



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO**  
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS  
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**“RESISTENCIA PRIMARIA Y SECUNDARIA DE VIRUS  
LIBRE EN PLASMA E INTEGRADO EN CÉLULAS  
MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA EN  
PERSONAS CON VIH DE GUERRERO”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

PRESENTA:

**CLAUDIA GARCÍA MORALES**

DIRECTORA DE TESIS: Dra. ADAKATIA ARMENTA SOLÍS  
CODIRECTOR DE TESIS: M. en C. SANTIAGO ÁVILA RÍOS

CHILPANCINGO, GRO., OCTUBRE DE 2008.

---

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Investigación Clínica de la Unidad Académica de Medicina, perteneciente a la Universidad Autónoma de Guerrero (UAG), ubicada en Acapulco, Gro., y en los Laboratorios del Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIENI), perteneciente al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), ubicado en la ciudad de México.

Bajo la dirección de la

Dra. Adakatia Armenta Solís

La codirección del

M. en C. Santiago Ávila Ríos

La asesoría de

Dra. Natividad Castro Alarcón

Dra. Mónica Espinoza Rojo

Dr. Saúl López Silva

Con la colaboración del

Dr. Gustavo Reyes Terán.

Jefe del Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIENI)

Hospital General Regional Vicente Guerrero-IMSS de Acapulco, Gro.

Dr. Juan Carlos Martínez Casarrubias

CAPASITS-Acapulco

Dr. David de los Santos Cebrero

Esta investigación se desarrolló con el financiamiento de la Comisión de Salud y Comisión de Equidad de Género de la H. Cámara de Diputados.

Durante el período en que cursó la Maestría en Ciencias Biomédicas, la C. Claudia García Morales, recibió beca del CONACYT.

## **AGRADECIMIENTOS**

Gracias al Dr. Gustavo Reyes Terán, por permitir la realización de este trabajo en los laboratorios del CIENI que atinadamente dirige. Gracias a la Biól. Daniela Garrido, por su asistencia durante todo el desarrollo del trabajo. Al Dr. Joel Vázquez, por su ayuda técnica. Al M en C. Cristopher Ormsby, por su valiosa ayuda en el análisis estadístico. A la Q.F.B. Edna Rodríguez y a todo su equipo de toma de muestra, por la recepción de las mismas y por la realización de las pruebas de conteo de T CD4+. A la Q.F.B. Verónica Quiróz, al Q.F.B. Ramón Hernández y a todo su equipo en el laboratorio de diagnóstico virológico del CIENI, por la realización de las pruebas de Carga Viral. A Zeidy Arenas y todo su equipo, por todos los trámites Administrativos en el CIENI. Al Ing. Israel Maldonado, por su ayuda en la red informática.

Gracias al Dr. Juan Carlos Martínez Casarrubias y al Dr. David Cebrero de los Santos, por su valiosa ayuda en el reclutamiento de participantes. A las Med. Cir. Wendy Estrada y Rebecca González de la toma y envío de muestras de Acapulco. A la Dra. Berenice Illades, por guiarnos a todos los alumnos de la 5° generación (2006-2008) de la maestría, durante 2 años, en la realización de nuestros proyectos de investigación. Al M en C. Mariano Cortez Malagón, por encaminar este trabajo. A Anahy Barales y Paola Ramírez, por todo el apoyo administrativo de la maestría.

Gracias, por supuesto, a todos los participantes guerrerenses que aceptaron voluntariamente ser parte del presente estudio.

## DEDICATORIAS

*“El éxito no se mide por lo que se ha logrado sino por los obstáculos que se han vencido para lograrlo”*

*“Es mejor llegar a ser que haber nacido siendo”*

Hay tantas personas a las que quiero dedicar mi crecimiento personal y profesional que no sé por quién empezar. Debo empezar por agradecer a Dios, a mi madre que está con Él y a la Vida, porque cada día es una bendición.

Gracias a mi familia que siempre me ha dado su apoyo: Papá, gracias por no cortarme las alas, por guiarme y porque con tus acciones me has forjado un carácter. Gracias a mis hermanos Santiago, Margarita, Elías y Gregorio. Gracias a mi tía Inés que ha sido para mí como una madre. Gracias a mis tíos y primos que siempre me han dado ánimos.

Sra. Ma. Teresa Tello y familia, gracias por todo el apoyo que me han brindado durante más de siete años, gracias por su ayuda incondicional.

*“Es cierto que no elegimos a la familia, pero sí a los amigos. Yo, he elegido bien”.*

Amigos de la licenciatura/maestría/CIENI, Gracias por la amistad que me han brindado: Ana, gracias por escucharme y darme ánimos. Karla, Rubí, Citlalli, Santiago, Carmen, Anahy, gracias por siete años de amistad y por todos los buenos momentos. Alberto, Yuli, Pedro, Paola, Rubén, Diana, Juan Pablo, Irma, Olga, Blanca, Dinorah, Juan Antonio, gracias por estos dos años de vivencias; chicos maestría, somos grandes, la generación más unida de la maestría. Daniela, Olivia, Israel, Humberto, Natalia, Alfredo, Gustavo, Juan y Mariana, chicos CIENI, gracias por permitirme compartir con ustedes cada día; es un placer conocerlos.

*“Caminante no hay camino, se hace camino al andar, y en ese caminar, nadie se cruza por azar”*

Claudia

## CONTENIDO

	PÁGINA
Resumen	i
Abstract	ii
I. Introducción	1
II. Material y Métodos	5
III. Resultados	8
IV. Discusión	17
V. Referencias	23

## RESUMEN

**Introducción:** La resistencia a Antirretrovirales (ARVs) causa falla al tratamiento en personas con VIH, pudiéndose transmitir a personas vírgenes al tratamiento. **Objetivo:** Determinar y comparar la prevalencia de resistencia primaria y secundaria en RNA de virus libre en plasma y DNA proviral en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) en personas con VIH de Guerrero. **Metodología:** Se secuenció un segmento de 1.2 kb del gen *pol* en RNA viral en plasma y DNA proviral en PBMCs de 37 personas con VIH vírgenes a ARVs y 8 con falla virológica. El análisis de resistencia se realizó utilizando la base de datos de Stanford (<http://hivdb.stanford.edu>). La frecuencia de mutaciones de resistencia en virus de plasma e integrado en PBMCs fueron comparadas con la prueba no paramétrica de McNemar. Los subtipos de virus circulantes se determinaron con el programa REGA (<http://dbpartners.stanford.edu/RegaSubtyping/>) y mediante análisis filogenético (Mega 4.0). **Resultados:** Más del 60% de personas vírgenes a ARVs presentaron mutaciones de resistencia en DNA proviral de PBMCs y en RNA viral de plasma. Se encontró 11% de resistencia primaria en virus integrado en PBMCs y 13.5% en virus libre en plasma. El análisis de McNemar para observar diferencias entre la suma general de mutaciones y el compartimento de ubicación fue estadísticamente significativa ( $p=0.04$ ); pero, al estratificar por familias de fármacos éstas perdieron su significancia ( $p>0.99$ ). La mayor parte de las mutaciones detectadas fueron menores y se detectaron principalmente en la región de la proteasa. En personas con falla terapéutica se observó alta frecuencia de mutaciones mayores en ambos compartimentos y a las 3 familias de ARVs. El 23% de personas sin tratamiento y todas las personas con falla terapéutica presentaron discordancia en las mutaciones de ambos compartimentos, esta discordancia fue observada principalmente en la región de la proteasa. El análisis filogenético reveló que el subtipo B es predominante y que los virus presentes son muy homogéneos entre sí. **Conclusión:** La prevalencia de resistencia primaria observada en el estado de Guerrero fue elevada en el contexto nacional y la epidemia parece estar producida por virus altamente homogéneos de subtipo B; por lo tanto, para el caso particular del estado de Guerrero, la genotipificación del VIH antes de iniciar el tratamiento sería recomendable para una mejor eficacia del tratamiento. Así mismo, la implementación de medidas para mejorar la adherencia e información en personas en tratamiento es recomendable para el mejor control de la transmisión de virus resistentes.

**PALABRAS CLAVE:** Antirretrovirales, resistencia primaria, subtipos de VIH, Guerrero.

---

**ABSTRACT**

**Introduction:** Antiretroviral (ARV)-drug resistance causes treatment failure in persons with HIV and can be transmitted to individuals without previous ARV treatment. **Objective:** To determine and compare the frequency of primary and secondary-drug resistance mutations in plasma viral RNA and peripheral blood mononuclear cell (PBMC) proviral DNA in HIV-positive patients of the state Guerrero. **Methodology:** A segment of approximately 1.2 kb of the *pol* gene was sequenced from plasma viral RNA and PBMC proviral DNA in 37 treatment-naïve subjects and 8 subjects with treatment failure. ARV drug-resistance mutations were analyzed using the Stanford Sequence Database (<http://hivdb.stanford.edu>). Additionally, phylogenetic analyses, were performed in order to determine HIV-1 subtype. The frequencies of resistance mutations in free plasma viruses and integrated proviruses in PBMCs were compared with McNemar non-parametric test. The circulating virus subtypes were identified with the program REGA (<http://dbpartners.stanford.edu/RegaSubtyping/>) and through phylogenetic analysis (Mega 4.0). **Results:** More the 60% of the naïve subjects had drug-resistance mutations in PBMC proviral DNA and plasma viral RNA. We found a prevalence of primary resistance of 11% in PBMC proviral DNA and 13.5% in plasma viral RNA. The McNemar test to look for differences between the overall frequency of mutations in both viral compartments was statistically significant ( $p=0.04$ ); but when stratifying by ARV drugs family, the significance was lost ( $p>0.99$ ). Most of the mutations were minor and their frequency was greater in the protease. In patients with treatment failure there was a high frequency of drug-resistance mutations in both viral compartments and for the 3 groups of ARV drugs. 23% of the previously untreated patients and all patients with treatment failure had discordance in drug resistance mutations in both viral compartments, this discordance was observed mainly in the protease. Phylogenetic analyses revealed that subtype B is predominant in Guerrero and that circulating viruses are very homogeneous. **Conclusion:** The prevalence of primary resistance is high in the state of Guerrero in Mexico's national context and the HIV epidemic seems to be produced by highly homogeneous, subtype B viruses. HIV genotyping before ARV treatment initiation could be advisable to guarantee a better treatment efficacy in HIV patients from Guerrero. Moreover, measures to improve adherence and information in patients under ARV treatment could be important to control ARV drug resistant viruses.

