se lleva a cabo fuera del Sistema Nervioso central y aun que es necesario que otros estudios confirmen estos datos, es probable que los antirretrovirales actuales sean efectivos aunque no logren niveles importantes en el LCR. Es importante monitorizar la resistencia del VIH-1 localmente para detectar cambios regionales de importancia médica.

## **CAPITULO II**

### **2. INTRODUCCION**

#### **2.1 ANTECEDENTES**

La primera vez que se reportaron pacientes adultos severamente inmunosuprimidos que llevaron a la identificación del Síndrome de inmunodeficiencia adquirida fue en 1981(1), dos años después se identificó uno de los virus responsables el Virus de la Inmunodeficiencia Humano tipo 1(VIH-1) (2) Figura 1. En 1986 se identifica un segundo virus en la porción occidental del continente africano el Virus de la Inmunodeficiencia Humano tipo 2(VIH-2) (3). Actualmente la epidemia incluye a todos los países del mundo, afectando más severamente a los países en vías de desarrollo. En nuestro país hasta la fecha solo se han identificado pacientes infectados con el VIH-1.

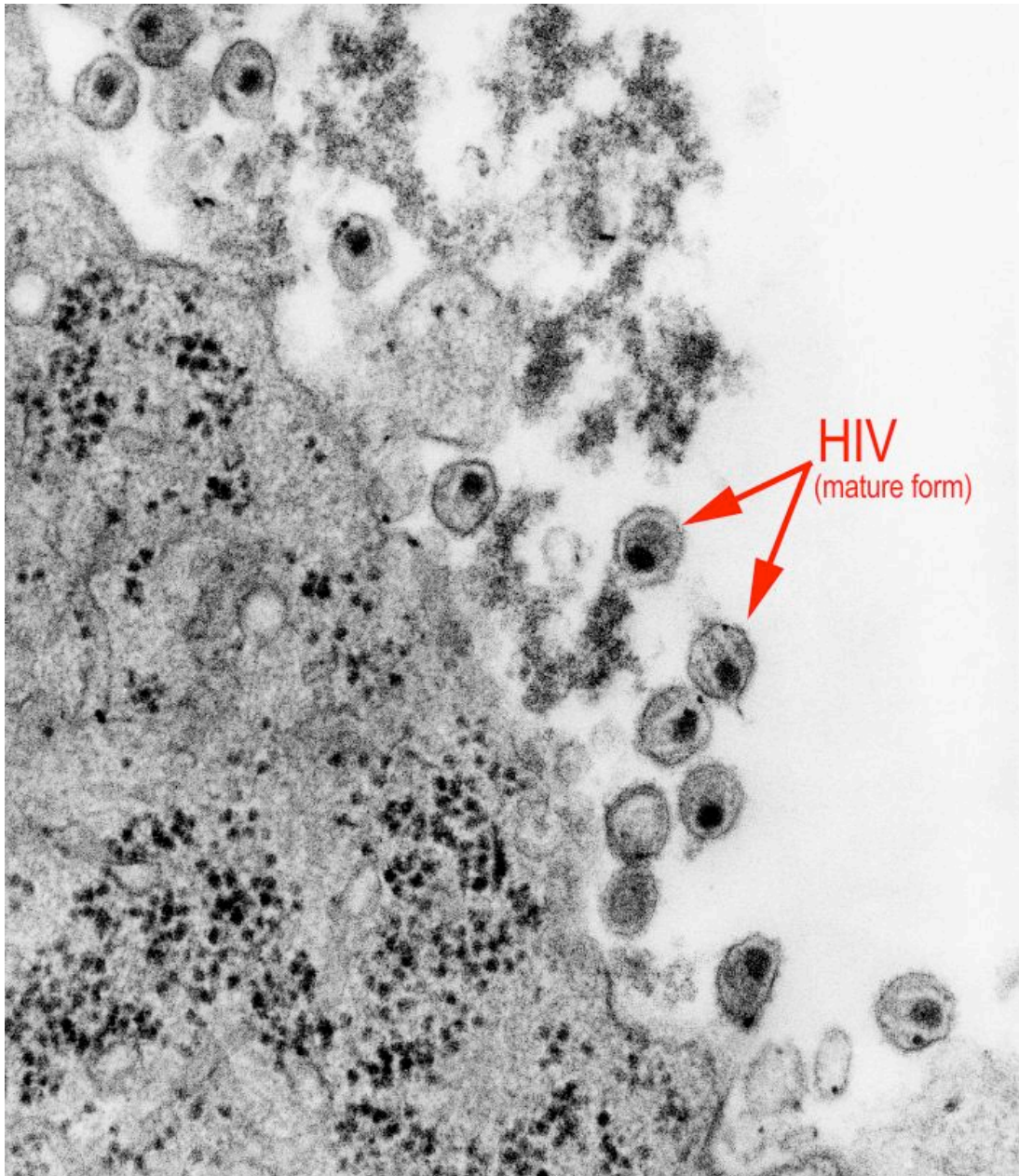


Figura 1. Foto de Microscopia Electrónica del VIH-1 cortesía del CDC (Centers for diseases control and Prevention. Atlanta G.A. USA)

El virus de inmunodeficiencia humana (VIH ) pertenece a la familia Retroviridae, subfamilia Lentiviridae, estructuralmente, la partícula vírica mide entre 80-110 nanómetros, la partícula infecciosa está formada por dos cadenas idénticas de ARN (ácido ribonucleico), cada una aproximadamente de 9.2 kilo bases (Kb) de longitud, empaquetadas dentro de un core de proteínas virales, rodeadas de una envoltura

formada por una bicapa fosfolipídica derivada de la membrana celular del huésped, aunque incluye proteínas de membrana codificadas por el virus( 4). El genoma del VIH comparte la disposición básica de secuencias de ácidos nucleicos característica de todos los retrovirus conocidos, que incluyen los siguientes elementos: Repeticiones terminales largas (LTR) al final de cada genoma, que regulan la integración viral en el genoma del huésped, la expresión génica del virus y la replicación viral; los genes gag que codifican las proteínas estructurales del core, los genes pol que codifican para la transcriptasa inversa, endonucleasas y proteasas virales requeridas para la replicación viral y los genes env que codifican las glicoproteínas de envoltura gp 120 y gp 41, requeridas para la infección de las células. Además de estos genes, el VIH incluye al menos seis genes reguladores, que incluyen: vpr, vif, tat, rev, nef y vpu, cuyos productos controlan la replicación viral de varias maneras. El VIH-2 contiene estos genes, excepto el vpu y tiene otro gene, el vpx que está ausente en el VIH-1 (ver Figura 2). Clasificación del VIH-1, se conocen dos tipos de virus identificados como los agentes etiológicos del SIDA y que se han denominado Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH). Estos dos tipos de virus son genética y antigénicamente diferentes y se han llamado VIH-1 y VIH-2. El VIH-1 se le considera como el responsable de la epidemia mundial y el VIH-2 es considerado como endémico del África Occidental (Camerún, Costa de Marfil y Senegal), es raro encontrarlo fuera de esta región, sin embargo se le ha identificado en otras partes del mundo incluyendo Norteamérica (USA y Canadá), las primeras evidencias de la presencia de este retrovirus tipo 2 fueron proporcionadas en 1985 por el Dr. Max Essex y Dra. Phyllis Kanki, ambos profesores de la Escuela de Salud Pública de la Universidad de Harvard. Los genomas de VIH-1 y VIH-2 tienen una similitud entre un 40-50% y el VIH-2 está mas relacionado al virus de Inmunodeficiencia del simio (VIS), ya que presenta una homología del 75%. Aunque la organización genómica y la función de los productos genéticos codificados por el VIH-2 son muy similares al VIH-1, el virus de inmunodeficiencia tipo 2 manifiesta diferir en algunas propiedades biológicas cuando se le compara con el virus de

inmunodeficiencia tipo 1, sin embargo ambos virus ocasionan una enfermedad clínicamente indistinguible, se diferencia del virus tipo 1 en: que presenta una patogenicidad más baja, el período de incubación de la infección es más largo, el tiempo de progresión a SIDA es más lento, el tiempo de supervivencia con la enfermedad es más largo y por ende la enfermedad es menos agresiva, es menos citopático, menos virulento, la transmisión heterosexual y vertical (madre a hijo) es más baja, no se transmite tan eficientemente como el VIH-1, está asociado con una baja eficiencia de replicación viral, el cual pudiera explicar la latencia clínica más larga y una transmisibilidad más baja.

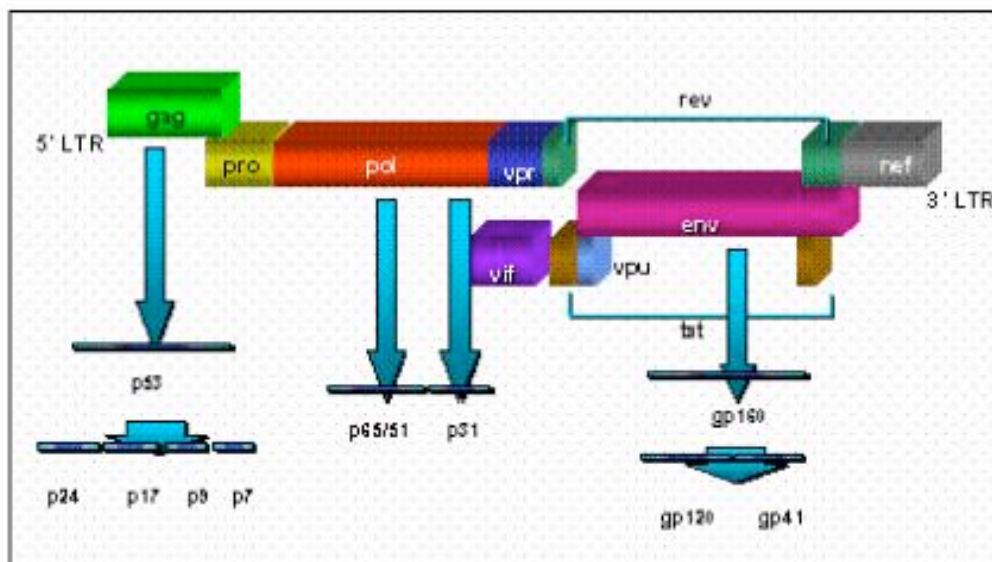
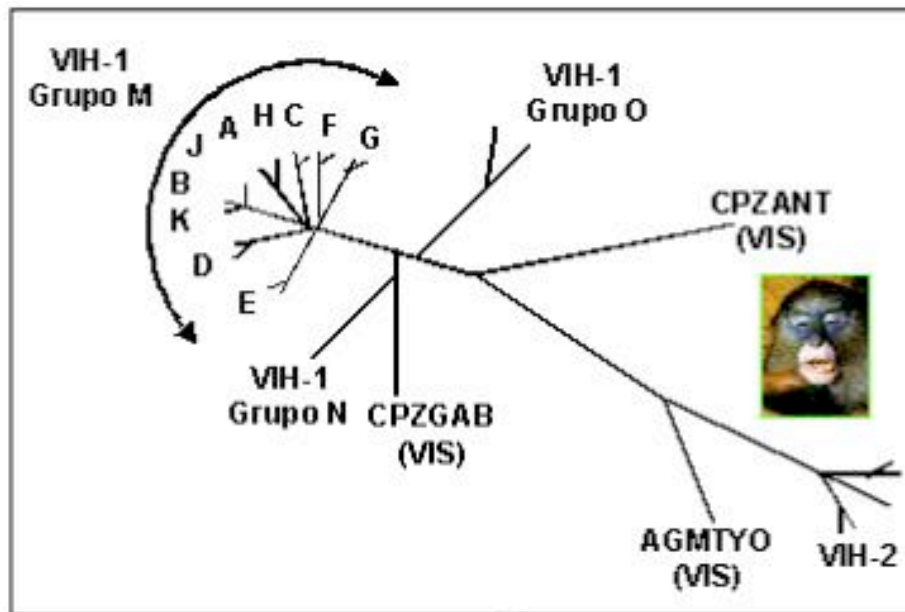


Figura 2. Organización genómica del VIH-1

El VIH-1 exhibe una gran variación genética a través de tres diferentes grupos: M (mayor), O (outlier), y N (nuevo) (ver Figura 3). Las relaciones genéticas equidistantes de los genes env del VIH-1 se han definido dentro del grupo M, y comprenden los subtipos que se han denominado por las letras mayúsculas de la A-K. La predominancia de uno o varios de los subtipos del VIH-1 se ha visto que

esta asociada con ciertas regiones geográficas. Dentro del grupo O se han identificado al menos 5 subtipos, este grupo es considerado como muy heterogéneo y presenta una homología menor al 50% con el grupo M del VIH-1. También se conocen al menos cinco subtipos del VIH-2. La diferencia principal de los subtipos es su composición genética, con divergencias del orden del 30-40% en el gene de envoltura y de un 12-15% en el gene gag (core).



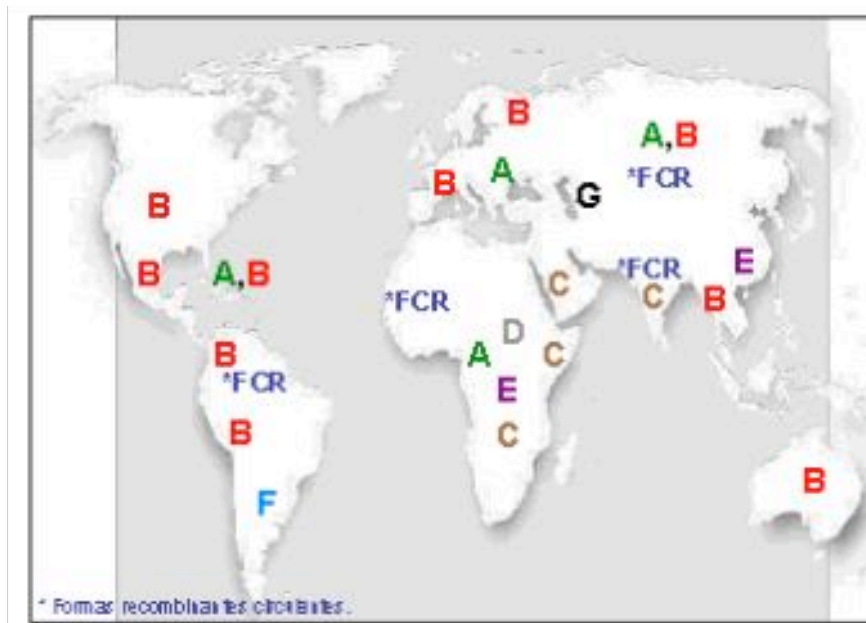
**Figura 3. Grupos y Subtipos Genéticos del VIH-1 y su relación con el VIH-2 y VIS.**

Los subtipos de VIH-1 del grupo M son grupos filogenéticamente asociados y son llamados subtipos A-K. Estos subtipos representan diferentes linajes de VIH, y tienen algunas asociaciones geográficas. Los subtipos están distribuidos por todo el mundo, en África donde se piensa que la infección es más antigua, coexisten prácticamente todos los subtipos, y los que predominan son el C, el A, el D, las formas recombinantes circulantes (FRC) como el subtipo E, además de la presencia del grupo O y N.

Por otro lado en América Latina al igual que en Estados Unidos, México, el Caribe, América del Centro y Sur y en Europa los virus circulantes son principalmente subtipo B. Existen reportes de la presencia del subtipo F en Brasil. El predominio regional de los subtipos del VIH-1, no se ha podido explicar de un modo



satisfactorio, se cree que es el resultado inevitable de la movilidad de la población. La distribución mundial de los subtipos es representada en la Figura 4. La diversidad genética de los subtipos de VIH está dada por dos acontecimientos muy importantes que son mutación y recombinación genética, los que se manifiestan a lo largo de un genoma viral de 10,000 pares de bases, la enorme diversidad genética del VIH-1 puede ser atribuida a una extensión sin precedentes en la replicación viral, y a alto índice de error en el proceso de replicación viral efectuado por la enzima transcriptasa reversa del VIH-1 (4) (5).



**Figura 4 Distribución Mundial de Sub-tipos del VIH-1**

La epidemia en la región del Sub-Sahara en África es debida principalmente a subtipos que no pertenecen al subtipo B (llamados también como subtipos non-B) el principal subtipo circulante en esta región, es el C, el cual ha crecido explosivamente desde 1990, otros subtipos que también se han encontrado en esta región, son A, D, E y el subtipo menos prevalente es el (32)

Existen diferencias importantes entre los diferentes subtipos de VIH-1, se han encontrado importantes evidencias de que el subtipo C, estudios recientes

efectuados por Kanki y colaboradores de la Universidad de Harvard, han encontrado que el virus subtipo C presente en África puede causar una progresión más rápida de la enfermedad a diferencia de otros subtipos que existen en la misma población (33)

El VIH-1 subtipo B predomina en regiones geográficas donde las vías de transmisión son principalmente a través de contacto homosexual y de uso drogas intravenosas; en cambio subtipos no B como el C y el E predominan en regiones donde prevalece la transmisión heterosexual.

La presencia de subtipo B en México fue confirmada por el estudio que se efectuó sobre la Epidemiología Molecular del VIH-1 en México (4). Rivera y colaboradores se enfocaron en el estudio de la secuenciación y el análisis filogenético de la región C2-V5 del gene env del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1, ya que esta región es estudiada como blanco principal para identificar los subtipos y puede además proveer información conocida o potencialmente nueva de los subtipos que se encuentran circulando en una área geográfica determinada , los virus estudiados en esta publicación fueron obtenidos de 65 individuos infectados con VIH-1, se seleccionaron de manera aleatoria de cinco regiones geográficas de México: al Norte (Nuevo León), Sur (Jalisco), Este (Yucatán), Oeste (Puebla) y Centro (Ciudad de México). Este estudio reportó que el subtipo predominante en México fue el B , sin embargo los resultados de este estudio son limitados debido al pequeño tamaño de la muestras estudiadas en cada sitio y obviamente no excluye la presencia de otros subtipos en nuestro país, es importante mencionar que de este estudio las 65 secuencias del los virus estudiados fueron depositados en la base de datos del Banco de Genes con los

siguientes números de acceso: AF200855-AF200869, AF200871-AF200892, y AF200894-AF200921.

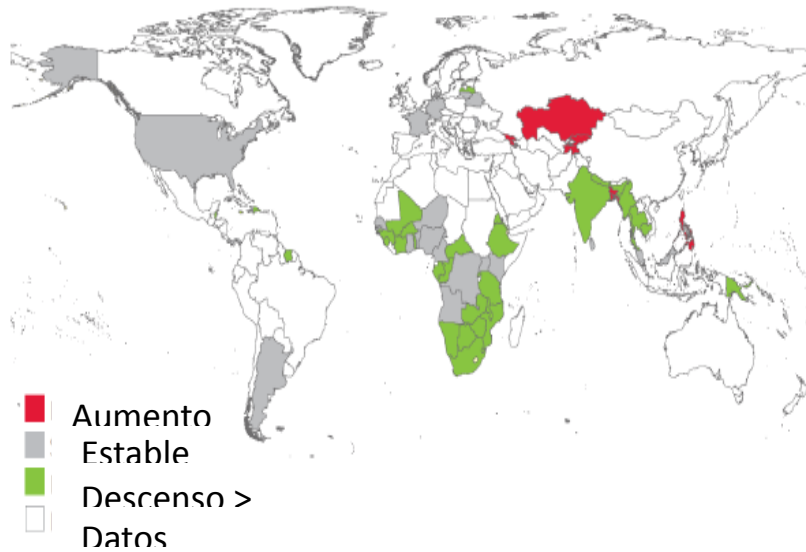
Es importante mencionar que en el año 2003 fue identificada la presencia del subtipo C en un paciente sudafricano que estuvo viviendo en nuestro país durante 8 años, este paciente falleció en la semana en que tomamos la muestra para su estudio, este subtipo que encontramos es el que predomina en África y no se ha encontrado en México, por lo que se dedujo que este individuo ya venía con la enfermedad y la preocupación nuestra y el impacto de este conocimiento es en el número de infectados con este subtipo que viven actualmente en México y que aún se desconoce, por lo que es importante seguir monitoreando molecularmente la epidemia del SIDA en México, para encontrar la presencia de otros subtipos no pertenecientes al B (non B) incluyendo al subtipo C en la población mexicana, como ya ha ocurrido en otros países(34)

El virus de inmunodeficiencia humana es un virus diploide: cada virión contiene dos tiras de ARN, la recombinación homóloga puede llevarse a cabo cuando una célula es co-infectada con dos subtipos diferentes pero relacionados, este mecanismo ocurre naturalmente y se manifiestan en individuos infectados con VIH que viven en regiones del mundo donde múltiples variantes genotípicas co-circulan. Cepas de VIH recombinantes se han diseminado a miles de personas en África y en el sureste de Asia.(35)

La recombinación puede ser una importante estrategia en el proceso evolutivo del VIH, muchos de los subtipos alrededor del mundo manifiestan haberse recombinado, este proceso puede ser un importante mecanismo por el cual el virus evade la respuesta inmune y pueden además ser generadas cepas multidrogasresistentes a los antirretrovirales.

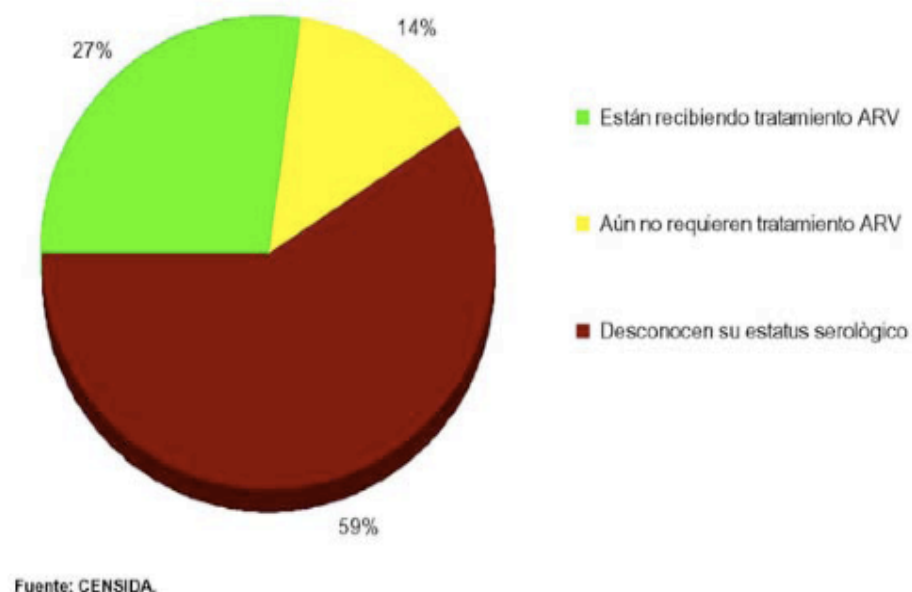
De acuerdo al último reporte anual de la Organización Mundial de la Salud hecho público el día mundial de información sobre SIDA el 1 de Diciembre del 2010 con los datos del 2009, existen en el mundo 33.3 millones de personas viviendo con VIH/SIDA de los cuales 30.8 Millones son adultos y 2.5 millones niños, en ese mismo año ocurrieron 2.6 Millones de nuevas infecciones y fallecieron 1.8 Millones de personas (6).

La prevalencia mundial de la infección por VIH se ha mantenido casi en el mismo nivel, aunque el número de personas que viven con este virus está aumentando, debido a los periodos más prolongados de supervivencia y al equilibrio dado entre las nuevas infecciones y el número de defunciones por año. Sin embargo la incidencia de la infección en la última década ha mostrado tendencia dispareja ya que en algunas áreas geográficas se ha incrementado, en otras ha permanecido estable y en algunas ha disminuido. Desafortunadamente hay un número importante de países en los no hay suficientes datos para determinar la tendencia. Ver Figura 5.