**KEYWORDS:** Antiretrovirals, primary resistance, HIV subtypes, Guerrero.

## I. INTRODUCCIÓN

El Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) es el agente causal del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). En 2007, ONUSIDA reportó que hay en el mundo 33.2 millones de personas viviendo con VIH y registró 2.5 millones de nuevas infecciones y 2.1 millones de muertes por SIDA.<sup>1</sup> En México, desde 1983 hasta junio de 2008, se han contabilizado 121,718 casos de infección por el virus con 5,316 nuevos casos y 4,653 defunciones por SIDA en el 2007. La tasa de prevalencia nacional en adultos es de 0.3%. Guerrero ocupa el séptimo lugar en frecuencia de infecciones por VIH con 4,526 casos acumulados.<sup>2</sup>

El VIH es un retrovirus que pertenece al género *Lentivirus*.<sup>3</sup> El genoma del VIH, dos copias de RNA de aproximadamente 9 kb, contiene una región reguladora no codificante (LTR), tres genes principales (*gag*, *pol* y *env*) y seis genes accesorios/reguladores (*vif*, *vpu*, *vpr*, *tat*, *rev* y *nef*). El gen *pol* codifica para tres enzimas importantes en la replicación viral: proteasa, transcriptasa reversa (RT) e integrasa. La RT, enzima con actividad de transcriptasa reversa y RNAsa, tiene baja fidelidad para incorporar nucleótidos (comete 1-10 errores por genoma en cada ciclo de replicación).<sup>4</sup> Esta característica, junto con la elevada tasa de replicación del VIH (mil millones de viriones por día), la presión selectiva inmunológica, la presión terapéutica y los eventos de recombinación, resultan en una gran variabilidad genética en el VIH.<sup>5, 6</sup> Esta capacidad de variación del VIH representa un gran reto para el desarrollo de estrategias de control de la epidemia.

De los dos tipos de VIH (VIH-1 y VIH-2), el VIH-1 es más común.<sup>5</sup> El VIH-1 se ha clasificado en tres grupos: M (major), O (outlier) y N (no M/no O, nuevo).<sup>6, 7</sup> El grupo M se divide en 11 subtipos (A1, A2, B, C, D, F1, F2, G, H, J y K), e incluye al menos 43 Formas Recombinantes Circulantes (CRFs) (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html>) y varias Formas Recombinantes Únicas (URFs). Los subtipos tienen una variabilidad genética del 25% en *env*, 20% en *pol* y 15% en *gag*.<sup>6, 8</sup> Las CRFs son virus compuestos por dos o más subtipos, se presentan en al menos tres personas sin relación epidemiológica y se agrupan de acuerdo a la secuenciación completa de su genoma. Las URFs son



virus con estructuras únicas en mosaico, no presentan diseminación epidemiológica y resultan de la recombinación de CRFs.<sup>5, 9, 10</sup>

El VIH-1 está diseminado en todo el mundo. Todos sus grupos, subtipos y varias CRFs se encuentran en África. El grupo O es encontrado en el Este de África central y el N en Camerún (Oeste de África ecuatorial), ambos representan el 5% de las infecciones mundiales. El grupo M es responsable de la pandemia y la distribución de los subtipos que lo componen es característica de cada región. El subtipo C representa el 60% de las infecciones mundiales, concentradas al Este de África y Sur de Asia, seguido por el subtipo A, la CRF02\_AG y el subtipo B. Los subtipos D y A prevalecen en el Este y Centro de África, mientras que el F es común en Europa Oriental.<sup>5, 7</sup> En América del Sur predomina el subtipo B, seguido por el F, C, D y varias CRFs.<sup>6, 9, 11, 12</sup> En México, varios autores reportan al subtipo B como el único existente,<sup>13-15</sup> sin embargo, estos estudios carecen de representatividad nacional. Los datos preliminares (n=639) de un estudio en proceso con representatividad nacional, indican que el subtipo B en México es muy prevalente con respecto a otros países de América y que la prevalencia de otros subtipos y formas recombinantes es menor a lo observado en países sudamericanos y Estados Unidos.<sup>16</sup>

Para el tratamiento farmacológico de la infección por VIH se dispone de cinco clases de antirretrovirales (ARVs) que actúan en puntos específicos del ciclo de replicación viral: Inhibidores Análogos de Nucleótidos o Nucleósidos de la Transcriptasa reversa (NRTIs), Inhibidores no Análogos de Nucleósidos de la Transcriptasa reversa (NNRTIs), Inhibidores de Proteasa (PIs), Inhibidores de la Entrada (de fusión y antagonistas de CCR5) y un Inhibidor de Integrasa.<sup>17, 18</sup> Para obtener mejores resultados y reducir la aparición de resistencia se utilizan combinaciones de fármacos conocidas como Tratamiento Antirretroviral Altamente Activo (HAART). Un régimen típico de HAART generalmente incluye tres fármacos: dos NRTIs y un PI (potenciado) o un NNRTI.<sup>19</sup> Algunas personas tratadas con HAART experimentan fracaso terapéutico debido, principalmente, a la selección de cepas resistentes por la presión que ejerce el uso de los ARVs.<sup>12, 20</sup> Desde la introducción de la terapia antirretroviral, en 1996 en EUA y entre 1997-1998 en

México, se ha descrito la transmisión de cepas de VIH resistentes a uno o múltiples ARVs. La transmisión de cepas resistentes se manifiesta con supresión viral incompleta, limitándose con esto la magnitud y duración de la respuesta al tratamiento.<sup>12, 19, 20</sup>

La transmisión de cepas resistentes en personas no tratadas se conoce como resistencia primaria, mientras que la resistencia secundaria aparece en la población viral de un paciente como consecuencia de la exposición a ARVs. Adicionalmente, la resistencia cruzada es definida como resistencia a ARVs a los cuales un virus nunca ha estado expuesto y es el resultado de mutaciones que han sido seleccionadas por el uso de otros ARVs. Las mutaciones se clasifican como mayores y menores: las mayores son aquellas que confieren resistencia por sí solas; las mutaciones menores (compensatorias o accesorias) son aquellas que por sí solas no confieren resistencia pero sí contribuyen a la misma cuando se asocian con otras mutaciones.<sup>21</sup>

Estudios sobre resistencia primaria y secundaria en RNA viral en plasma han reportado datos discordantes y particulares de cada región, observándose que en países desarrollados se presentan niveles de resistencia más altos debido al uso generalizado y mayor acceso a ARVs. En general, la mayoría de los estudios concuerdan en que estos niveles de resistencia primaria están aumentando. En Inglaterra se ha reportado una prevalencia de resistencia primaria del 14%,<sup>22</sup> 9% en Alemania,<sup>23</sup> 10.8% en Estados Unidos<sup>24</sup> y 7.8% en Canadá.<sup>25</sup> En México los estudios concluyen que hay una baja frecuencia de resistencia primaria.<sup>15, 26</sup> Los datos preliminares de un estudio en proceso con representatividad nacional (n=639) han mostrado una prevalencia de resistencia primaria de 7.3%.<sup>27</sup> En Brasil, se ha reportado que la resistencia secundaria es de 91.1% para NRTIs, 58.7% para NNRTIs y 94.8% para PIs.<sup>28</sup> Otro estudio reportó que 98% de la población estudiada presentó mutaciones de resistencia secundaria.<sup>12</sup>

La presencia de cepas virales resistentes puede verificarse rutinariamente en virus libre en plasma, ya que las variantes de virus circulantes son consideradas representativas de la población viral que escapa de la presión terapéutica. Sin embargo, el DNA viral integrado (proviral) en células mononucleares de sangre

periférica (PBMCs) puede ser un reservorio adicional de variantes de VIH resistentes a ARVs.<sup>29, 30</sup>

Estudios que evalúan resistencia primaria tanto en DNA proviral en PBMCs como en RNA viral en plasma, han reportado que las mutaciones encontradas en un compartimento no siempre concuerdan con las encontradas en el otro.<sup>30</sup> En México datos preliminares de un estudio en proceso confirman esa discordancia en las mutaciones de resistencia encontradas en los dos compartimentos. Varios polimorfismos únicos, algunos asociados con resistencia a ARVs se encontraron en cada uno de los compartimentos en baja frecuencia, siendo estos polimorfismos únicos, más frecuentes en el gen RT del compartimento proviral de PBMCs (Ávila-Ríos *et al.*, datos no publicados).

Como se puede apreciar, existen reportes sobre prevalencia de mutaciones de resistencia primaria y distribución de subtipos de VIH circulantes en la población mexicana,<sup>13-15, 26</sup> sin embargo, estos reportes son escasos, tienen poca representatividad nacional, tamaños de muestra reducidos y en ninguno se ha incluido al estado de Guerrero. Consecuentemente, tampoco existen comparaciones de prevalencia de resistencia en diversos compartimentos virales con secuencias obtenidas a nivel regional. Así, para obtener información acerca de la epidemia por VIH en el estado de Guerrero, en este trabajo se determinó la frecuencia de mutaciones de resistencia primaria y secundaria tanto en RNA de virus en plasma como en DNA proviral en PBMCs de personas con VIH del estado de Guerrero. Adicionalmente, se determinó el subtipo de VIH circulante en la población guerrerense, así como las relaciones filogenéticas de virus presentes en la región.