**Figura 5. Cambios en la incidencia de la Infección por VIH-1 del 2001 al 2009**

De acuerdo al CENSIDA (Centro Nacional para la Prevención y el Control del VIH/SIDA), se estimaba que hasta el 31 Marzo del 2011 aproximadamente 225,000 personas adultas en nuestro país vivían con VIH y el número acumulado de casos de SIDA era de 148,130 (36). Se estima que el 59% de las personas infectadas desconocen su estado serológico ver Figura 6. México es un país con epidemia de SIDA concentrada, donde los grupos de mayor riesgo son los formados por hombres que tienen sexo con hombres, usuarios de drogas inyectables y profesionales del sexo. En el Hospital Universitario de la U.A.N.L., en el periodo de Marzo 2002 a Enero del 2004 se atendieron 137pacientes en la consulta externa y 131 hospitalizados con esta patología.



**Figura 6 Estimación de personas que viven con VIH-1 en México y su relación con los servicios de salud, 2009**

La historia de la terapia antirretroviral inicia en 1987 con el uso de el AZT( Zidovudina) como mono terapia y posteriormente terapia combinada con dos y desde mediados de los noventas tratamiento triple, una de las preocupaciones ha sido el desarrollo de resistencia viral (7), desgraciadamente dicho temor de ha vuelto realidad debido a múltiples factores tales como: la prescripción incorrecta, dosis sub-optimas, las interrupciones voluntarias o involuntarias de los medicamentos, las interacciones medicamentosas o la penetración limitada a sitios anatómicos de difícil acceso (8) para la mayoría de los 24 medicamentos actualmente disponibles (tabla 1).

**Inhibidores de TR análogos de Nucleótidos**

- Abacavir (ABC)
- Didanosine (ddI)
- Emtricitabine (FTC)
- Lamivudine (3TC)
- Stavudine (d4T)
- Tenofovir (TDF)
- Zidovudine (AZT, ZDV)

**Inhibidores de TR No Análogos de los Nucleótidos**

- Delavirdine (DLV)
  - Efavirenz (EFV)
  - Etravirine (ETR)
  - Nevirapine (NVP)
- Rilpivirine aprobado Mayo 2011

**Inhibidores de la Proteasa**

- Atazanavir (ATV)
- Darunavir (DRV)
- Fosamprenavir (FPV)
- Indinavir (IDV)
- Lopinavir (LPV)
- Nelfinavir (NFV)
- Ritonavir (RTV)
- Saquinavir (SQV)
- Tipranavir (TPV)

**Inhibidor de Integrasa**

- Raltegravir (RAL)

**Inhibidor de Fusión**

- Enfuvirtide (ENF, T-20)

**Antagonista CCR5**

- Maraviroc (MVC)

**Tabla 1. Antirretrovirales 2011**

En la actualidad para determinar la resistencia del VIH se utilizan dos metodologías (9), la primera llamada genotipificación consiste en detectar mutaciones que codifican para resistencia a uno o varios medicamentos. Este procedimiento se lleva a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa. Actualmente esta metodología se encuentra estandarizada e incluso existen reactivos comercialmente disponibles para los tres principales grupos inhibidores de transcriptasa reversa análogos de los

nucleótidos, inhibidores de transcriptasa reversa no análogos de los nucleótidos e inhibidores de las proteasas.

La Fenotipificación es la otra metodología que se basa en hacer aislamientos virales y exponerlos a diferentes concentraciones de los medicamentos para ver la concentración que se requiere para inhibir la replicación viral. Sin embargo esta técnica es sumamente costosa, no existe estandarización y solo unos cuantos laboratorios de investigación en el mundo las tienen disponibles (10).

Las complicaciones neurológicas del VIH son comunes y no son únicamente infecciones oportunistas, todos los niveles del neuroeje pueden estar involucrados incluyendo Cerebro, meninges, medula espinal y nervios periféricos, la invasión de algunas quasiespecies del VIH al sistema nervioso central desde las etapas tempranas de la infección es un hecho bien conocido replicándose en el sistema de sostén como los oligodendrocitos. Las alteraciones neurológicas se presentan en el 10% como el síntoma inicial de SIDA, el 60% de pacientes con enfermedad avanzada por VIH van a tener alguna disfunción neurológica en el curso de su enfermedad, pero las series de autopsias muestran que el sistema nervioso se encuentra involucrado con daño histopatológico en el 80% de los casos (11).

La barrera hematoencefálica que protege la SNC de algunos patógenos circulantes en sangre, también funciona como una barrera farmacológica que impide la penetración de múltiples medicamentos entre ellos la mayoría de los antirretrovirales más potentes como los inhibidores de



proteasas (12), por lo que se puede inferir que los patrones de resistencia circulantes y en LCR pudieran ser diferentes con importantes implicaciones clínicas.

## **2.2 IMPORTANCIA**

Desde que se inicio a usar Azidotimidina (AZT) en contra del virus en 1986, el desarrollo de resistencia por parte del virus se documento al poco tiempo de salir al mercado. En 1991 se agregan Didanosina (DDI), Dedeoxicitosina (DDC), después Lamividina (3TC) y Estavudina (D4T) observándose también el fenómeno de resistencia, para 1994 se intento afrontar el problema combinado 2 medicamentos y para 1996 con el advenimiento de los inhibidores de proteasas (Saquinavir, Indinavir, Ritonavir) se estableció el beneficio de la terapia triple (13).

Sin embargo el implementar estos tratamientos masivamente y en forma permanentemente ha encontrado múltiples dificultades como falta de apego, acceso, efectos, colaterales, interacciones medicamentosas, y aun en las mejores condiciones del desarrollo de resistencia es uno de los problemas clínicos mas frecuentes que se encuentran en la atención de los pacientes con VIH/SIDA en la actualidad (14).

### **2.3 ORIGINALIDAD**

La información actualmente disponible en esta área es muy limitada a algunas observaciones en grupos pequeños de pacientes y detectando solo resistencia a los inhibidores de transcriptasa reversa análogos de los nucleótidos (15), por lo que un estudio de muestras simultáneas circulantes y del LCR que estudie las mutaciones que codifican para resistencia a los tres grupos de antirretrovirales en un grupo de pacientes es necesario para comprender mejor y a la vez permitir el desarrollo de mejores soluciones a esta parte compleja del tratamiento de los pacientes con VIH/SIDA.

### **2.4 JUSTIFICACION**

Las alteraciones neurológicas en la infección por VIH fueron reconocidas desde que se presentaron los primeros casos a principios de los ochentas, y son particularmente frecuentes desde estudios tempranos y más aun en los estadios avanzados en donde el virus, las infecciones oportunistas, las neoplasias y aun los medicamentos pueden dar manifestaciones centrales y/o periféricas (16). Siendo otro de los problemas clínicos frecuentes que el médico que atiende pacientes con VIH/SIDA tiene que atender a diario y que por lo tanto se requiere ampliar los conocimientos en el área de investigación.

## **CAPITULO III**

### **3. HIPOTESIS**

El patrón de resistencia del Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo-1, a los medicamentos antirretrovirales es diferente en el Sistema Nervioso Central al de los virus circulantes en sangre periférica.

## **CAPITULO IV**

### **4. OBJETIVOS**

#### **Objetivo General**

Analizar el fenómeno de resistencia del VIH-1 a los medicamentos antirretrovirales comparando las mutaciones presentes en el Sistema Nervioso Central con las mutaciones presentes en sangre periférica en sujetos infectados.

#### **Objetivos Específicos**

1. Realizar un estudio de PCR y secuenciación de los genomas virales aislados en los pacientes.

2. Detectar las mutaciones de los genes que codifican para resistencia del VIH-1 a los antirretrovirales en los virus circulantes en el Líquido Cefalorraquídeo y en la sangre periférica de sujetos infectados.

3. Determinar el estado inmunológico de los pacientes reclutados en el estudio y establecer si existe alguna asociación con las mutaciones de resistencia detectadas...

4. Determinar el estado clínico de las funciones cerebrales superiores de los pacientes incluidos en el estudio y establecer si existe alguna asociación en las mutaciones de resistencia en los sujetos analizados.

## CAPITULO V

### 5. MATERIAL Y METODOS

#### 5.1 DISEÑO METODOLOGICO

El diseño del estudio es **Observacional, Transversal y Prospectivo**.

El estudio fue aprobado por el Comité de Investigación y Ética de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario “Dr. José E. González” de la UANL.

El número de pacientes esta limitado por las características especiales que se requiere que tengan para ser incluidos. El muestreo se realizó en una sola ocasión en la que simultáneamente se tomaron las muestras de sangre y liquido cefalorraquídeo, las cuales se almacenaron adecuadamente para evitar degradación de ácidos nucleicos (-86°C) o bien fueron procesadas en forma inmediata en los laboratorios.

#### **Número de Pacientes, Base de Datos y Confidencialidad**

A partir de la información recabada de cada una de las pacientes se generó una base de datos que se utilizó para realizar estudios epidemiológicos y de asociación de las características clínicas y los hallazgos experimentales. La identificación de cada una de las pacientes fue a través de la asignación de una clave confidencial y se ha mantenido en el

anonimato y la confidencialidad en todo momento. A los datos de nombres y claves confidenciales solo tiene acceso el responsable del proyecto.

## 5.2 DESCRIPCION DEL DISEÑO

Para lograr los objetivos propuestos se incluyeron 20 pacientes adultos de ambos géneros infectados con VIH-1, Internados y de consulta externa del Hospital Universitario, con por lo menos una alteración neurológica, en cada individuo:

- Se obtuvo consentimiento informado del paciente o familiares.
- Se realizó una historia clínica y un examen físico completo.
- Se obtuvo información sobre medicamentos antirretrovirales.
- Se efectuó una evaluación neurológica por dos observadores independientes.
- A cada uno de los sujetos incluidos en el estudio se le extrajeron 10ml de sangre periférica para aislar el genoma del VIH-1, Posteriormente se amplificó diferentes regiones del genoma viral mediante PCR y los productos de amplificación se secuenciaron para buscar las mutaciones en los genes que codifican para resistencia a los tres grupos de antirretrovirales. (Inhibidores de Transcriptas Reversa Análogos de los Nucleótidos, Inhibidores de

Transcriptas Reversa No Análogos de los Nucleótidos e inhibidores de Proteasas.)

- Se les realizó una punción lumbar para obtener líquido cefalorraquídeo al que se le realizaron: estudios cito químico, VDRL, tinta china, Gram., KOH, BAAR, cultivo ordinario, cultivo para hongos y cultivo para Micro bacterias. Un tubo adicional se obtuvo en forma estéril para aislar el genoma del VIH-1 y proceder como se menciona para buscar las mutaciones que codifican para resistencia a los tres grupos de antirretrovirales. (Inhibidores de Transcriptas Reversa Análogos de los Nucleótidos, Inhibidores de Transcriptas Reversa No Análogos de los Nucleótidos e inhibidores de Proteasas.)

- Se le determinó la cuenta absoluta de linfocitos CD-4 a partir de la misma muestra de sangre mediante citometría de flujo.

- Se aplicó la encuesta minimal de Folstein (Anexo I)

- Se realizó un estudio de Neuroimagen (TAC o RMN)

**Evaluación neurológica:** Se realizó la evaluación Mini-mental de Folstein (MMSE) con el fin de estudiar el deterioro de la función cognitiva en los pacientes estudiados o prueba se aplicó a cada sujeto (17). La prueba

MMSE incluye preguntas simples y problemas en varias áreas: la hora y el lugar de la prueba, las listas de repetición de palabras, la aritmética, tales como series de siete, el uso del lenguaje y la comprensión y las habilidades motrices básicas.

#### **Recuento de CD4.**

Una alícuota de las muestras de sangre fueron utilizadas para el recuento de células CD4 + T-linfocitos mediante citometría de flujo (Partec, GmbH, Alemania).

### **5.3 RECURSOS BIOLÓGICOS**

Las muestras biológicas que se obtuvieron son líquido cefalorraquídeo, y sangre de las que se realizaron extracción de ácidos nucleicos.

A cada una de las personas incluidas en este estudio se le extrajo una muestra de sangre periférica, obtenida por punción venosa en una única ocasión, empleando tubos vacutainer con EDTA, así como material desechable estéril. La cantidad de muestra que se obtuvo fue de 10 ml.