Los resultados del presente estudio son importantes en el conocimiento a nivel molecular de la epidemia del VIH/SIDA en el estado de Guerrero, tienen impacto en el desarrollo de intervenciones para el control de la epidemia a nivel regional y la optimización de la terapia ARV para el mejoramiento de la calidad de vida de las personas que viven con VIH, así como para el desarrollo de posibles vacunas afectivas para los guerrerenses.

## II. MATERIAL Y MÉTODOS

**Población analizada.** Se hizo un estudio transversal descriptivo de noviembre de 2007 a mayo de 2008 en personas con VIH/SIDA del estado de Guerrero que dieron su consentimiento informado por escrito. Se reclutaron 48 personas, 8 con falla virológica/inmunológica al tratamiento antirretroviral y 40 sin tratamiento. Se consideró falla inmunológica a un deterioro en el conteo de Linfocitos T CD4+ (T CD4+) (disminución de 30% con respecto a la determinación previa, si esta fue >100 células/ $\mu$ L), o a un deterioro clínico (síndrome de desgaste, infecciones oportunistas y/o neoplasias asociadas al VIH). Se consideró falla virológica a la presencia de un rebote persistente de CV>1,000 copias/mL en un lapso no mayor de dos meses, después de haberse presentado supresión viral completa (CV<50 copias/mL) o a la imposibilidad de alcanzar supresión viral completa después de seis meses de tomar ARVs. Se excluyeron aquellas muestras de personas con CV<2,000 copias/mL.

**Carga Viral y cuenta de CD4+.** Los niveles de RNA de VIH-1 en plasma fueron determinados con el m2000sp (Abbott Molecular, Des Plaines, Illinois, USA) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. El conteo de T CD4+ se hizo por citometría de flujo fluorescente utilizando un panel de 4 colores con anticuerpos monoclonales anti-CD3/Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) (Pan-Leucocitario), anti-CD8/ficoeritrina (PE) (T citotóxicos), anti-CD45/Peridinato de clorofila-Proteína (PerCP) (Marcador de madurez de células T, B y NK) y anti-CD4/Alofococianina (APC) (T cooperadores) (Becton Dickinson, San José, CA).

**Separación de plasma y PBMCs.** De cada participante se obtuvo muestra de sangre por punción venosa en tubos con EDTA. Se separó el plasma centrifugando a 2,500 rpm por 20 min, se alicuotó y almacenó a -80°C hasta su procesamiento. Las PBMCs se separaron mediante centrifugación por gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque (Lymphoprep, Axis-Shield, Oslo, Noruega) y se criopreservaron a -140°C en medio de congelación (10% DMSO, 90% suero fetal bovino), separando 5-8X10<sup>6</sup> células como pellet seco para la extracción de DNA genómico.

**Genotipificación de VIH a partir de virus libre en plasma.** Se utilizó el sistema ViroSeq HIV-1 Genotyping System Kit (Celera Diagnostics, Alameda, CA),

de acuerdo a las especificaciones del proveedor. Brevemente, se purificó RNA viral a partir de 1 mL de plasma por precipitación con isopropanol y se amplificó por RT-PCR un segmento de aproximadamente 1.8 kb del gen *pol*. Este segmento se utilizó como molde para secuenciar un fragmento de 1.2 kb que incluye toda la proteasa (99 aa) y 2/3 de la RT (1-335 aa). Se utilizaron siete iniciadores (A, B, C, D, F, G y H) por cada muestra para cubrir toda la región del gen *pol* a analizar con al menos dos secuencias. Las secuencias fueron obtenidas en un secuenciador ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, Ca) y ensambladas y editadas utilizando el software proporcionado por el fabricante.

**Genotipificación de VIH a partir de virus integrado en PBMCs.** La extracción de DNA genómico de PBMCs se hizo con el estuche comercial QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA; Cat. No. 51106), de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Se realizó una PCR anidada utilizando Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA) para amplificar un fragmento del gen *pol* viral, incluyendo toda la proteasa y las primeras 335 posiciones de la RT. Para la primera reacción se utilizaron los iniciadores externos PR5'OUTER (5'-CCCTAGGAAAAGGGCTGTTG-3') y RT3'OUTER (5'-GTTTTTCAGATTTTTAAATGGCTCTTG-3'), diseñados previamente en el laboratorio, con las siguientes condiciones de PCR: 94°C por 3 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 s, 60°C por 30 s y 74°C por 2 min y una extensión final de 72°C por 5 min, con una concentración final de 2mM de Mg<sup>++</sup>, 0.2 mM de dNTPs, 0.4 mM de cada iniciador y 20 ng/μL de DNA genómico. Para la segunda reacción se transfirió 10% del producto de la primera reacción como templado; se utilizaron los iniciadores internos, PR5' INNER (5'-TGAAAGATTGTAAGACTGAGAGACAGG-3') y RT3' INNER (5'-GGCTCTTGATAAATTTGATATGTCC-3'), también diseñados previamente en el laboratorio, con las mismas concentraciones finales y condiciones de PCR que en la primera reacción, obteniéndose un segmento de 1,525 pb. Los productos de PCR fueron purificados utilizando el estuche QIAquick PCR Purification (QIAGEN, Valencia, CA; Cat. No. 28106) de acuerdo a las especificaciones del fabricante, seguido por la cuantificación de los mismos mediante electroforesis en gel de agarosa (Promega, Madison, WI) al 1.5%. Por último, se llevó a cabo la reacción de

secuenciación, siguiendo el procedimiento del kit ViroSeq HIV Genotyping System de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

**Análisis de Resistencia.** La identificación de mutaciones de resistencia a ARVs en DNA proviral de PBMCs y RNA viral de plasma se realizó con el software ViroSeq HIV-1 Genotyping System v.2. Este software ensambla las siete secuencias obtenidas en cada muestra en una sola secuencia continua que se compara con la cepa de referencia HXB2 para determinar las mutaciones de resistencia a fármacos inhibidores de la proteasa y de la RT. El análisis de resistencia se hizo utilizando el algoritmo de la base de datos de Stanford (versión 4.3.6: <http://hivdb.stanford.edu/>) para verificar la presencia y significado fenotípico de las mutaciones de resistencia. Este algoritmo se basa en una matriz de resultados de Riesgo Relativo (RR) para cada combinación de mutación-fármaco. Los puntajes de RR por cada mutación son sumados para obtener un puntaje total de RR de resistencia a ARVs en el virus analizado. En este estudio se definieron las categorías: sensible a ARVs (puntaje total de  $RR < 15$ ), riesgo intermedio (puntaje total de  $RR = 15-29$ ) o alto riesgo de resistencia (puntaje total de  $RR \geq 30$ ). Es importante notar que diferentes mutaciones en un mismo codón confieren diferente RR, por lo tanto en este estudio se consideró a este tipo de mutaciones como diferentes. Los participantes que no mostraron ninguna mutación de resistencia fueron considerados como sensibles a fármacos.

**Identificación de subtipos de VIH y análisis filogenético.** Los subtipos de VIH se identificaron comparando las secuencias obtenidas de virus de plasma e integrado en PBMCs con secuencias de referencia mediante el programa REGA (<http://www.bioafrica.net/virus-genotype/>) y mediante la construcción de árboles filogenéticos. El análisis filogenético se realizó por el método de Neighbor-joining con el modelo Maximum Composite Likelihood y 1,000 replicaciones de bootstrap usando el programa Mega versión 4.

**Análisis estadístico.** Para el análisis de resultados se hizo una base de datos con información sociodemográfica de los participantes. Se obtuvo media y rango intercuartilo para las variables cuantitativas, para las variables cualitativas se obtuvieron frecuencias simples y relativas. Para determinar las diferencias entre las mutaciones en ambos compartimentos se utilizó la prueba de McNemar.

### III. RESULTADOS

Se reclutaron 48 personas con infección por VIH, de las cuales 40 fueron vírgenes al tratamiento antirretroviral y 8 tenían falla virológica y/o inmunológica. De cada participante se obtuvo muestra de sangre periférica de la que se separó plasma y PBMCs. Por cada muestra se realizaron pruebas de cuenta de T CD4+ y Carga Viral (CV). Tres de las personas sin tratamiento antirretroviral tuvieron CV indetectable (<50 copias/mL), por lo que se excluyeron del análisis de resistencia y del análisis de subtipos circulantes. De las 37 muestras de personas sin tratamiento que se analizaron, 36 amplificaron en RNA viral de plasma y en DNA proviral de PBMCs y una sólo amplificó en RNA viral de plasma. Las 8 muestras analizadas de personas en falla terapéutica amplificaron en ambos compartimentos.

La proporción de hombres/mujeres con VIH en esta población fue de 7:3 en personas sin tratamiento antirretroviral y de 4:1 en personas con falla virológica. Actualmente la proporción de hombres/mujeres con VIH en México es de aproximadamente 5:1. La media de edad fue mayor en las personas con fracaso terapéutico, quienes además presentaron cuentas de Ln T CD4+ más bajas y CV más elevados, comparados con las personas sin tratamiento (cuadro 1). Más del 70% de las personas vírgenes a tratamiento ARV se encontraba en la etapa tardía de la infección (CD4+ <500 células/µL) (datos no mostrados).

Cuadro 1: Principales características de la población estudiada.

Características	Sin Tratamiento	Con Falla al Tratamiento
No. de personas	37	8
Edad (años)		
• Media	33.4	52.0
• Rango	19 – 63	32 – 65
Sexo (%)		
• Masculino	73	85.71
• Femenino	27	14.28
Cuenta de CD4+ (células/µL)		
• Media	372.27	278.95
• Rango	13 – 918	108 – 520
Carga Viral (copias/mL)		
• Media	117,147.12	180,494
• Rango	<50 - >1,000,000	2,360 - >1,000,000

**Resistencia primaria.**

Se observó un riesgo intermedio/alto de presentar resistencia primaria (RR>15) a al menos una familia de ARVs en 11% de los participantes al analizar las secuencias provirales de PBMCs y en 13.5% al analizar secuencias de virus libre en plasma. El 2.7% de los participantes tuvieron resistencia a al menos dos familias de ARVs en RNA viral de plasma, mientras que ningún participante mostró resistencia a dos familias de ARVs en DNA proviral de PBMCs (cuadro 2).