Inmediatamente después de tomada la muestra, ésta se colocó en hielo y fue transportada al Laboratorio de Infectología Molecular del Depto. de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina UANL, en donde se centrifugó para separar el plasma y el paquete leucocitario.



Del plasma se hicieron diferentes alícuotas, las cuales fueron colocadas en tubos eppendorf, etiquetadas y conservadas a  $-70^{\circ}\text{C}$ , hasta su análisis molecular.

#### **5.4 RECURSOS MATERIALES**

El Servicio de Infectología del Hospital Universitario, una sala de juntas con pizarrón y negatoscopios, dos oficinas para profesores, un laboratorio y un cubículo con dos computadoras para residentes de especialidad y subespecialidad, la consulta externa se realizara en la consulta de Especialidades de Medicina Interna #12, los lunes, miércoles y viernes.

El Laboratorio de Infectología Molecular del Departamento de bioquímica cuenta con equipos especializados para realizar metodologías de Biología Molecular como son: extracción, amplificación y secuenciación de ácidos nucleicos, a partir de muestras biológicas como sangre, LCR, saliva, orina, etc.

#### **5.5 PROTOCOLO DE EXTRACCION DEL GENOMA DEL VIH-1 DEL LQUIDO CEFALORRAQUIDEO Y PLASMA**

El aislamiento de ARN viral se obtuvo de plasma tratado con EDTA usando el paquete de extracción viral QIAmp (Qiagen Inc., Chatsworth, California USA) se siguieron las instrucciones del fabricante.

## 5.6 GENOTIPIFICACION

A continuación, el ADN complementario se generó y se amplificó a través de la transcriptasa inversa-PCR (RT-PCR). La prueba de genotipo de resistencia se realizó en todos los pares de muestras de LCR y el plasma por GENChec técnica de secuenciación <sup>TM</sup> (Virco, Bélgica). Brevemente, una alícuota de los productos amplificados fue sometido a secuenciación automática de las regiones de la proteasa y hasta el codón 400 de los genes de la transcriptasa inversa. Los resultados se compararon con las secuencias de las cepas de referencia del VIH-1 mediante el uso de software GeneObjects, para determinar las mutaciones. Los resultados de los análisis genéticos, fueron reportados como cambios de aminoácidos en las posiciones de los genes virales en comparación con la secuencia de tipo silvestre HXB2 cepa de referencia.

**Reacción en Cadena de la Polimerasa.** Es una técnica que permite amplificar rápidamente *in vitro* un fragmento específico de ADN, consiguiendo millones de copias del segmento de interés. Esta técnica resulta de la aplicación de las etapas de desnaturalización, alineamiento y extensión de forma cíclica, empleando los siguientes elementos para la amplificación del ADN: dNTPs, oligonucleótidos complementarios a la secuencia blanco específica, y *Taq*DNA polimerasa.

## **Reacción de Retro transcripción Asociada a Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR).**

Este método se utilizó para sintetizar a partir del ARN viral una hebra complementaria en ADN (cADN), para posteriormente amplificarla por PCR y de esta manera detectar el genoma viral fácilmente por medio de electroforesis (18).

### **Condiciones de la reacción de RT-PCR para amplificar el VIH-1**

Las reacciones de RT-PCR se prepararon de la siguiente manera:

En un tubo eppendorf estéril de 200  $\mu$ l se preparó una mezcla conformada por 3  $\mu$ l ARN total de la muestra y 6  $\mu$ l (5)\* de H<sub>2</sub>O miliQ con DEPC, la cual se incubó a 72 °C por 10 minutos, posteriormente se mantuvo en hielo por 5 minutos, y luego se le añadieron 10  $\mu$ l de una mezcla maestra constituida con 4  $\mu$ l de Buffer 5X, 2  $\mu$ l de DTT, 2  $\mu$ l de dNTPs 10 mM, 1  $\mu$ l de iniciadores aleatorios y 1  $\mu$ l de inhibidor de ARNasas.

A la mezcla maestra antes mencionada, formada por un total de 19 (18\*)  $\mu$ l, se le añadió 1  $\mu$ l de la enzima SuperScript o 2  $\mu$ l\* de la enzima MMLV.

Posteriormente se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos.

Transcurrido este tiempo, el tubo con la mezcla de reacción se colocó en el termociclador para que se llevara a cabo el programa de amplificación de la hebra complementaria del ARN del VIH, que consistía en incubar la muestra a 37 °C por una hora y posteriormente a 95 °C por cinco minutos. El cADN obtenido se conservó a -20 °C.

Una vez obtenido el cADN del ARN del VIH, se procedió a la identificación del VIH mediante el uso de una PCR que amplificara un segmento específico y altamente conservado del genoma viral. Para esta reacción se usaron oligonucleótidos que ya han sido validados y que son empleados rutinariamente en el Laboratorio de Infectología Molecular.

La mezcla maestra para esta Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) estuvo formada por 5  $\mu\text{l}$  de Buffer 10X, 2  $\mu\text{l}$  de Oligo H1-U 10  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{l}$  de Oligo H2-D 10  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{l}$  de dNTPs 10 mM, 1.5  $\mu\text{l}$  de  $\text{MgCl}_2$  25 mM, 0.5  $\mu\text{l}$  de TaqDNA polimerasa 5U/ $\mu\text{l}$ , 35  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  miliQ y 2  $\mu\text{l}$  cADN para obtener un volumen total de 50  $\mu\text{l}$  de mezcla de reacción. Las condiciones para la PCR fueron: un ciclo de 94 °C por 5 minutos; 35 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 58°C por 1 minuto y 72 °C por 1 minuto; uno más de 72 °C por 10 minutos y finalmente uno de 4°C por 10 minutos. El producto de amplificación que se obtuvo fue de 223 pb y se detectó por electroforesis en gel de agarosa al 2%. Posteriormente estos fragmentos amplificados se utilizaron para el análisis de secuenciación genómica de los genes de la proteasa y retrotranscriptasa como se describió arriba.

Las secuencias de ADN obtenidas de los pacientes infectados con VIH se compararon con las secuencias de consenso de VIH derivadas de GenBank (secuencias de acceso número K02013). Todos estos estudios de secuenciación del genoma del VIH se realizaron en el laboratorio de Infectología molecular del departamento de bioquímica.

## **5.7 Programas de Análisis Computacional**

El procesador de texto y gráficos utilizados fueron Microsoft® Word XP y Microsoft® Power Point 2003 de Microsoft Corporation. Para el análisis estadístico se empleó la hoja de cálculo Microsoft Excel 2003 (Microsoft Corporation), los programas SPSS, y Epi Data™.

Los programas utilizados por vía internet fueron: Entrez [National Center for Biotechnology Information (NCBI)], Centres for Disease Control (CDC). El navegador de Internet que se uso fue Microsoft Explorer Versión 8.0 (Microsoft Corporation).

## **5.7 RECURSOS FINANCIEROS**

El desarrollo del proyecto fue financiado parcialmente por el proyecto Salud-Conacyt aprobado con la clave 2003-COI-02/AI aprobado a la Dra. AMRE, así como el proyecto PAICYT-2009 aprobado al Dr. JRJ.

## **5.8 ANALISIS ESTADISTICO**

La comparación de las mutaciones se utilizo aplicando la formula de Mc Nemar (19)

	Sangre (+)	Sangre (-)	Total (%)
LCR (+)	7	7	14 (70)
LCR (-)	0	6	6 (30)
Total (%)	7 (35)	13 (65)	20 (100)

Para cada mutación de resistencia detectada se calculará el cociente de la proporción de positivos en LCR por la de sangre tomando la hipótesis nula la igualdad de estas

$$\frac{\text{Proporción LCR}}{\text{Proporción Sangre}}$$

Para determinar la significancia del resultado se utilizará la prueba exacta de Fisher ( 14 )

$$\frac{(a+b)! (c+d)! (a+c)! (b+d)!}{a! b! c! d! n!}$$

Para evaluar el grado de desacuerdo de positividad para cada mutación, entre LCR y sangre se utilizará la prueba de McNemar

$$\frac{((b-c)-1)^2}{b+c}$$

Se asegurará el alfa de 0.05 corrigiendo la probabilidad de significancia por el número de comparaciones ( 15)

Se reconoce que con el número limitado de pacientes del estudio podrá detectar diferencias grandes como las mostradas en la tabla del ejemplo hipotético

## CAPITULO VI

### 6.

### RESULTADOS

Se reclutaron 20 pacientes que acudieron para atención y/o fueron referidos de diferentes sistemas de salud del Estado de Nuevo León entre el 2005 y el 2009. De este grupo, en las muestras tanto de suero como de LCR de 2 pacientes no se logró amplificación de ácidos nucleicos. Estos pacientes tenían características demográficas, grado de inmunosupresión y puntuación del test de Mini-mental similares al resto del grupo, por lo tanto no se incluyeron en los análisis posteriores.

### **.1 Características demográficas**

De los 18 pacientes restantes se encontró que el rango de edad fue de 24 a 61 años, 16 eran del género masculino y 2 del femenino. El tiempo promedio desde el diagnóstico hasta el reclutamiento fue de 48 meses con un rango de 12 a 78. El promedio de esquemas antivirales que habían recibido los pacientes fue de 2.8 con rango de 2 a 5. Todos los pacientes provenían de un nivel socioeconómico bajo (Tabla 2).

En 9 pacientes se logró la amplificación de las regiones para del genoma del VIH-1 que se utilizaron para la identificación de mutaciones en ambos líquidos (LCR y plasma). En 8 sujetos solo se detectaron mutaciones en plasma y en un paciente solo se pudieron analizar las mutaciones en la muestra del LCR y no en el plasma.

## .2 Estado Inmunológico

La cuenta absoluta de linfocitos CD-4 reportó un promedio de 75 células/mm<sup>3</sup> con un rango de 17 a 198, la cifra normal es de 440 a 1200 células/mm<sup>3</sup>, en los pacientes reclutados todos tenían menos de 200 linfocitos CD-4/mm<sup>3</sup>, como podemos ver en la Tabla 2 lo que refleja a un grupo de pacientes con severo daño inmunológico, no se observó relación con alguna mutación en particular.

<b>Variable</b>	<b>Valor</b>
Edad promedio en años (rango)	35 (24–61)
Genero(n)	
Masculino	16
Femenino	2
Tiempo promedio en meses desde el Dx (rango)	48 (12–78)
Tratamiento Antirretroviral previo (n)	
Si	18
No	0
Promedio de tratamientos ARV previos (rango)	2.8 (2-5)
Promedio de Linfocitos CD-4 células/mm <sup>3</sup> (rango)	75 (17-198)
<200	18
>200	0
Mini-Mental (MMSE) puntaje promedio (rango)	24 (10-32)
Normal	11
Bajo	2
Moderado	2
Severo	3

ARV, antirretrovirales

**Tabla 2. Características demográficas**



### **.3 Mutaciones**

Todos los virus aislados pertenecen al sub-tipo B del VIH-1.

En 9 pacientes se logro la amplificación y el análisis de las mutaciones en ambos líquidos (LCR y Plasma), en 8 solo se detectaron mutaciones en plasma y en un paciente solo amplifico y se pudieron analizar las mutaciones en la muestra del LCR y no en el plasma.

En la Tabla 3 se muestran las mutaciones encontradas en cada uno de los 9 pacientes que amplificaron tanto en LCR como en plasma y en negrillas se remarcan las mutaciones que se encontraron en solo uno de los líquidos y el tratamiento que recibían.