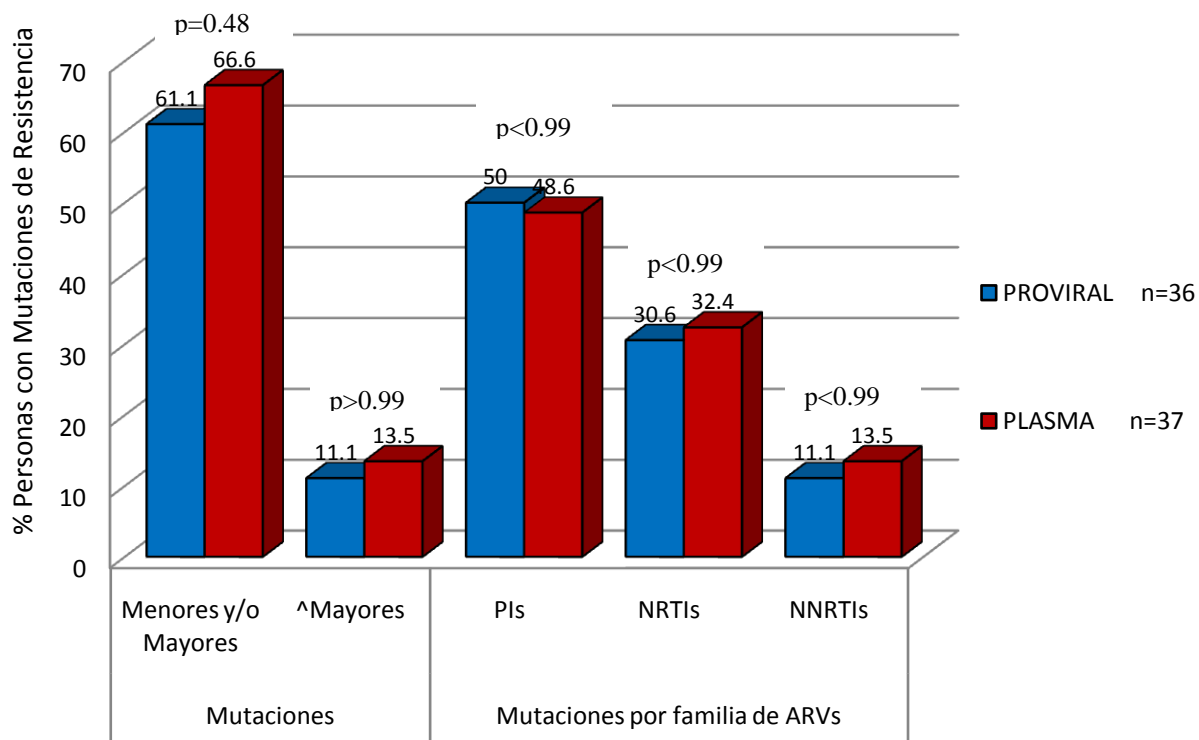
Cuadro 2: Porcentaje de personas sin tratamiento que mostraron resistencia a familias de fármacos en DNA proviral de PBMCs y RNA viral de plasma.

Resistencia por familia de fármacos*	DNA Proviral de PBMC, n (%)	RNA Viral de Plasma, n (%)
A al menos 1 grupo de ARV	4 (11.1)	5 (13.5)
• PIs	0	1 (2.7)
• NRTIs	3 (8.3)	3 (8.3)
• NNRTIs	1 (2.7)	2 (5.4)
A al menos 2 grupo de ARVs	0	1 (2.7)
• PIs +NRTIs	0	1(2.7)
• PIs+NNRTIs	0	0
• NRTIs+NNRTIS	0	0
A 3 grupos de ARVs	0	0
• PIs+NRTIs+NNRTIs	0	0

\* RR >15 para cualquier fármaco.

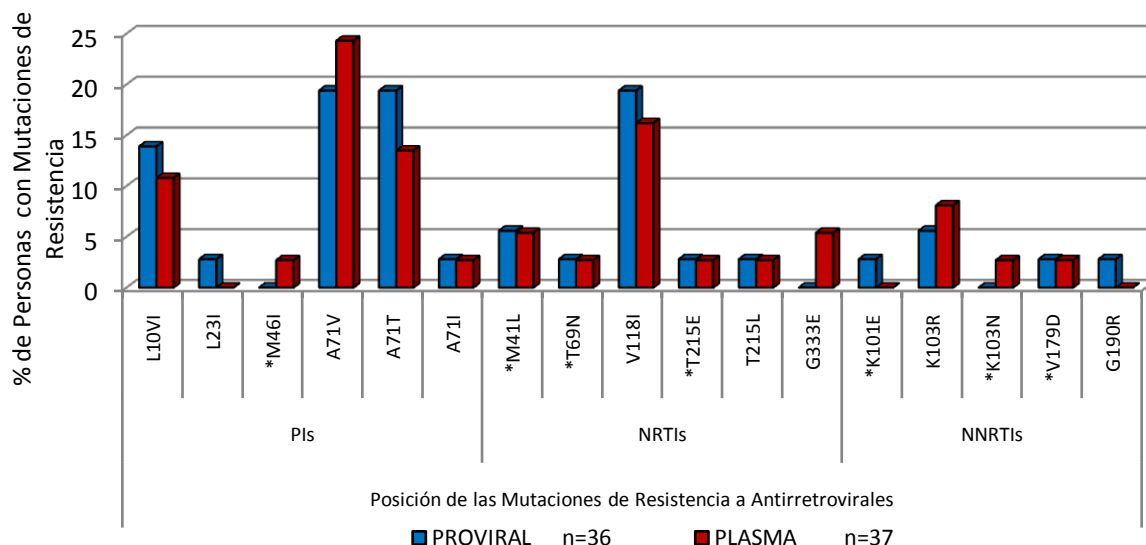
Al determinar la frecuencia de mutaciones de resistencia primaria a ARVs en el gen *pol*, se observó que 61% de los participantes tuvieron al menos una mutación (menor o mayor) de resistencia en DNA proviral de PBMCs y 66% en RNA viral de plasma, mientras que 11.1% tuvieron mutaciones mayores en DNA proviral de PBMCs y 13.5% en RNA viral de plasma. La diferencia entre la suma general de todas las mutaciones (menores o mayores) en DNA proviral de PBMCs y RNA viral de plasma de todos los pacientes fue estadísticamente significativa ( $p= 0.04$ ), sin embargo, al estratificar por mutaciones (menores+mayores), mutaciones mayores y por familia de fármacos en cada compartimento, las diferencias no fueron estadísticamente significativas. La frecuencia de mutaciones fue mayor para PIs y menor para NNRTIs tanto en DNA proviral de PBMCs como en RNA viral de plasma (figura 1).





**Figura 1.** Personas vírgenes al tratamiento antirretroviral que presentaron mutaciones de resistencia mayores o menores y por familia de ARVs en DNA proviral de PBMCs y RNA viral de plasma. Los valores de p se obtuvieron con la prueba no paramétrica de McNemar y se consideró un valor  $p < 0.005$  como estadísticamente significativo. PIs, Inhibidores de Proteasa; NRTIs, Inhibidores Análogos de Nucleósidos de la Transcriptasa reversa; NNRTIs, Inhibidores no Análogos de Nucleósidos de la Transcriptasa reversa. ^Mutaciones con  $RR < 15$ .

En la proteasa se identificaron 6 mutaciones de resistencia, una de las cuales se encontró exclusivamente en DNA proviral de PBMCs y una exclusivamente en RNA viral de plasma. La mutación más frecuente en virus de plasma fue A71V y en provirus A71V y A71T y la única mutación mayor fue M46I (figura 2). En la transcriptasa reversa se encontraron 6 mutaciones para NRTIs, una exclusivamente en RNA viral de plasma. La mutación más frecuente fue V118I en ambos compartimentos. Tres mutaciones fueron mayores (M41L, T69N y T215L) (figura 2). A NNRTIs se detectaron cinco mutaciones diferentes, dos se observaron exclusivamente en DNA proviral de PBMCs y una exclusivamente en RNA viral. La mutación más frecuente en ambos compartimentos fue K103R. Tres de las mutaciones identificadas son mayores K101E, K103N y V179D (figura 2).