Mutaciones		Plasma	LCR	Tratamiento Anti-HIV
<b>3</b>	K103K/N, D123E, Q207E, R211K/R, L214F, R277K/R, G359G/S, T376A, K390R, I393I/M, T400/T, <b>K166K/R, E169D/E, T200A/T, V276I/V, Y342F, R356K/R</b>	G359G, R211K/R, L214F, R277K/R, K311R, P321P/R, R83K, E122K, D123E, I178L, G196E, L214F, R277K, K311R, P321P/R, S, R358K, T376A, T400A, <b>T271, S162C</b>	R211K/R, L214F, R277K, T286A, E297A, S32R, I393I/M, T400/T, <b>R83KR, I135M, K166R, I341L, A360A/T, T377I/T, K385K/R</b>	D4T, Tenofovir Atazanavir
<b>7</b>	R83K, E122K, D123E, I178L, G196E, L214F, R277K, K311R, P321P/R, S, R358K, T376A, T400A, <b>T271, S162C</b>	R83K, E122K, D123E, I178L, G196E, L214F, R277K, K311R, P321P/R, S, R358K, T376A, T400A, <b>T271, S162C</b>	R83K, E122K, D123E, I178L, G196E, L214F, R277K, K311R, P321P/R, S, R358K, T376A, T400A, <b>K173R</b>	FTC, Tenofovir, Lopinavir +R
<b>11</b>	I, V, K103R, E122K, D123E, I142V, V179I, R211K, L214F, R277K, T286A, E297A, S32R, T, I341F, A371V, T376AK390R, T400A, <b>R277K</b>	I, V, K103R, E122K, D123E, I142V, V179I, R211K, L214F, R277K, T286A, E297A, S32R, T, I341F, A371V, T376AK390R, T400A, <b>R277K</b>	I, V, K103R, E122K, D123E, I142V, V179I, R211K, L214F, R277K, T286A, E297A, S32R, T, I341F, A371V, T376AK390R, T400A, <b>V186I/V</b>	FTC, Tenofovir, Lopinavir +
<b>12</b>	V, V, S68G, E122K, D123E, I135V, K166R, I178M, Q197E, Q207E, R211K, L214F, V2445L, V276I, A288T, E297A, M357M/V, T376K/M, K388R, <b>T386M</b>	V, V, S68G, E122K, D123E, I135V, K166R, I178M, Q197E, Q207E, R211K, L214F, V2445L, V276I, A288T, E297A, M357M/V, T376K/M, K388R, <b>T386M</b>	V, V, S68G, E122K, D123E, I135V, K166R, I178M, Q197E, Q207E, R211K, L214F, V2445L, V276I, A288T, E297A, M357M/V, T376K/M, K388R, <b>R356K/R, K366K/R</b>	FTC, Tenofovir, Lopinavir
<b>14</b>	E6E/K, E122P, I135V, I142T, P170S, D177E, T200E, I202V, R211K/R, L214F, V245M, T286A, E297R, K311R, G333E, Q334L, R356K/R, K366R, T369V, K390R, <b>I51V, Q174H/Q</b>	E6E/K, E122P, I135V, I142T, P170S, D177E, T200E, I202V, R211K/R, L214F, V245M, T286A, E297R, K311R, G333E, Q334L, R356K/R, K366R, T369V, K390R, <b>I51V, Q174H/Q</b>	E6E/K, E122P, I135V, I142T, P170S, D177E, T200E, I202V, R211K/R, L214F, V245M, T286A, E297R, K311R, G333E, Q334L, R356K/R, K366R, T369V, K390R	Efaveirenz
<b>15</b>	E122K/P/Q/T, D123E, I142T, R211KL214F, E248D, P272A, R277K, R307K/R, T376S, K390R, T400A, <b>Q334E/L/Q/V</b>	E122K/P/Q/T, D123E, I142T, R211KL214F, E248D, P272A, R277K, R307K/R, T376S, K390R, T400A, <b>Q334E/L/Q/V</b>	E122K/P/Q/T, D123E, I142T, R211KL214F, E248D, P272A, R277K, R307K/R, T376S, K390R, T400A, <b>Q334E/L/Q/V</b>	Indinavir
<b>16</b>	V35L, R83K, K103R, E122K, V179I, T200A, I202V, E204D, Q207N, R211K, L214F, S251I, V276I, R277K, K311R, Q334L, M357T, T376A, T400A, <b>K275K/R</b>	V35L, R83K, K103R, E122K, V179I, T200A, I202V, E204D, Q207N, R211K, L214F, S251I, V276I, R277K, K311R, Q334L, M357T, T376A, T400A, <b>K275K/R</b>	V35L, R83K, K103R, E122K, V179I, T200A, I202V, E204D, Q207N, R211K, L214F, S251I, V276I, R277K, K311R, Q334L, M357T, T376A, T400A, <b>I63I/M</b>	AZT, 3TC, Saquinavir
<b>18</b>	T27S, I178M, T200A, L214F, V245E, R277K, I293V, P294T, E297A, D324E, Y342F, F, M357T, Q373H, T376A, K390R, T400A, <b>R211K/R</b>	T27S, I178M, T200A, L214F, V245E, R277K, I293V, P294T, E297A, D324E, Y342F, F, M357T, Q373H, T376A, K390R, T400A, <b>R211K/R</b>	T27S, I178M, T200A, L214F, V245E, R277K, I293V, P294T, E297A, D324E, Y342F, F, M357T, Q373H, T376A, K390R, T400A, <b>E122K</b>	Lopinavir +R
<b>20</b>	K20R, V35L, E122P, I135M, T165I, T200A, L214F, P272A, T286A, I293V, R356K, A360T, I375V, T376A, T400A, <b>V35M, I178L, Q207E</b>	K20R, V35L, E122P, I135M, T165I, T200A, L214F, P272A, T286A, I293V, R356K, A360T, I375V, T376A, T400A, <b>V35M, I178L, Q207E</b>	K20R, V35L, E122P, I135M, T165I, T200A, L214F, P272A, T286A, I293V, R356K, A360T, I375V, T376A, T400A, <b>E6A, K13T, E42V, K49N, D177E, Q207E, K385R</b>	Lopinavir + R

Mutaciones en negrillas: mutaciones detectadas solamente un liquido (LCR o Plasma).

**Tabla 3. Mutaciones detectadas en LCR y Plasma del mismo paciente**

En los 9 pacientes en los que se pudo amplificar en ambos líquidos se detectaron 72 mutaciones. En la tabla 4 se muestra la sumatoria de en donde se encontraron las mutaciones detectadas: LCR, Plasma, Ambas o ninguno. En la que se demuestra que NO hay discordancia estadísticamente significativa

		Amplificación Plasma		Total
		Si	No	
LCR	Si	140	19	159
	No	15	474	489
Total		155	493	648

Mc Nemar  
 $p > 0.05$

**Tabla 4. Relación de mutaciones en LCR y Plasma en los 9 pacientes con ambas amplificaciones**

En la Tabla 5 se muestran las mutaciones encontradas en los 9 pacientes en los que solo en uno de los líquidos se detectaron mutaciones, siendo 8 en plasma y uno en LCR. A pesar de haber sido obtenidas las muestras simultaneas en el mismo paciente y haber sido almacenadas, transportadas y procesadas de la misma manera que las obtenidas de los otros pacientes. También se incluye el tratamiento que recibían al momento de obtener las muestras.

ID Paciente (n=9)	Mutaciones		Tratamiento Anti-VIH
	Plasma	LCR	
8	ND	P4S,V21I,E122K,I135T,Q174F,Q207K,R211K,L214F,214F,P272T,R277T,R277K,Q334L,M357V,T376A,S379G,T386I,K390R.	AZT, 3TC, Efavirenz
1	K102R,K103N,D123N,I142T,I178M,I202V,Q207D,R211K,L214F,ND L283I,V292I,I293V,E297V,E312T,G333E,R356K,T376A,T400A		AZT, 3TC, Indinavir + R
2	K 2 0 R , V 3 5 I , V 6 0 I , K 1 0 2 K /ND R,E122K,I135L,S162C,R211K,L214F,H221Y,R277K,L283I,V292I .I293V,S322T,E328T,M357T,T376A,T386I,T400S		D4T, Tenofovir, Atazanavir
4	K32N,V35K,M41L,K104R,E122K,I135T,S162C,G196E,T200A,I2ND 02V,R211G,L214F,D250N,R277K,I293V,Q334L,M357T,T376A,S 379G,V381I,T400A		D4T, Tenofovir, Atazanavir
5	K 4 9 R , E 5 3 D , V 6 0 I , R 8 3 K / R , V 9 0 I , K 1 0 2 K /ND Q,K103R,E122P,I135K,T139I,D177E,V179D,R211K,L214F,V276 T,R277K,T286A/T,D324E,I326I/V,M357V,T376A,T377M,K390R		AZT, 3TC, Efavirenz
9	K102Q,K103N,E122K,S162A,I178M,L214F,P272A,R277K,I293V/ND .S322T,R356K,M357T,T376S,T400A		AZT, 3TC, Efavirenz
10	V 3 5 I / V , D 8 6 E , E 1 2 2 K , G 1 9 6 E , T 2 0 0 A / T , L 2 1 0 F /ND L,R211K,L214F,D250E,P272A,R277K,T286A,I293V,P294T,E297 K,K311R,S322T,G333E,R356K,K366R,E399D		FTC, Tenofovir, Lopinavir + R
13	Del59,E122K,I135T,I202V,R211G,V245Q,R277K,I293V,V317A,I3ND 29L,M357T,T376A,S379G,K390R,T400S		AZT, 3TC, Indinavir
19	K 4 6 K / T , V 6 0 I , R 8 3 R /ND S,K103R,E122K,I142V,V179T,I202V,E204D,R211K,L214F,S251T , P 2 7 2 A , R 2 7 7 K , T 2 8 6 A , V 3 1 7 A / V,S322T,G333E,Q334G,T338S,R356K/R,G359G/ S,T376A,K390R,T400A		AZT, 3TC, Efavirenz

ND: HIV-RNA No Detectado

Tabla 5. Mutaciones detectadas únicamente en LCR o Plasma

En 18 pacientes se encontraron 100 mutaciones mostradas en la figura 7, 68 de ellas se presentaron con poca frecuencia en 1 a 3 pacientes, 26 mutaciones se presentaron con una frecuencia intermedia en 4 a 9 pacientes y solo 6 mutaciones se presentaron con alta frecuencia, en 14 o más pacientes.

Se encontraron 11 mutaciones primarias marcadas con flechas en el lado izquierdo de la Figura 7, de las cuales 6 codifican para resistencia a los inhibidores de proteasas, 2 a los inhibidores de transcriptasa reversa análogos de los nucleótidos, 2 a los inhibidores de transcriptasa reversa No análogos de los nucleótidos y una para el inhibidor de la fusión.

Llamo la atención el hecho de haber encontrado la mutación K103R en 6 de los 18 pacientes (33%) ya que en otros países se ha encontrado con frecuencias menores al 5% (20). Y en 4 de los 6 pacientes (2 en LCR y 2 solo en sangre) se encontró asociada con la mutación V179D lo que le confiere al virus resistencia a los inhibidores de transcriptasa reversa NO análogos de los nucleósidos

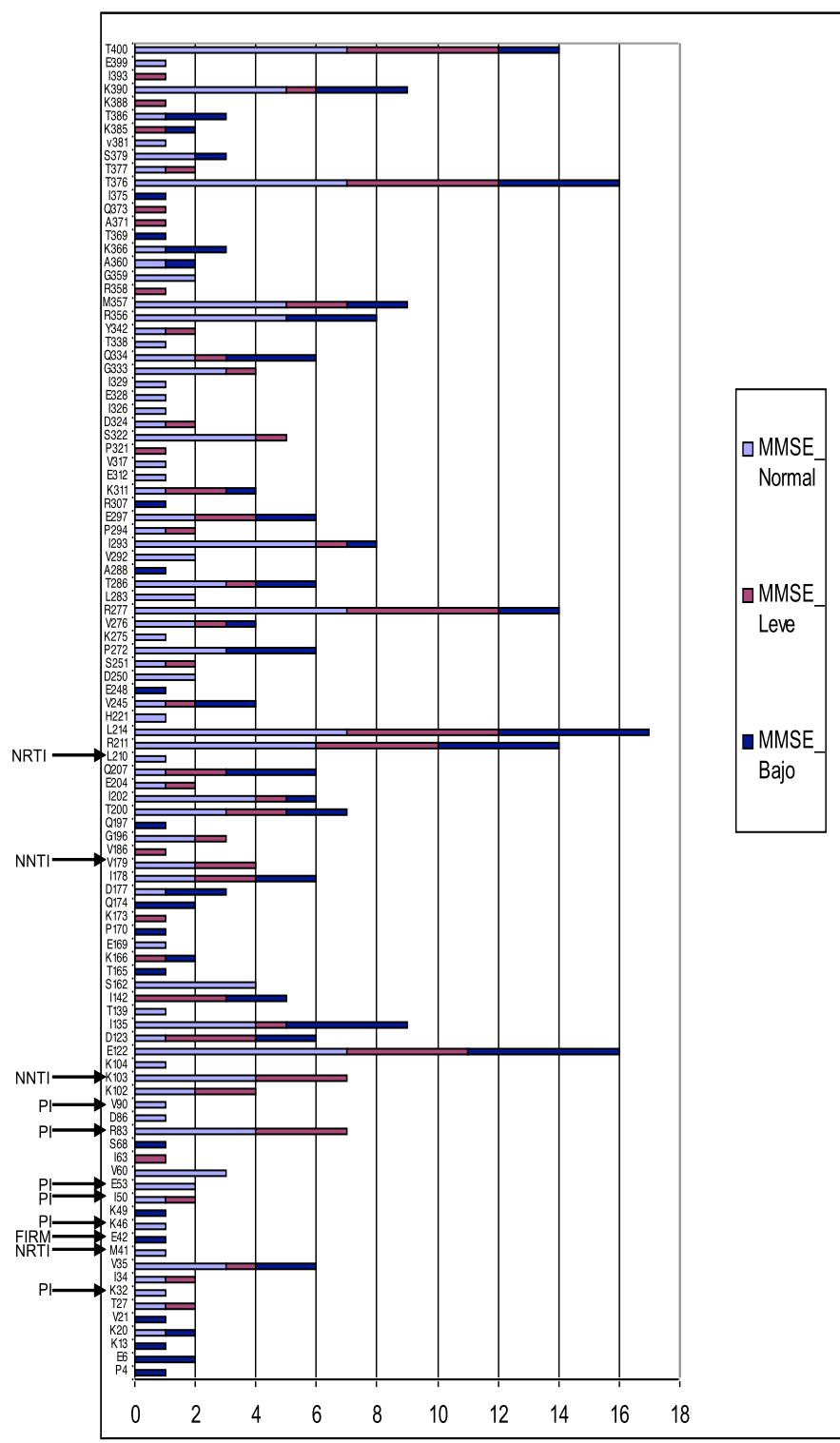


Figura 7. Mutaciones primarias y secundarias en 18 pacientes y MMSE

Las barras mostradas en la Figura 7, en cada mutación tienen el color según

el nivel del MMSE normal en celeste, rojo intermedio y en azul fuerte los más bajos.

#### **.4 Determinación del estado mental por MMSE**

El promedio del puntaje en el MMSE obtenido por los pacientes fue de 24 con un rango de 10 a 30, siendo normal en 11 de los 18 pacientes, en los 7 que fueron anormales se encontraron 2 con puntaje bajo, 2 moderado y 3 severo, como se muestra en la tabla 2 y figura 7, en el anexo 1 se muestran ejemplos de los cuestionarios aplicados,

Al realizar un análisis detallado de las mutaciones más frecuentemente encontradas en los pacientes con mayor alteración de su estado mental al tener un puntaje del MMSE muy bajo, como se muestra en la tabla 6. Se encontró una significancia estadística, sin que esto signifique necesariamente que queda establecida una relación causa-efecto entre una determinada mutación y el daño neurológico encontrado en el paciente.



**P4, E6, K13, K20, V21, E42, S68; T125, P170, Q174, D177, Q197; Q207, E248, V245, P272, A288; R307, Q334, R356, K366, I369, I375, T386, K388**

	Si	No	Total		
MMSE	Bajo	38	87	125	X <sup>2</sup> = 45.4
	Bueno	21	304	325	
	Total	59	391	450	

$$\text{Corte para ajustar } P = \frac{.05}{100} = 0.0005$$

**Tabla 6. Mutaciones frecuentes con MMSE bajo**

En los pacientes con menor daño en su estado mental establecido por puntajes mayores de 20 en el MMSE, se encontraron un grupo diferente de mutaciones como se muestra en la Tabla 7. Alcanzando un valor estadísticamente significativo.

Lo que no significa que estas mutaciones sean exclusivas o que garanticen un mejor estado mental de los pacientes.

T27, K32, I34, M41, K46, I50, E53, V60, I63, R83, D86, V90; K102, K103, K104, T139, S162, E169, K173, V179, V186, G191; I202; E204, L210, H221, D250, S251, K275, V276, L283, V292, R277, I293, P294; K311, E312, V317, P321, S322, D324, I326, E328, I329, T338, Y342, R358, G359, A371, Q373, T377, V381, I393, E399, T400

MMSE	Bajo	7	268	275	$X^2 = 42.17$ $P < 0.0001$
	Bueno	133	582	715	
	Total	140	850	990	

Corte para ajustar P=

**Tabla 7. Mutaciones frecuentes con MMSE mayores de 20 puntos**

Las 20 mutaciones mostradas en la tabla 8. Se presentaron en forma indistinta en LCR o en Plasma independientemente del puntaje alcanzado en el MMSE.

V35, K49; E122, D123, I135, I142, K166, I178,

	Si	No	Total		
MMSE	Bajo	47	53	100	X <sup>2</sup> = 2.38 P = 0.12
	Bueno	99	161	260	
	Total	146	214	360	

Corte para ajustar  $\frac{0.05}{100} = 0.0005$

**Tabla 8. Mutaciones con distribución**

La Tabla 9. Nos resume la distribución de las 100 mutaciones encontradas con MMSE Bajo, mayor de 20 o independiente del puntaje en el MMSE

<b>N</b>	<b>Mutaciones</b>	<b>MMSE Bajo 5 pac.</b>	<b>MMSE Bueno 13 pac.</b>	<b>Total 18 pac.</b>
<b>25</b>	<b>P4, E6, K13, K20, V21, E42, S68; T125, P170, Q174, D177, Q197; Q207, E248, V245, P272, A288; R307, Q334, R356, K366, I369, I375, T386, K388</b>	<b>38</b>	<b>21</b>	<b>59</b>
<b>55</b>	<b>T27, K32, I34, M41, K46, I50, E53, V60, I63, R83, D86, V90; K102, K103, K104, T139, S162, E169, K173, V179, V186, G191; I202; E204, L210, H221, D250, S251, K275, V276, L283, V292, R277, I293, P294; K311, E312, V317, P321, S322, D324, I326, E328, I329, T338, Y342, R358, G359, A371, Q373, T377, V381, I393, E399, T400</b>	<b>7</b>	<b>133</b>	<b>140</b>
<b>20</b>	<b>V35, K49; E122, D123, I135, I142, K166, I178, T200; R211, L214, T286, E297; G333, M357, A360, T376, S379, K385, K390</b>	<b>47</b>	<b>99</b>	<b>146</b>
<b>100</b>	<b>Total</b>	<b>92</b>	<b>253</b>	<b>345</b>

**Tabla 9. Resumen de Mutaciones y MMSE Bajo y Bueno**

**$X^2=51.84, p<0.0001$**

La Tabla 10 nos muestra las mutaciones en las cuales el cambio en la polaridad del aminoacido reemplazante se observo mas frecuente en los paciente con puntaje más bajo en el MMSE.

V35V/M	V35L/I/K				
K49N	K49R				
E122P	E122K				
D123E	D123N				
I135V/M	I135L/T/K				
I142T	I142V				
K166R	K166K/R				
I178L	I178M				
T200E	T200A				
E297R	E297A/V/K				
M357V	M357T				
A360T	A360A				
K385R	K385K/R				
T376K/S	T376A				

	Si	No	Total	
MMSE	Bajo	23	47	70
	Bueno	9	173	182
	Total	32	220	252

X<sup>2</sup> = 35.5  
P < 0.00001

Corte para ajustar P =  $\frac{.05}{14} = 0.0036$

	Si	No	Total	
MMSE	Bajo	8	62	70
	Bueno	54	128	182
	Total	62	190	252

X<sup>2</sup> = 9.06  
P < 0.002

Corte para ajustar P =  $\frac{.05}{14} = 0.0036$

Tabla 10. Mutaciones según amino acido reemplazante y MMSE

## **CAPITULO VII**

### **7. DISCUSION**

En la actualidad realizar los estudios de susceptibilidad una vez que existen guías nacionales e internacionales para su uso(21), cada vez se utilizan mas como parte de tratamiento estandarizado de los pacientes infectados con VIH, lo que refleja su incrementada utilidad ante la disponibilidad de nuevos medicamentos con actividad contra virus resistentes y ante la evidencia cada vez mayor de impacto negativo que tiene esta resistencia en la evolución del paciente.(22) Sin embargo el estudio de resistencia se realiza en el plasma de la sangre periférica de los pacientes y la información sobre la resistencia del VIH-1 en LCR y su impacto en la evolución es escasa. La información sobre las mutaciones y su relación con resistencia del VIH-1 es un proceso en constante cambio y requiere una actualización permanente y una correlación entre las mutaciones encontradas y las bases de datos que ayudan a su interpretación (40)

En la población que estudiamos de pacientes severamente inmunosuprimidos, multitratados de un nivel socio económico y educativo bajo, el número elevado de mutaciones encontrado en ambos líquidos probablemente refleje la exposición a múltiples medicamentos antirretrovirales y/o que fueron infectados con virus resistentes, los hallazgos del estudio se pueden extrapolar a individuos con características similares.

Una posible explicación para no haber encontrado la disparidad esperada en el patrón de resistencias en ambos líquidos a pesar de de la barrera hematoencefálica y la pobre penetración al LCR de la mayoría de los medicamentos antirretrovirales es que la presión selectiva para la resistencia ocurra fuera del sistema nerviosos central donde el virus se replica con mayor velocidad y la exposición al efecto de los medicamentos antirretrovirales es mayor (23) (24) (25).

La mutación K103R es un polimorfismo reportado en 1 a 2% de los pacientes que no han recibido tratamiento antirretroviral y en 2 a 5% de los que han recibido Inhibidores de transcriptasa reversa análogos de los nucleósidos en EUA. Habitualmente (37) esta mutación no confiere resistencia a menos que se asocie con la mutación V179D.(38) (39), bajo esta circunstancia se produce una disminución en susceptibilidad de 15 veces a los Inhibidores de transcriptasa reversa No Análogos de los nucleótidos en particular a Nevirapime, delavirdina y efavirenz, el haberla encontrado en el 33% de los pacientes estudiados fuertemente sigue un patrón de resistencia regional y haber encontrado en 4 de los 6 pacientes la asociación con la mutación V179D demuestra los problemas de resistencia locales ya que efavirenz se prescribe con mucha frecuencia en nuestros pacientes.

Existen varias líneas de evidencia que apoyan que el VIH-1 se replica en el Sistema Nervioso Central (26) adicionalmente variantes genéticamente

distintas de las de sangre periférica se han reportado en el Sistema Nervioso Central de sujetos con demencia asociada a VIH(27). El puntaje del Minimental observado en los pacientes fue normal en la mayoría (11 de 18) significando que probablemente están evolucionando lentamente en el daño neurológico central.

Las alteraciones en el estado mental de los pacientes con VIH pueden ser debidas a múltiples etiologías (28). Como el complejo de demencia por SIDA (CDS) (29), infecciones oportunistas, neoplasias, trastornos metabólicos, deficiencia de Vitamina B 12 y/o toxicidad por medicamentos. Para evaluar el impacto de estos factores es necesario realizar cuestionarios específicos para CDS, múltiples exámenes de laboratorio y radiológicos, por lo que es difícil establecer una relación causa efecto al tratar de relacionar las mutaciones con las alteraciones en el estado mental de los pacientes.

Sin embargo la tendencias encontradas y que alcanzaron significancia estadística de las mutaciones, que con mayor frecuencia se observaron en los pacientes con mayor daño neurológico merecen un mayor estudio ya que existe el precedente del impacto de el tratamiento antirretroviral en la carga viral del VIH en LCR y el estado mental (41)

Así como el posible papel que el cambio de polaridad del aminoácido reemplazante pudiera tener ya que lo observado nos muestra un estado mental más afectado cuando el aminoácido reemplazante cambio que cuando no cambio su polaridad, en la literatura encontramos reportes de



cambios en la polaridad de aminoácidos y resistencia a tres virus de importancia clínica Hepatitis C (42) Influenza (43) y VIH (44) así como un reporte en el que el cambio en polaridad impacto el transporte de aminoácidos en la barrera hematoencefálica (45) por lo que es claro que estos hallazgos requieren de mayor estudio para establecer su importancia en la clínica pero no deben ser ignorados.