**Figura 2.** Mutaciones de Resistencia a inhibidores de proteasa (PIs), inhibidores análogos de nucleósidos de la transcriptasa inversa (NRTIs) y a Inhibidores no análogos de nucleósidos de la Transcriptasa reversa (NNRTIs) en personas vírgenes al tratamiento en DNA proviral de PBMCs y RNA viral de plasma.\*Mutaciones mayores

### Resistencia secundaria.

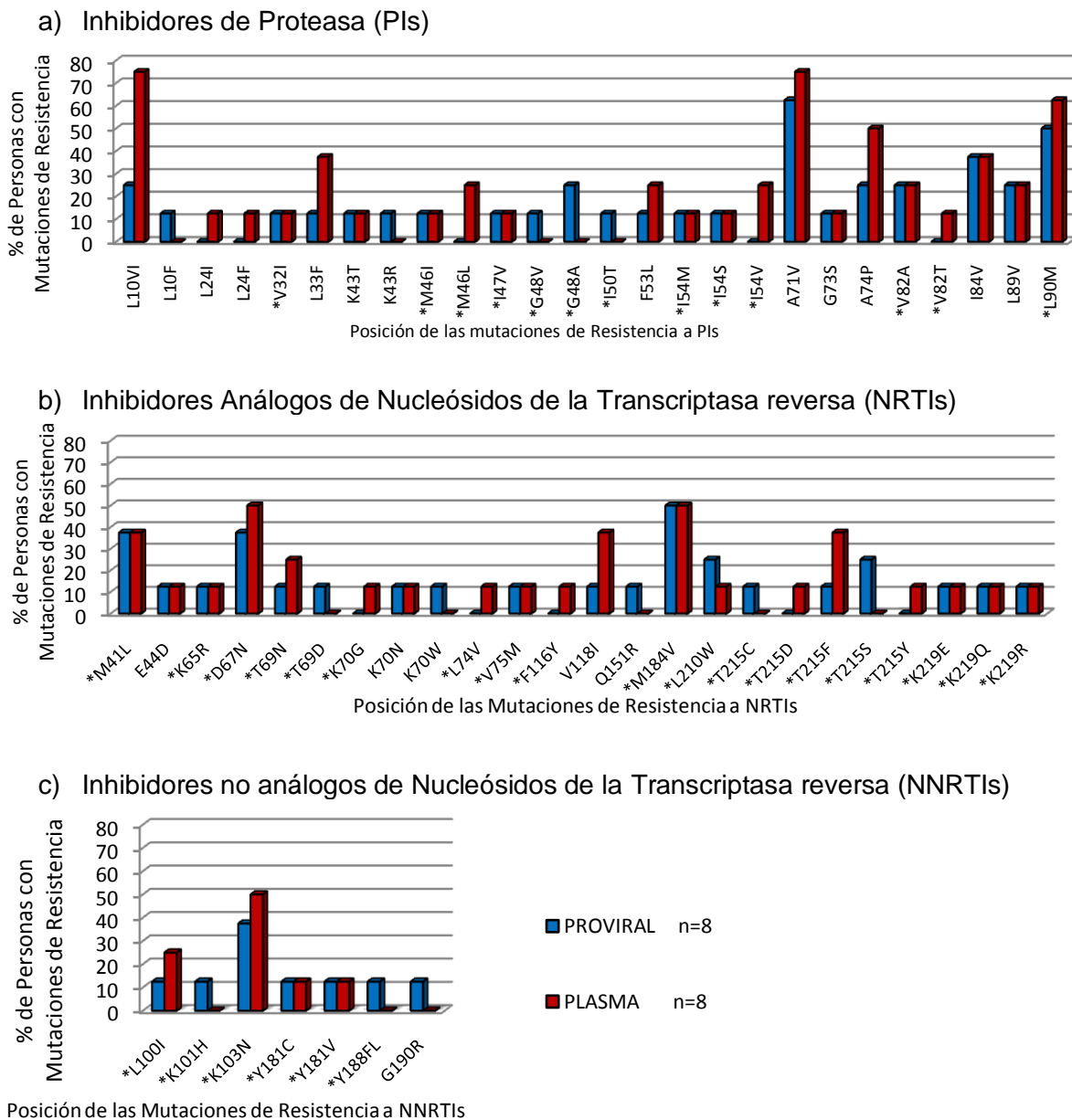
En resistencia secundaria, las ocho personas tuvieron mutaciones mayores de resistencia en RNA viral de plasma y en DNA proviral de PBMCs. La diferencia en frecuencia general de mutaciones en DNA proviral de PBMCs y RNA viral de plasma fue estadísticamente significativa ( $p=0.00008$ ). Cuando se evaluó la resistencia por familia de fármacos se observó que hubo mayor resistencia a PIs y NNRTIs en RNA viral de plasma. Al combinar dos familias de fármacos se notó que en todas las combinaciones (PIs+NRTIs, PIs+NNRTIs y NRTIs+NNRTIs) hubo también mayor resistencia en RNA viral de plasma (cuadro 3).

**Cuadro 3:** Personas con falla al tratamiento que mostraron resistencia a Fármacos en DNA proviral de PBMCs y RNA viral de plasma

Resistencia por familia de fármacos*	DNA proviral de PBMCs, n (%)	RNA viral de plasma, n (%)
A al menos 1 grupo de ARV	7 (88)	8 (100)
• PIs	5 (63)	6 (75)
• NRTIs	7 (88)	7 (88)
• NNRTIs	4 (50)	5 (63)
A al menos 2 grupo de ARVs	7 (88)	7 (88)
• PIs +NRTIs	5 (63)	6 (75)
• PIs +NNRTIs	2 (25)	4 (50)
• NRTIs+NNRTIS	4 (50)	5 (63)
A 3 grupos de ARVs	2 (25)	2 (25)
• PIs+NRTIs+NNRTIs	2 (25)	2 (25)

\*  $RR>15$  para cualquier fármaco

Se identificaron 26 mutaciones de resistencia a PIs, de las cuales cinco se detectaron exclusivamente en RNA viral de plasma y cinco exclusivamente en DNA proviral de PBMCs. La mitad de las mutaciones encontradas fueron mayores. Las mutaciones menores más frecuentes en RNA viral de plasma fueron L10V, A71V y A74P y la mutación mayor L90M en más del 60% de los participantes. En DNA proviral de PBMCs la mutación menor más frecuente fue A71V y la mutación mayor L90M en 50% de los participantes (figura 3a).



**Figura 3.** Mutaciones de resistencia en DNA proviral de PBMCs y RNA viral de plasma en personas con fracaso terapéutico. \*Mutaciones mayores

Se encontraron 24 Mutaciones de resistencia a NRTIs, de las cuales cinco estuvieron exclusivamente en DNA proviral de PBMCs y cinco exclusivamente en RNA viral de plasma. Las mutaciones más frecuentes en RNA viral de plasma fueron las mutaciones mayores D67N y M184V y en DNA proviral de PBMCs M184V, cada una estuvo presente en el 50% de los participantes (Figura 3b).

En los NNRTIs se encontraron siete mutaciones de resistencia, tres de las cuales estuvieron exclusivamente en DNA proviral de PBMCs. Las mutaciones de resistencia encontradas para NNRTIs fueron mayores. La mutación más frecuente en ambos compartimentos fue K103N, la cual se encontró en 37.5% de los participantes en DNA proviral de PBMCs y en 50% de los participantes en RNA viral de plasma (Figura 3c). Esto indica que estas personas han tomado al menos uno de tres NNRTIs (DVL, EFV o NVP), ya que K103N es seleccionada por cualquiera de estos fármacos y disminuye la susceptibilidad a los tres.

En el análisis de resistencia secundaria individual de cada paciente se observó que los grupos de fármacos a los cuales se presentó resistencia fueron aquellos a los que habían sido expuestos previamente. Los fármacos más utilizados fueron los NRTIs y fue hacia los que se observó mayor resistencia (cuadro 4).

**Cuadro 4.** Fármacos en uso durante la falla al tratamiento y resistencia genotípica identificada en virus libre en plasma de personas con falla.

Personas	Fecha de inicio de tratamiento	Fármacos en uso durante la falla	Esquemas antes de falla	Resistencia identificada a fármacos
001-Tx-JLJM	10/2003	4NRTIs	2	PIs+NRTIs
002-Tx-ARE	03/2005	2NRTIs+1NNRTI	1	NRTIs+NNRTIs
003-Tx-ASC	03/1999	2NRTIs+2PIs	2	PIs+NRTIs
004-Tx-PJRV	03/2002	3PIs+1NNRTI	3	NRTIs+NNRTIs
005-Tx-FAC	05/2001	3PIs	2	NRTIs+NNRTIs+PIs
006-Tx-EAMC	01/1999	2NRTIs+1PI	5	PIs+NRTIs+NNRTIs
007-Tx-JVD	11/1998	2NRTIs+3PIs	3	PIs+NRTIs
008-TX-AGL	09/2006	4NRTIs	1	PIs+NRTIs+NNRTIs

PIs, Inhibidores de Proteasa; NRTIs, Inhibidores Análogos de Nucleósidos de la Transcriptasa reversa; NNRTIs, Inhibidores no Análogos de Nucleósidos de la Transcriptasa reversa.

### Comparación de mutaciones de resistencia en virus libre en plasma e integrado en PBMCs.

Cuando se analizó la discordancia de mutaciones en DNA proviral de PBMCs y RNA viral de plasma, se observó que el 23% de las personas vírgenes a ARVs, que amplificaron la secuencia de interés en ambos compartimentos, presentaron discordancia; mientras que en las personas con falla, esta discordancia se observó en el 100% de los participantes. En ambos grupos se encontró mayor número de mutaciones discordantes en RNA viral de plasma y esta discordancia fue mayor en la región de la proteasa. En personas con falla virológica/terapéutica se observó mayor número de mutaciones en RNA de plasma, pudieron observarse también mutaciones que sólo se encontraron en DNA proviral en PBMCs, principalmente en la región de la proteasa (cuadro 5).

**Cuadro 5:** Personas sin tratamiento antirretroviral previo y con falla que mostraron discordancia de mutaciones en DNA proviral de PBMCs y RNA viral de plasma.

Clave	Mutaciones*			
	DNA Proviral de PBMCs		RNA viral de Plasma	
	Proteasa	Transcriptasa reversa	Proteasa	Transcriptasa reversa
<b>Personas sin Tratamiento</b>				
013-DLA	A71V	-	A71V	<b>G333E</b>
016-LRM	A71T	-	A71T	<b>K103N</b>
018-EGZ	-	-	-	<b>G333E</b>
021-RGE	L10I	T215L	L10I, <b>M46I</b>	T215L
028-SCFR	-	-	<b>A71V</b>	-
032-DPMS	A71V	V118I	A71V	V118I, <b>K103R</b>
<b>Personas con Falla</b>				
002-Tx-ARE	-	K65R, <b>T69N</b> , <b>K70W</b> , <b>Q151PR</b> , M184V, K219R, K103N, Y181C	-	K65R, <b>K70N</b> , M184V, K219R, K103N, Y181C
003-Tx-ASC	I84V, A71V	-	I84V, <b>L90M</b> , <b>L10I</b> , A71V, <b>T74P</b>	<b>M184V</b>
004-Tx-PJRV	-	<b>M184V</b> , <b>K101HQ</b> , <b>Y188FL</b> , <b>G190A</b>	-	-
005-Tx-FAC	<b>V82A</b> , I84V, K43T	D67N, <b>T215S</b> , K103N	<b>M46L</b> , <b>G48A</b> , <b>I54V</b> , <b>V82T</b> , I84V, <b>L10V</b> , <b>L24I</b> , <b>L33F</b> , K43T, <b>A71V</b> , <b>T74P</b>	D67N, <b>T69N</b> , <b>F116FY</b> , <b>V118I</b> , <b>T215DGHR</b> , <b>G333E</b> , <b>L100I</b> , K103N
008-Tx-AGL	L90M, A71AV, T74TP	M41L, E44D, L210W, T215SY	L90M, <b>L10I</b> , <b>L24F</b> , <b>L33F</b> , <b>F53L</b> , A71V, T74P	M41L, E44D, <b>D67N</b> , <b>L74V</b> , <b>V118I</b> , <b>M184V</b> , L210W, T215Y, <b>K103IT</b>

\* **Azul:** mutaciones encontradas exclusivamente en DNA proviral de PBMCs. **Rojo:** mutaciones encontradas exclusivamente en RNA viral de plasma. **Verde:** mutaciones encontradas en ambos compartimentos pero con diferente cambio de aminoácido.

Al hacer el análisis de distribución de resistencia por grupos de fármacos, las personas sin tratamiento tuvieron menor resistencia a PIs en DNA proviral de PBMCs y mayor resistencia a NNRTIs en RNA viral de plasma, mientras que las personas con fracaso terapéutico tuvieron menor resistencia a PIs en DNA proviral de PBMCs y mayor a NRTIs en RNA viral de plasma (cuadro 6).

**Cuadro 6:** Distribución de resistencia a antirretrovirales en personas sin tratamiento y en personas con fracaso terapéutico.

Nivel de Resistencia <sup>1</sup>	Personas sin tratamiento						Personas con fracaso terapéutico						
	Proviral n=36			Plasma n=37			Proviral n=8			Plasma n=8			
	Susceptible	Intermedio	Alto	Susceptible	Intermedio	Alto	Susceptible	Intermedio	Alto	Susceptible	Intermedio	Alto	
PIs	Atazanavir (ATV)	36	-	-	36	1	-	2	3	3	2	1	5
	Duranavir (DRV)	36	-	-	37	-	-	5	1	2	3	1	4
	Fosamprenavir (FPV)	36	-	-	37	-	-	2	2	4	2	1	5
	Indinavir (IDV)	36	-	-	37	-	-	2	3	3	2	1	5
	Lopinavir (LPV)	36	-	-	37	-	-	3	2	3	2	2	4
	Nelfinavir (NFV)	35	1	-	35	2	-	8	-	-	2	-	6
	Saquinavir (SQV)	36	-	-	37	-	-	8	-	-	-	-	6
	Tipranavir (TPV)	36	-	-	37	-	-	3	2	3	1	-	5
NRTIs	Lamivudina (3TC)	36	-	-	37	-	-	3	1	4	2	1	5
	Abacavir (ABC)	35	1	-	36	1	-	2	1	5	2	-	6
	Zidovudina (AZT)	33	2	1	34	2	1	8	-	-	2	-	6
	Estavudina (d4T)	33	2	1	34	2	1	8	-	-	2	-	6
	Didanosina (ddI)	34	2	-	35	2	-	2	1	5	2	-	6
	Emtricitabina (FTC)	36	-	-	37	-	-	3	1	4	2	1	5
	Tenofovir (TDF)	35	1	-	36	1	-	2	1	5	2	-	6
NNRTIs	Delavirdina (DLV)	35	-	1	35	-	2	4	-	4	4	-	4
	Efavirenz (EFV)	35	1	-	35	1	1	4	-	4	4	-	4
	Etravirina (ETR)	35	1	-	36	1	-	5	-	3	5	-	3
	Nevirapina (NVP)	35	-	1	35	-	2	4	-	4	4	-	4

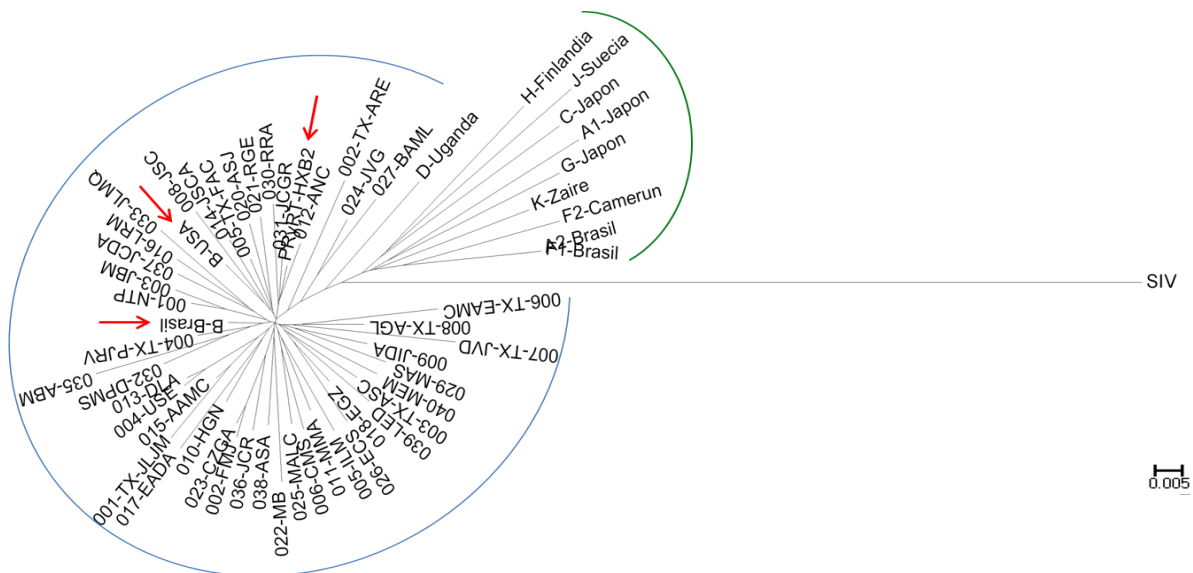
<sup>1</sup>El nivel de Resistencia fue medido como: Susceptible (RR>15), Intermedio (RR=15-29) y Alto (RR<30).

### Subtipificación del VIH.

Cuando se determinó el subtipo de VIH circulante en la población en las 37 personas sin tratamiento antirretroviral y en las 8 personas con falla al tratamiento, únicamente se identificó al subtipo B.

El análisis filogenético se realizó comparando las secuencias de las 37 personas vírgenes al tratamiento y las 8 personas con falla al tratamiento antirretroviral, incluyendo tres cepas de referencia del subtipo B: HXB2, una cepa de Brasil (AY173956) y una de Estados Unidos (AB078005). Se observó un grupo

filogenético bien definido para todas las secuencias de Guerrero, las cuales se agruparon con las secuencias consenso B. Las secuencias de referencia de otros subtipos del grupo M (A1, A2, C, D, F1, F2, G, H, J y K) y una secuencia de referencia del Virus de la Inmunodeficiencia del Simio (SIV) formaron una rama separada del cluster de secuencias de Guerrero (figura 4). Todas las secuencias de referencia para este análisis fueron obtenidas de la Base de Datos de Los Alamos (2008).



**Figura. 4:** Análisis filogenético de las secuencias obtenidas de personas con VIH del estado de Guerrero. Las secuencias de 1302 nucleótidos del gel *pol* de personas con VIH del estado de Guerrero (**Círculo azul**) fueron comparadas con secuencias de referencia del subtipo B (HXB2, Brasil y USA; **flechas rojas**), con los otros subtipos del grupo M (A1, A2, C, D, F1, F2, G, H, J y K; **círculo verde**) y una secuencia del Virus de la Inmunodeficiencia del Simio (SIV), utilizando el programa MEGA4 con método de Neighbor-Joining y el modelo Maximum Composite Likelihood, el bootstrap del árbol fue inferido de 1,000 réplicas. Todas las secuencias de referencia fueron obtenidas de la base de los Álamos (2008).

#### IV. DISCUSIÓN

De los 40 participantes vírgenes al tratamiento reclutados, tres tuvieron CV <2,000 copias/mL, y podría tratarse de una situación de buen pronóstico para las personas; sin embargo, debe considerarse este resultado con cierta reserva porque las muestras fueron analizadas aproximadamente 24 horas después de obtenidas, por lo que no se descarta la posibilidad de que el RNA viral se haya degradado durante el transporte y por lo tanto la CV pudo haber disminuido. Por otro lado, el que una de las muestras haya amplificado sólo en RNA viral de plasma puede explicarse en el sentido de la gran variabilidad del VIH, cuya secuencia del sitio de unión de iniciadores en el provirus pudo estar modificado y por lo tanto no hay amplificación, aún con CV alta.

La elección del primer esquema de tratamiento para las personas con VIH es decisiva para producir una buena y duradera respuesta contra el virus, por esta razón es importante considerar la posibilidad de la existencia de cepas de VIH resistentes a los fármacos.<sup>31</sup> El resultado de prevalencia de mutaciones mayores en RNA viral de plasma (13.5%) de nuestro estudio es menor a lo reportado por Escoto-Delgadillo *et al.*, en 2005 en Jalisco, quien reporta que la prevalencia de mutaciones mayores es del 16%, sin embargo, existen diferencias metodológicas y definiciones de resistencia entre su estudio y el nuestro.<sup>15</sup>

En otros estudios de prevalencia de resistencia primaria en México, como el de Valle-Bahena *et al.*, se reporta baja prevalencia (3%) de mutaciones mayores<sup>26</sup>; sin embargo, ellos analizan regiones del gen *pol* amplificando por pequeños segmentos, excluyendo así regiones donde puede haber mutaciones de resistencia, mientras que en este estudio hicimos la amplificación del gen en un solo segmento.