Entre las limitaciones del estudio podemos mencionar la falta de medición de la carga viral del VIH-1 en los líquidos examinados y el hecho que solo se pudieron realizar determinaciones de mutaciones en ambos líquidos en 9 pacientes, otra limitación es la historia incompleta y poco confiable en cuanto a los esquemas antirretrovirales recibidos previamente esto ocurrió en parte por lo avanzado de la enfermedad, las alteraciones neurológicas y el bajo nivel educativo de nuestros pacientes. Sin embargo debido a la complejidad del estudio entre ellos el requerirse una punción lumbar y estudio neurológico extenso, el número de pacientes es similar a otros estudios publicados (15) (24)

## **CAPITULO VIII**

### **8. CONCLUSION**

La hipótesis se rechaza ya que NO se encontró el patrón de mutaciones diferente en el LCR con respecto a la sangre periférica.

Sin embargo las observaciones encontradas son de un valor muy importante ya que si otros estudios confirman nuestros datos se puede argumentar fuertemente que no es necesario alcanzar altos niveles de los antirretrovirales en el LCR, una observación con relevancia en el desarrollo de nuevos medicamentos.

Por lo tanto el esfuerzo para controlar el virus se debe continuar focalizando en la periferia y no en el Sistema Nerviosos Central (30).

También se debe considerar que el patrón de resistencias en LCR se pudiera predecir realizando los estudios de susceptibilidad en sangre periférica evitando la necesidad de una punción lumbar para dicho propósito.

Finalmente el estudio remarca la importancia de monitorizar localmente la resistencia del VIH1 ya que existe una tendencia al desarrollo de patrones regionales.

## CAPITULO IX

### 9.ANEXOS

#### Anexo 1

## MINI MENTAL STATE EXAMINATION (MMSE)

¿En qué año estamos? 0-1 ¿En qué estación? 0-1 ¿En qué día (fecha)? 0-1 ¿En qué mes? 0-1 ¿En qué día de la semana? 0-1	<b>ORIENTACIÓN TEMPORAL (Máx. 5)</b>	
¿En qué hospital (o lugar) estamos? 0-1 ¿En qué piso (o planta, sala, servicio)? 0-1 ¿En qué pueblo (ciudad)? 0-1 ¿En qué provincia estamos? 0-1 ¿En qué país (o nación, autonomía)? 0-1	<b>ORIENTACIÓN ESPACIAL (Máx.5)</b>	
Nombre tres palabras Peseta-Caballo-Manzana (o Balón-Bandera-Arbol) a razón de 1 por segundo. Luego se pide al paciente que las repita. Esta primera repetición otorga la puntuación. Otorgue 1 punto por cada palabra correcta, pero continúe diciéndolas hasta que el sujeto repita las 3, hasta un	<b>Nº de repeticiones necesarias</b>	
Máximo de 6 veces. Peseta 0-1 Caballo 0-1 Manzana 0-1 (Balón 0-1 Bandera 0-1 Árbol 0-1)	<b>FIJACIÓN- Recuerdo Inmediato (Máx.3)</b>	
Si tiene 30 pesetas y me va dando de tres en tres, ¿Cuántas le van quedando? Detenga la prueba tras 5 sustracciones. Si el sujeto no puede realizar esta prueba, pídale que deletree la palabra MUNDO al revés.		
30 0-1 27 0-1 24 0-1 21 0-1 18 0-1 (O 0-1 D 0-1 N 0-1 U 0-1 M 0-1)	<b>ATENCIÓN CÁLCULO (Máx.5)</b>	
Preguntar por las tres palabras mencionadas anteriormente. Peseta 0-1 Caballo 0-1 Manzana 0-1 (Balón 0-1 Bandera 0-1 Árbol 0-1)	<b>RECUERDO diferido (Máx.3)</b>	

<p><b>.DENOMINACIÓN.</b> Mostrarle un lápiz o un bolígrafo y preguntar ¿qué es esto? Hacer lo mismo con un reloj de pulsera. Lápiz 0-1 Reloj 0-1 <b>.REPETICIÓN.</b> Pedirle que repita la frase: "ni sí, ni no, ni pero" (o "En un trigal había 5 perros") 0-1 <b>.ÓRDENES.</b> Pedirle que siga la orden: "coja un papel con la mano derecha, dóblelo por la mitad, y póngalo en el suelo". Coje con mano d. 0-1 dobla por mitad 0-1 pone en suelo 0-1 <b>.LECTURA.</b> Escriba legiblemente en un papel "Cierre los ojos". Pídale que lo lea y haga lo que dice la frase 0-1 <b>.ESCRITURA.</b> Que escriba una frase (con sujeto y predicado) 0-1 <b>.COPIA.</b> Dibuje 2 pentágonos intersectados y pida al sujeto que los copie tal cual. Para otorgar un punto deben estar presentes los 10 ángulos y la intersección. 0-1</p>	<p>LENGUAJE (Máx. 9)</p>	
<p>Puntuaciones de referencia 27 ó más: normal 24 ó menos: sospecha patológica 12-24: deterioro 9-12 : demencia</p>	<p>Puntuación Total (Máx.: 30 puntos)</p>	

## Anexo 2

### Ejemplos MMSE

# MMSE

**Examen Cognoscitivo Breve**

De un punto por cada respuesta correcta.

1. ¿Cuál es...?

Respuesta	Categoría	Puntos
...el día	✓	1
...la estación	✓	1
...la fecha	✓	1
...el día	✓	1

2. ¿Qué es esto?

Respuesta	Categoría	Puntos
Paño	✓	1
Resado	✓	1
Cuchara	✓	1
En qué edificio	✓	1
Número de piso	✓	1

3. Mencione tres objetos en un segundo cada uno. Después pida al paciente que repita los tres nombres. De un punto por cada respuesta correcta. Como alternativa, pida al paciente que mencione los tres que el paciente los aprenda.

4. Cuenta de atrás en diez. Pida al paciente que cuente de manera regresiva a partir de 100, de cinco en cinco, en diez a 75, 60, 45, etc. Diga de contar después de cinco intentos. De un punto por cada respuesta correcta. Como alternativa, pida al paciente que dibuje un triángulo al revés.

5. Pregunte los nombres de los tres objetos mencionados en el ítem 3. De un punto por cada respuesta correcta.

6. Escríbale al paciente un lápiz y un reloj, y pida que mencione cada uno con nombre los nombres.


7. Pida al paciente que repita "No, sí, no o sí".

8. Pida al paciente que dibuje a cada la siguiente orden en tres etapas: "Trasera una línea de papel en su mano derecha, dibújela a la vez. Ponga la línea en el piso".

9. Pida al paciente que lea y firme a cada la siguiente orden escrita: "DIBUJE UN CÍRCULO".

10. Pida al paciente que escriba una oración de su elección. La oración debe comenzar en negro, en verde y sin complementos, y debe tener sentido. Marque los errores de ortografía.

11. Pida al paciente que repita la figura mostrada. De un punto si el paciente copia las líneas y espacios, y si los traza en un espacio con forma de cuadrado.



ANEXO 1

De un punto por cada respuesta correcta.

1. ¿Cuál es...?

Respuesta	Categoría	Puntos
...el día	✓	1
...la estación	✓	1
...la fecha	✓	1
...el día	✓	1

2. ¿Qué es esto?

Respuesta	Categoría	Puntos
Paño	✓	1
Resado	✓	1
Cuchara	✓	1
En qué edificio	✓	1
Número de piso	✓	1

3. Mencione tres objetos en un segundo cada uno. Después pida al paciente que repita los tres nombres. De un punto por cada respuesta correcta. Como alternativa, pida al paciente que mencione los tres que el paciente los aprenda.

4. Cuenta de atrás en diez. Pida al paciente que cuente de manera regresiva a partir de 100, de cinco en cinco, en diez a 75, 60, 45, etc. Diga de contar después de cinco intentos. De un punto por cada respuesta correcta. Como alternativa, pida al paciente que dibuje un triángulo al revés.

5. Pregunte los nombres de los tres objetos mencionados en el ítem 3. De un punto por cada respuesta correcta.

6. Escríbale al paciente un lápiz y un reloj, y pida que mencione cada uno con nombre los nombres.


7. Pida al paciente que repita "No, sí, no o sí".

8. Pida al paciente que dibuje a cada la siguiente orden en tres etapas: "Trasera una línea de papel en su mano derecha, dibújela a la vez. Ponga la línea en el piso".

9. Pida al paciente que lea y firme a cada la siguiente orden escrita: "DIBUJE UN CÍRCULO".

10. Pida al paciente que escriba una oración de su elección. La oración debe comenzar en negro, en verde y sin complementos, y debe tener sentido. Marque los errores de ortografía.

11. Pida al paciente que repita la figura mostrada. De un punto si el paciente copia las líneas y espacios, y si los traza en un espacio con forma de cuadrado.



30

ANEXO 1

De un punto por cada respuesta correcta.

1. ¿Cuál es...?

Respuesta	Categoría	Puntos
...el día	✓	1
...la estación	✓	1
...la fecha	✓	1
...el día	✓	1

2. ¿Qué es esto?

Respuesta	Categoría	Puntos
Paño	✓	1
Resado	✓	1
Cuchara	✓	1
En qué edificio	✓	1
Número de piso	✓	1

3. Mencione tres objetos en un segundo cada uno. Después pida al paciente que repita los tres nombres. De un punto por cada respuesta correcta. Como alternativa, pida al paciente que mencione los tres que el paciente los aprenda.

4. Cuenta de atrás en diez. Pida al paciente que cuente de manera regresiva a partir de 100, de cinco en cinco, en diez a 75, 60, 45, etc. Diga de contar después de cinco intentos. De un punto por cada respuesta correcta. Como alternativa, pida al paciente que dibuje un triángulo al revés.

5. Pregunte los nombres de los tres objetos mencionados en el ítem 3. De un punto por cada respuesta correcta.

6. Escríbale al paciente un lápiz y un reloj, y pida que mencione cada uno con nombre los nombres.


7. Pida al paciente que repita "No, sí, no o sí".

8. Pida al paciente que dibuje a cada la siguiente orden en tres etapas: "Trasera una línea de papel en su mano derecha, dibújela a la vez. Ponga la línea en el piso".

9. Pida al paciente que lea y firme a cada la siguiente orden escrita: "DIBUJE UN CÍRCULO".

10. Pida al paciente que escriba una oración de su elección. La oración debe comenzar en negro, en verde y sin complementos, y debe tener sentido. Marque los errores de ortografía.


11. Pida al paciente que repita la figura mostrada. De un punto si el paciente copia las líneas y espacios, y si los traza en un espacio con forma de cuadrado.



32

## Anexo 3

### Forma de Consentimiento

	<b>Servicio de Infectología Departamento de Medicina Interna Hosp. Universitario</b>	<b>Responsable del Estudio: Doctor Javier Ramos Jimenez</b>
	<b>Comparación de los Marcadores Genéticos del VIH-1 asociados a resistencia a los antirretrovirales en líquido cefalorraquídeo y sangre periférica</b>	

#### Consentimiento

A usted se le invita a participar en un estudio de investigación que será de gran ayuda para identificar aspectos particulares de la infección del VIH y el sistema nervioso central (Cerebro) que permitan un mejor tratamiento. Esto también ayudará a otros pacientes, con VIH-SIDA como usted, que asistan a este departamento. El propósito a alcanzar será innovar el abordaje de tratamiento en particular cuando existan virus resistentes a los medicamentos que nos permita lograr con esto una mejor calidad de vida.

#### DESCRIPCIÓN Y DURACION DEL ESTUDIO.

En la primera entrevista, se le realizará una encuesta (cuestionario minimal). Se le hará una historia clínica, examen físico general y neurológico completos, se tomara una muestra de sangre de 10cc y se realizará una punción lumbar para obtener líquido cefalorraquídeo (un procedimiento similar a una anestesia raquídea pero en este caso solo se obtendrá líquido y NO se administrará ningún medicamento NI anestésico).