Los datos preliminares de otro estudio en proceso con 639 participantes de diferentes puntos de México y que es comparable con el presente estudio por utilizar las mismas definiciones de mutaciones de resistencia y misma metodología, ha encontrado que la prevalencia de resistencia en virus de plasma es de 7.3%,<sup>16</sup> un valor menor que el nuestro, aunque hay que considerar que el número de participantes vírgenes al tratamiento en nuestra cohorte es reducido (n=37). Es



posible que la frecuencia de resistencia en Guerrero sea mayor que en otras áreas de la República.

En diversos países se han reportado diferentes prevalencias de resistencia primaria. En el Reino Unido, la prevalencia de resistencia genotípica en el 2003 fue del 14%,<sup>22</sup> un resultado similar a lo encontrado en nuestro estudio (13.5%) y que además utiliza la misma definición de mutaciones de resistencia que nosotros; sin embargo, habrá que considerar que ambos estudios se han realizado con cinco años de diferencia, por lo que podemos asumir que en este momento la prevalencia de resistencia en Inglaterra puede ser mayor, debido al uso generalizado de los ARVs, comparado con Guerrero donde el uso de ARVs es reciente.

En Estados Unidos, un estudio similar al nuestro publicado en 2005 reportó una prevalencia de resistencia primaria genotípica de 10.8%,<sup>24</sup> un valor menor a lo encontrado en nuestro estudio; sin embargo, el periodo de enrolamiento de participantes fue de 1999-2003, mientras que en el nuestro fue de 2007-2008, por lo que es posible que la prevalencia actual de resistencia primaria en Estados Unidos haya aumentado al generalizarse el uso de la terapia antirretroviral. Otro estudio en Estados Unidos, en 2005 reporta 8% de resistencia primaria fenotípica y 10% de resistencia primaria genotípica,<sup>32</sup> en Alemania en el 2005 se reportó una prevalencia genotípica de 9%<sup>23</sup> y en Canadá un estudio que enroló participantes hasta 1999 reportó en 2003 una prevalencia de resistencia genotípica de 7.8%,<sup>25</sup> sin embargo estos estudios no son totalmente comparables entre sí, ni con el nuestro, por las diferencias en la definición de resistencia y en la metodología utilizada.

La relevancia que tiene el incremento en la prevalencia de cepas virales seleccionadas con mutaciones de resistencia como consecuencia del uso de los ARVs es una realidad que debe ser valorada en su justa dimensión, tanto por la evidencia de transmisión de resistencia primaria, con la subsecuente reducción del éxito terapéutico,<sup>19</sup> como por el uso confiado de los esquemas de ARV tradicionales.

La comparación de prevalencia de mutaciones de resistencia primaria y secundaria en RNA viral de plasma y DNA proviral de PBMCs en nuestro estudio mostró datos discordantes, tanto en mutaciones observadas como en frecuencia de las mismas en los dos compartimentos. Nosotros esperábamos encontrar mayor

prevalencia de mutaciones de resistencia primaria en DNA proviral de PBMCs en virtud de que se ha reportado que éste compartimento puede servir como reservorio de mutaciones de resistencia que representan una desventaja en la aptitud replicativa para los virus que las presentan en ausencia del fármaco ARV selector.<sup>29, 30</sup> Se sabe que varias mutaciones de resistencia a ARVs disminuyen la capacidad replicativa del VIH y es por esto que los virus con mutaciones de resistencia pueden quedar almacenados como DNA proviral en las células sin expresarse como virus en replicación activa. Se sabe también que algunas mutaciones de resistencia en los virus resistentes transmitidos tienden a revertir al no estar bajo presión terapéutica. Así mismo, virus con mutaciones de resistencia pueden recuperar parcialmente su capacidad de replicación al acumular mutaciones diferentes a las que confieren resistencia a fármacos (compensatorias).<sup>33</sup> A pesar de esto, nuestros hallazgos refieren una mayor resistencia primaria en RNA viral de plasma que en DNA proviral de PBMCs (13.5% contra 11.1%), posiblemente porque que las mutaciones encontradas en plasma no implican costos elevados en la capacidad replicativa del VIH o a que han aparecido mutaciones adicionales que compensan la pérdida de la capacidad replicativa del virus. En general, no encontramos en RNA viral de plasma mutaciones con alto costo para la capacidad replicativa como K65R, M184V, T215Y y D67Y.<sup>33</sup>

Una mutación de resistencia en RNA viral de plasma, encontrada en 6.3% de los participantes fue K103N, la cual confiere resistencia cruzada a la familia de los NNRTIs y cuyo costo en la capacidad replicativa viral se sabe que es bajo (6.2%).<sup>33</sup> En este sentido, la baja barrera genética existente para la aparición de resistencia a través de esta mutación, así como su bajo impacto en la capacidad replicativa viral y el uso frecuente de efavirenz, uno de los NNRTIS, en la terapia ARV en Guerrero, podrían facilitar su aparición y permanencia en personas que adquieren la infección a partir de individuos con tratamiento ARV.

Una posible explicación de la discordancia observada entre las mutaciones de resistencia en virus libre en plasma e integrado en PBMCs podría ser la compartimentalización del VIH en las personas con la infección. Se ha reportado que los virus de diferentes compartimentos en un mismo individuo presentan

variabilidad entre sí.<sup>34</sup> Así, virus provenientes de otros compartimentos como nódulos linfáticos o tejidos linfoides asociados a mucosas, caracterizados por ambientes selectivos particulares, podrían presentarse como virus libre en plasma, mostrando diferencias en las mutaciones con respecto al reservorio viral integrado en PBMCs.

Otro factor importante de la discordancia en la presencia de mutaciones en ambos compartimentos son los linfocitos T citotóxicos (CTLs), los cuales eliminan a las células infectadas por VIH al reconocer epítomos virales específicos presentados en el contexto del Antígeno Leucocitario Humano clase I (HLA-I).<sup>35</sup> Existe la posibilidad de que debido a la presión selectiva impuesta por los CTLs, se estén seleccionando mutaciones de escape inmune en sitios también asociados a resistencia a fármacos ARVs (dobles mutantes) en diferentes compartimentos virales.<sup>36</sup> De este modo, aún en personas vírgenes al tratamiento ARV, estas mutaciones podrían observarse en virus libres en plasma sin verse reflejados en el compartimiento proviral de PBMCs.

La resistencia secundaria en la población estudiada es muy elevada en DNA proviral de PBMCs y RNA viral de plasma. Esto debido posiblemente a que en las personas con tratamiento, ya se han seleccionado cepas resistentes que escapan al régimen terapéutico y que son mantenidas por la presión selectiva constante de los ARVs, reflejándose por esta razón en ambos compartimentos. Nuestros resultados son similares a los reportados en otras poblaciones, donde han encontrado que la resistencia secundaria en personas que están fallando al tratamiento es de 91%-98%.<sup>12, 20, 28</sup> En los NRTIs y NNRTIs las mutaciones más frecuentes fueron mayores. El hecho de que en todos los casos los puntajes totales de RR de resistencia fueron altos (>30) explica virológicamente la falla clínica/inmunológica observada en los participantes. Además, fue interesante observar que los grupos de fármacos a los que se presentaba resistencia fueron precisamente los utilizados antes de fallar al tratamiento, demostrando claramente que el uso de estos fármacos propició la selección de mutantes resistentes.

El presente estudio mostró que el subtipo de VIH de mayor prevalencia en nuestra cohorte de participantes de Guerrero es el B, mismo que diversos autores han reportado como dominante en estudios previos realizados en México.<sup>13, 14</sup> En

contraste, la existencia de subtipos como el C, F, formas recombinantes B/F, CRF\_02AG y otras recombinantes menos frecuentes además del subtipo B, han sido reportadas en Brasil<sup>12</sup> y otros países de América del sur.<sup>11</sup> Nuestros datos muestran una epidemia altamente homogénea a pesar de los complejos flujos migratorios de la población; sin embargo, considerando el tamaño de muestra del presente estudio, la presencia de otros subtipos y formas recombinantes en Guerrero aún no puede descartarse. Nuestro hallazgo en la población guerrerense sugiere que la adquisición de la infección se da localmente, dada la homogeneidad que presentan las secuencias al hacer el análisis filogenético, tanto en personas sin tratamiento como en personas con falla al tratamiento con ARVs.

Este estudio es uno de los primeros que reporta datos sobre la prevalencia de resistencia primaria y epidemiología molecular del VIH en Guerrero. Sin embargo, una de las limitantes del mismo es el tamaño de muestra, por lo tanto, sugerimos ampliar el presente estudio para obtener una cohorte mayor que permita sacar conclusiones más robustas que nos permitan determinar si la tendencia de aumento en la frecuencia de resistencia primaria en el estado, con respecto al promedio nacional es real y que además nos guíen para la toma de decisiones en salud pública para un mejor diagnóstico, seguimiento y prevención de la infección, así como para optimizar las opciones de tratamiento y calidad de vida de las personas que viven con VIH. Más aún, un conocimiento sólido de la epidemia a nivel regional nos podría guiar para pensar en el desarrollo de una vacuna que funcione a nivel regional.

En este estudio se ha demostrado que la prevalencia de resistencia primaria en el estado de Guerrero es elevada (13.5% en RNA viral de plasma y 11% en DNA proviral de PBMCs) en comparación con otros estados del país y con otros países en vías de desarrollo. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las frecuencias de mutaciones de resistencia encontradas en DNA proviral de PBMCs y RNA viral de plasma, siendo por lo tanto, igualmente útil el uso de plasma o PBMCs de personas con VIH para realizar pruebas de resistencia a ARVs. La epidemia en Guerrero parece estar producida por virus altamente homogéneos de subtipo B, de manera similar a lo observado en otras regiones del país. A diferencia de otras regiones del continente, la frecuencia de otros subtipos y formas

recombinantes parece ser muy baja. Nuestros resultados señalan la importancia de hacer intervenciones para mejorar la adherencia al tratamiento, así como para mejorar la información entre las personas en tratamiento para así reducir la transmisión de cepas resistentes a nivel regional. Además, la realización de pruebas de resistencia previas al inicio del tratamiento antirretroviral sería recomendable para así mejorar la eficacia del tratamiento antirretroviral entre las personas con VIH del estado de Guerrero.

**V. REFERENCIAS**

- 1 2007 Report on the global aids epidemic. [pagina web] 2007 2007 [cited 2007 27-noviembre-2007]; Available from: [http://www.unaids.org/en/HIV\\_data/Epidemiology/default.asp](http://www.unaids.org/en/HIV_data/Epidemiology/default.asp) y [www.unaids.org](http://www.unaids.org).
- 2 Epidemiología del VIH: El SIDA en cifras, Junio 2008. [página web] 2008 [cited 2008 29-Julio-2008]; Available from: <http://www.salud.gob.mx/conasida/> y <http://www.conasida.com.mx>
- 3 Nielsen MH, Pedersen FS, Kjems J. Molecular strategies to inhibit HIV-1 replication. *Retrovirology*. 2005;2(1):10.
- 4 Hoffmann C, Rockstroh JK, Kamps BS, eds. *HIVMedicine2006*. 14 ed. Paris: Flying 2006.
- 5 Lal RB, Chakrabarti S, Yang C. Impact of genetic diversity of HIV-1 on diagnosis, antiretroviral therapy & vaccine development. *Indian J Med Res*. 2005 Apr;121(4):287-314.
- 6 Requejo HI. Worldwide molecular epidemiology of HIV. *Rev Saude Publica*. 2006 Apr;40(2):331-45.
- 7 Kalish ML, Robbins KE, Pieniazek D, Schaefer A, Nzilambi N, Quinn TC, et al. Recombinant viruses and early global HIV-1 epidemic. *Emerg Infect Dis*. 2004 Jul;10(7):1227-34.
- 8 Buonaguro L, Tornesello ML, Buonaguro FM. Human immunodeficiency virus type 1 subtype distribution in the worldwide epidemic: pathogenetic and therapeutic implications. *J Virol*. 2007 Oct;81(19):10209-19.
- 9 Kandathil AJ, Ramalingam S, Kannangai R, David S, Sridharan G. Molecular epidemiology of HIV. *Indian J Med Res*. 2005 Apr;121(4):333-44.
- 10 Taylor BS, Sobieszczyk ME, McCutchan FE, Hammer SM. The challenge of HIV-1 subtype diversity. *N Engl J Med*. 2008 Apr 10;358(15):1590-602.
- 11 Laguna-Torres A, Olson J, Sánchez S, Montano S, Chauca G, Carrión G, et al. Distribución de los subtipos del VIH-1 en nueve países de América del Sur. *Rev Peru Med Exp*. 2005;22(1):12-8.
- 12 Couto-Fernandez JC, Silva-de-Jesus C, Veloso VG, Rachid M, Gracie RS, Chequer-Fernandez SL, et al. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) genotyping in Rio de Janeiro, Brazil: assessing subtype and drug-resistance associated mutations in HIV-1 infected individuals failing highly active antiretroviral therapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005 Feb;100(1):73-8.
- 13 Eyzaguirre L, Brouwer KC, Nadai Y, Patterson TL, Ramos R, Firestone Cruz M, et al. First molecular surveillance report of HIV type 1 in injecting drug users and female sex workers along the U.S.-Mexico border. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2007 Feb;23(2):331-4.
- 14 Rivera-Morales LG, Novitsky VA, Trujillo JR, Lavallo-Montalvo C, Cano-Dominguez C, Ramos-Jimenez J, et al. The molecular epidemiology of HIV type 1 of men in Mexico. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2001 Jan 1;17(1):87-92.
- 15 Escoto-Delgadillo M, Vazquez-Valls E, Ramirez-Rodriguez M, Corona-Nakamura A, Amaya-Tapia G, Quintero-Perez N, et al. Drug-resistance mutations in antiretroviral-

- naive patients with established HIV-1 infection in Mexico. *HIV Med.* 2005 Nov;6(6):403-9.
- 16 Garrido-Rodríguez D, Ávila-Rios S, Vazquez-Pérez J, Reyes-Terán G, Andrade-Villanueva J, Torres-Escobar i, et al. Molecular epidemiology of HIV in Mexico: a clade B-dominated epidemic with low prevalence of primary drug resistance. *AIDS2008. XVII international AIDS conference.* Mexico city, Mex: AIDS 2008.
  - 17 Dorr P, Westby M, Dobbs S, Griffin P, Irvine B, Macartney M, et al. Maraviroc (UK-427,857), a potent, orally bioavailable, and selective small-molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-human immunodeficiency virus type 1 activity. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 Nov;49(11):4721-32.
  - 18 Hoffmann C, Rockstroh JK, Kamps BS, eds. *HIVMedicine2007.* 15 ed. Paris: Flying 2007.
  - 19 Clavel F, Hance AJ. HIV drug resistance. *N Engl J Med.* 2004 Mar 4;350(10):1023-35.
  - 20 Rodríguez MJM, Palomares FJC. Resistencia genotípica del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 en pacientes con fracaso terapéutico. *Med Clin (Barc).* 2004;122(5):161-4.
  - 21 Wensing MJ, Boucher C. World Transmission of Drug-resistant HIV. *AIDS Rev.* 2003;5:140-55.
  - 22 Cane P, Chrystie I, Dunn D, Evans B, Geretti AM, Green H, et al. Time trends in primary resistance to HIV drugs in the United Kingdom: multicentre observational study. *Bmj.* 2005 Dec 10;331(7529):1368.
  - 23 Sagir A, Oette M, Kaiser R, Daumer M, Fatkenheuer G, Rockstroh JK, et al. Trends of prevalence of primary HIV drug resistance in Germany. *J Antimicrob Chemother.* 2007 Oct;60(4):843-8.
  - 24 Novak RM, Chen L, MacArthur RD, Baxter JD, Huppler Hullsiek K, Peng G, et al. Prevalence of antiretroviral drug resistance mutations in chronically HIV-infected, treatment-naive patients: implications for routine resistance screening before initiation of antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis.* 2005 Feb 1;40(3):468-74.
  - 25 Hogg R. S, Bangsberg DR, Lima VD, Alexander C, Bonner S, Yip B, et al. Emergence of Drug Resistance Is Associated with an Increased Risk of Death among Patients First Starting HAART. *PLoS Med.* 2006 september 2006;3(9):1570-78.
  - 26 Valle-Bahena OM, Ramos-Jimenez J, Ortiz-Lopez R, Revol A, Lugo-Trampe A, Barrera-Saldana HA, et al. Frequency of protease and reverse transcriptase drug resistance mutations in naive HIV-infected patients. *Arch Med Res.* 2006 Nov;37(8):1022-7.
  - 27 Diagnostics AM. *Celera ViroSeq™ HIV-1 Genotyping System Report;* 2004.
  - 28 Cavalcanti AM, Lacerda HR, Brito AM, Pereira S, Medeiros D, Oliveira S. Antiretroviral resistance in individuals presenting therapeutic failure and subtypes of the human immunodeficiency virus type 1 in the Northeast Region of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007 Nov;102(7):785-92.
  - 29 Sarmati L, Nicastrì E, Uccella I, D'Ettore G, Parisi SG, Palmisano L, et al. Drug-associated resistance mutations in plasma and peripheral blood mononuclear cells of human immunodeficiency virus type 1-infected patients for whom highly active antiretroviral therapy is failing. *J Clin Microbiol.* 2003 Apr;41(4):1760-2.
  - 30 Parisi SG, Boldrin C, Cruciani M, Nicolini G, Cerbaro I, Manfrin V, et al. Both human immunodeficiency virus cellular DNA sequencing and plasma RNA sequencing are

- useful for detection of drug resistance mutations in blood samples from antiretroviral-drug-naïve patients. *J Clin Microbiol.* 2007 Jun;45(6):1783-8.
- 31 Weinstock HS, Zaidi I, Heneine W, Bennett D, Garcia-Lerma JG, Douglas JM, Jr., et al. The epidemiology of antiretroviral drug resistance among drug-naïve HIV-1-infected persons in 10 US cities. *J Infect Dis.* 2004 Jun 15;189(12):2174-80.
- 32 Ross L, Lim ML, Liao Q, Wine B, Rodriguez AE, Weinberg W, et al. Prevalence of antiretroviral drug resistance and resistance-associated mutations in antiretroviral therapy-naïve HIV-infected individuals from 40 United States cities. *HIV Clin Trials.* 2007 Jan-Feb;8(1):1-8.
- 33 Cong ME, Heneine W, Garcia-Lerma JG. The fitness cost of mutations associated with human immunodeficiency virus type 1 drug resistance is modulated by mutational interactions. *J Virol.* 2007 Mar;81(6):3037-41.
- 34 van Marle G, Gill MJ, Kolodka D, McManus L, Grant T, Church DL. Compartmentalization of the gut viral reservoir in HIV-1 infected patients. *Retrovirology.* 2007;4:87.
- 35 Ahlenstiel G, Roomp K, Daumer M, Nattermann J, Vogel M, Rockstroh JK, et al. Selective pressures of HLA genotypes and antiviral therapy on human immunodeficiency virus type 1 sequence mutation at a population level. *Clin Vaccine Immunol.* 2007 Oct;14(10):1266-73.
- 36 Mason RD, Bowmer MI, Howley CM, Gallant M, Myers JC, Grant MD. Antiretroviral drug resistance mutations sustain or enhance CTL recognition of common HIV-1 Pol epitopes. *J Immunol.* 2004 Jun 1;172(11):7212-9.