#### RETIRO VOLUNTARIO

Su participación en esta encuesta es voluntario. Usted puede retirarse en cualquier momento sin ningún problema. El decidir retirarse no afectará la atención médica de ninguna manera.

#### CONFIDENCIALIDAD.

Los datos que se obtenga de este estudio, serán confidenciales y no serán revelados a ninguna persona sin el consentimiento por escrito por parte del paciente a excepción del doctor o quién usted decida pertinente.

RIESGOS: los propios de una punción lumbar y una toma sanguínea

#### ACEPTACION.

Se me ha explicado todo sobre este estudio de investigación, a lo que se me ha invitado a participar. El responsable del estudio, me ha dado la oportunidad de preguntar y ha respondido a todas mis dudas, por lo que me queda claro la finalidad y condiciones de esta encuesta. Si tengo algún problema o alguna otra pregunta acerca del estudio, puedo contactar al responsable de la investigación.

Yo estoy de acuerdo en participar en este estudio, firmo y recibo una copia de este informe de consentimiento.

\_\_\_\_\_  
Nombre del paciente

\_\_\_\_\_  
Firma del paciente

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Nombre del testigo

\_\_\_\_\_  
Firma del testigo

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Nombre del encuestador

\_\_\_\_\_  
Firma del encuestador

\_\_\_\_\_  
Fecha

## CAPITULO X

### 10.-BIBLIOGRAFIA

1. Masur H, Michelis MA, Greene JB, Onorato I, Stouwe RA, Holzman RS et al. An outbreak of community-acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction. *N Engl J Med* 1981;305:1431-8.
2. Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983;220:868-71.
3. Clavel F, Guétard D, Brun-Vézinet F, Chamaret S, Rey MA, et al. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science*. 1986;233:343-6.
4. Rivera-Morales L, Luna-cruz I.E, Ramos-Alfaro G, Ordaz-Sánchez M.I, Ramos-Jiménez J et al. Diversidad Genética del Virus de Inmunodeficiencia Humana: Una perspectiva General. *Respyn*.2005; 6:1-10.
5. Rivera-Morales L, Novitsky A, Trujillo R, Lavalle-Montalvo C, Cano-Dominguez C et al. The Molecular epidemiology of HIV Type 1 of men in Mexico. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2001;17;87-97.
6. Global report: UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2010. ISBN 978-92-9173-871-7.
7. Jacobsen H, Hänggi M, Ott M, Duncan IB, Owen S, Andreoni

- M, Vella S et al. In vivo resistance to a human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor: mutations, kinetics, and frequencies. *J Infect Dis* 1996;173:1379-87.
8. Wynn H.E, Brundage R.C, Fletcher C.V. Clinical Implications of CNS Penetration of Antiretroviral Drugs. *Arch Neurol*. 2008;65:65-70.
  9. Hirsch MS, Brun-Vézinet F, Clotet B, Conway B, Kuritzkes DR, D'Aquila RT et al. Antiretroviral drug resistance testing in adults infected with human immunodeficiency virus type 1: 2003 recommendations of an International AIDS Society-USA Panel. *Clin Infect Dis* 2003;37:113-28.
  10. Richman DD. Principles of HIV resistance testing and overview of assay performance characteristics. *Antivir Ther* 2000;5:27-31.
  11. Ramos J. Javier. *Infectología. SIDA*. 1era edición . Edited by DF Mexico Intersistemas S.A. de C.V:2000 :1-69
  12. Flexner C. HIV-protease inhibitors. *N Engl J Med*. 1998; 338:1281-92.
  13. Gulick RM, Mellors JW, Havlir D, Eron JJ, Gonzalez C, McMahon D et al. Treatment with indinavir, zidovudine, and lamivudine in adults with human immunodeficiency virus infection and prior antiretroviral therapy. *N Engl J Med* 1997;337:734-9.
  14. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-infected patients adults and adolescents; DHHS 2003 [<http://www.aidsinfo.nih.gov/>].
  15. Canestri A, Lescure FX, Jaureguiberry S, Moulignier A, Amiel C, Marcelin AG et al. Discordance between cerebral spinal fluid and plasma HIV replication in patients with neurological symptoms who are receiving suppressive antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis*. 2010;50:773-8.
  16. Weisberg LA. Neurologic abnormalities in human immunodeficiency virus infection. *South Med J* 2001;94:266-75.



17. Crum R.M, Anthony J.C. Bassett S.S, Folstein M.F. Population-based Norms for the Mini-Mental State Examination by age and Educational Level. 1993; 269: 2386-2391.
18. Wilson JW. Update on antiretroviral drug resistance testing: combining laboratory technology with patient care. *AIDS Read* 2003;13:25-30,35-8.
19. Dawson-Saunders B. Trapp RG . Basic and Clinical Biostatistics. *Comparing three or more means* . First edition. Edited by California USA Apleton and Lange 1990 132-33.
20. Gatanaga H, Hachiya A, Kimura S, Oka S. Mutation other than 103N in Human Immunodeficiency Virus type 1 emerge from K103R polymorphism under non-nucleoside RT inhibitor pressure. *Virology* 2006;344; 354-362.
21. Demeter L, Haubrich R. Phenotypic and genotypic resistance assays: methodology, reliability and interpretations. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2001;26: S 3-9
22. Burkala EJ, He J, West JT, Wood C, Petito CK. Compartmentalization of HIV-1 in the central nervous system: role of the choroid plexus. *AIDS* 2005;19:675-84.
23. Eggers C, Hertogs K, Stürenburg HJ, van Lunzen J, Stellbrink HJ, et al. Delayed central nervous system virus suppression during highly active antiretroviral therapy is associated with HIV encephalopathy, but not with viral drug resistance or poor central nervous system drug penetration. *AIDS* 2003;17:1897-906.
24. Mehling M, Drechsler H, Kuhle J, Hardmeier M, Doerries R, Ruegg S, et al. Adaptation of antiretroviral therapy in human immunodeficiency virus infection with central nervous system involvement. *J Neurovirol* 2008;14:78-84.
25. Cinque P, Presi S, Bestetti A, Pierotti C, Racca S, Boeri E, et al. Effect of genotypic resistance on the virological response to highly active antiretroviral therapy in cerebrospinal fluid. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2001;17:377-83.
26. Clements JE, Li M, Gama L, Bullock B, Carruth LM, Mankowski

- JL, et al. The central nervous system is a viral reservoir in simian immunodeficiency virus--infected macaques on combined antiretroviral therapy: a model for human immunodeficiency virus patients on highly active antiretroviral therapy. *J Neurovirol* 2005;11:180-9.
27. Eggers C, Hertogs K, Stürenburg HJ, van Lunzen J, Stellbrink HJ, et al. Delayed central nervous system virus suppression during highly active antiretroviral therapy is associated with HIV encephalopathy, but not with viral drug resistance or poor central nervous system drug penetration. *AIDS* 2003;17:1897-906.
28. Åsa M et al Preventing brain damage in HIV infection. *Future Neurology*. 2008,3: 565-574
29. Kulken C, Goldsmit J, Weiller G, Portogies P, Dekker J et al. Differences in human immunodeficiency virus type 1 V3 sequences from patients with and without AIDS dementia complex. *J Gen Virol* 1995;76:175-180.
30. Dore GJ, Correll P.K, Li Y, Kaldor JM, Cooper D.A, Brew B.J. Changes to AIDS dementia complex in the era of highly active antiretroviral therapy. *AIDS*. 1999;13:1249-5.
31. Valle-Bahena O, Ramons-Jiménez J, Ortiz-López R, Revold A, Lugo-Trampe A, Barrera-Saldaña H. et al. Frequency of Protease and Reverse Transcriptase Drug Resistance Mutations in Naïve HIV-Infected Patients. *Arch Med Res* 2006; 37;1022-1027.
32. Walter E.A, Gillian B, Delmar J.A, Spooner K, Morris J.T. Clinical Implications of Identifying Non-B Subtypes of Human Immunodeficiency Virus type-1 Infection. *Clin Infect Dis* 2000;31:798-802.
33. Kanki P.J, Hammel D.J, Sankale J.L, Hsieh C, Thior I et al. Human Immunodeficiency Virus type 1 subtypes differ in disease progression. *J Infect Dis* 1999;179:68-73.
34. Lai A, Riva C, Marconi A, Balestrieri M, Razzolini F et al. Changing patterns in HIV-1 non-B clades prevalence and diversity in Italy over three decades. *HIV Medicine* 2010;11:593-602.
35. Dowling W. E, Kim B, Mason C.J, Wasunna K.M, Onique M. et

al Forty-one near full-length HIV-1 sequences from Kenya reveal an epidemic of sub-type A and A-containing recombinants. *AIDS* 2002;16: 1809-1820.

36.SS/DGE.Registro Nacional de casos de SIDA.  
[www.censida.salud.gob.mx](http://www.censida.salud.gob.mx)

37.Harrigan P.R, Mo T, Wynhoven B, Hirsch J, Brumme Z et al  
Rare mutations at codon 103 of HIV-1 reverse transcriptase can confer resistance to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *AIDS* 2005;19: 549-54.

38.Parkin N.T, Gupta S, Chappey C, Petropoulos C.J. The K101P and K103/V179D mutations in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase confer resistance to nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:351-4.

39.Juethner S.N, WilliamsonC, Ristig M.B, Tebas P, Seyfried W et al. Nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor among antiretroviral naïve HIV-positive pregnant women. *J Acquir immune Defic Syndr.* 2003;32:153-6.

40.Liu T.F, Shafer R.W, Web Resources for HIV type 1 Genotypic-Resistance test interpretation. *Clin Infect Dis* 2006;42:1608-18.

41.Marra C.H, Zhao Y, Clifford D.B, Letendre S, Evans S et al. Impact of Combination Antiretroviral Therapy on Cerebrospinal Fluid HIV RNA and Neurocognitive Performance. *AIDS* 2009;23: 1359-1366.

42.Lu L, Pilot-Matias T. J, Stewart K.D, Randolph J.T, Pithawalla R et al. Mutations Conferring Resistance to Potent Hepatitis C Virus Serine Protease Inhibitor In Vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:2260-2266.

43.Prosch S, Heider H, Schroeder C, Shilov A.A, sinitzyn B.V et al. Mapping mutations in Influenza A virus resistant to norakin. *FEBS letters* 1990;267:19-21.

44.Lv M, Wang J, Wang X, Zuo T, Zhu Y, et al. Polarity Changes in the transmembrane Domain Core of HIV-1Vpu Inhibits Its Anti-Tetherin Activity. *PLoS ONE* 2011; 6 : 208-90.

45. Betz A.L, Glodstein G.W, polarity of the blood-brain barrier: neutral amino acid transport into isolated brain capillaries. Science 1978;202: 225-227.

## **CAPITULO XI**

### **11. RESUMEN AUTOBIOGRAFICO**

Javier Ramos Jiménez

Candidato para el grado de Doctor en Medicina

**Tesis: COMPARACION DE LOS MARCADORES GENETICOS DEL VIH-1 ASOCIADOS A RESISTENCIA A LOS ANTIRRETROVIRALES EN LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO Y SANGRE PERIFERICA**

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

Biografía:

Datos Personales: Nacido en Monterrey Nuevo León el 6 de Noviembre de 1953, hijo de Margarito Ramos Morelos † y María de Jesús Jiménez Jáuregui †

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado

obtenido Médico Cirujano y Partero en 1977, Especialidad en Medicina Interna 1982 UANL, Especialidad en Enfermedades Infecciosas 1984 Baylor College of Medicine, Postdoctorado en Microbiología 1986 Baylor College of Medicine, Maestro en Ciencias con Especialidad en Microbiología Médica 2004 UANL.

Experiencia Profesional: Maestro de Tiempo Completo de la Universidad Autónoma de Nuevo León desde 1986, Presidente de la Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica A.C. de 1996 a 1998, Categoría de Fellow (otorgado a quienes han alcanzado la excelencia en la especialidad) por la Infectious Diseases of América 2003. Miembro del Sistema Nacional de Investigadores Nivel I desde el 2010.

