



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**“Prevalencia de mutaciones asociadas a resistencia  
antirretroviral, en personas con diagnóstico reciente de  
infección por Virus de Inmunodeficiencia Humana Tipo 1  
(VIH-1) y nunca tratadas”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
BIÓLOGO**

**P R E S E N T A:**

**ROBERTO ALEJANDRO RODRÍGUEZ DÍAZ**



**DIRECTOR DE TESIS:  
MÉDICO CIRUJANO LUIS ENRIQUE SOTO  
RAMÍREZ  
2012**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Hoja de datos del Jurado

1. Datos del Alumno

Rodríguez

Díaz

Roberto Alejandro

56 55 96 75

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

08827695-9

2. Datos del Autor

Med. Cir.

Luis Enrique

Soto

Ramírez

3. Datos del sinodal 1

M en C

Alfonso José

Vilchis

Peluyera

4. Datos del sinodal 2

Dr.

Edmundo de Ibis

Lamoyi

Velázquez

5. Datos del sinodal 3

Dra.

Mónica

Viveros

Rogel

6. Datos del sinodal 4.

M en C

Edith Araceli

Cabrera

Muñoz

**7.** Datos del trabajo escrito.

“Prevalencia de mutaciones asociadas a resistencia antirretroviral, en personas con diagnóstico reciente de infección por Virus de Inmunodeficiencia Humana Tipo 1 (VIH-1) y nunca tratadas”

50p

2012

## **RESUMEN.**

Antecedentes: Los primeros casos del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida), aparecieron hace más de veinte años; hasta diciembre del 2009 existían en todo el mundo 33.3 millones de personas infectadas. Aproximadamente el 90% de las personas infectadas viven en países en vías de desarrollo.

En mayo de 1983 se logró aislar al virus de un paciente con sida, y un año después se realizaron los primeros ensayos de detección para el VIH. Desde hace más de 20 años se identificó al VIH-1 como el agente causal del síndrome de inmunodeficiencia adquirida.

La carga viral detectable en presencia de TARAA que se define como falla virológica está comúnmente asociada con la emergencia de mutaciones relacionadas con la resistencia a las drogas empleadas para el tratamiento del VIH-1. En vista de que las cepas resistentes son circulantes y pueden alcanzar mucosas, se ha detectado la transmisión de las mismas a un individuo recién infectado (Resistencia transmitida).

Objetivo: Este trabajo tiene como objetivo principal determinar la prevalencia de la resistencia transmitida o resistencia primaria, en individuos con infección reciente por el VIH-1 en México.

Metodología: Durante el periodo de enero del 2004 a Mayo del 2005 se colectaron 543 muestras de plasma de pacientes VIH-1 positivos. Todas las muestras fueron genotipificadas por amplificación del gen de la polimerasa y la reverso transcriptasa, el análisis de las secuencias se realizó con el algoritmo de interpretación de resistencia HIV Drug resistance database de la Universidad de Stanford Calibrated Population Resistance tool (CPR) versión 2008.

Resultados: De las 426 secuencias amplificadas y de acuerdo con el algoritmo de Stanford Surveillance Drug Resistance Mutations SDRM se encontró que 10.3 % (44/426) de las secuencias presentaron evidencia de resistencia transmitida.

Conclusiones: Los datos obtenidos de resistencia transmitida en este estudio sugieren la realización de las pruebas de resistencia antes del inicio del tratamiento, tal y como se realizan en los países desarrollados.

## **AGRADECIMIENTOS.**

Agradezco a todo el personal que ayudó en la toma de muestra, aplicación de cuestionarios, así como todas las facilidades proporcionadas para llevar a cabo este trabajo.

Este trabajo fue financiado y soportado por la Organización Mundial de la Salud.

### **OMS.**

Silvia Bertagnolio.

Don Sutherland.

### **CAPPSIDA.**

Martín Luna Samano

Martha Valdez

Angélica Rodríguez

Yuriria García

### **CENSIDA.**

Eddy León

Olga Salas

Rosa María Tamayo

Alejandra Meléndez

### **Fundación Mexicana de lucha contra el SIDA.**

Margarita Andrade

Susana Sánchez

### **Servicio de Salud del Estado Morelos.**

Adolfo Martínez

Susana Balderas

María L. Estrada Carrillo

### **CIBCO-COESIDA del estado de Jalisco.**

Patricia Campos

Ana Lilia Reyes

### **CISIDA-Prevención Y Control de ITS Del Estado de Michoacán.**

Juana Chacón

Araceli Mendoza

Gaudencio Anaya

**COESIDA-Oaxaca.**

Gabriela Velázquez  
César Carrasco  
Edna Ramos  
Sergio Saucedo  
Mónica Cervantes

**CISIDA Puebla.**

Norma Márquez  
Magdiel Cruz  
Alicia Vieyra  
Laura Cerda  
Zuraya Bassil  
Guadalupe Jiménez  
Susana Carranza

**Instituto de Salud del Estado de  
México VIH/SIDA.**

Beatriz Ramírez  
Luz Pérez  
Pedro Villegas

**Hospital Regional “Dr. Luis F.  
Nachón” Xalapa Veracruz.**

Gastón Coronel  
Luis Zubizarreta  
Gabriela Escalante  
Gemma Campos

**Salud de Tlaxcala Centro de  
Información y Diagnóstico.**

Francisco Anaya  
María Félix Gutiérrez  
Eva Ledesma

**INCMNSZ**

Luis Fuentes  
Mónica Viveros  
Luis Zurita  
Verónica Villagrán  
Christian Togno  
Mario Hernández  
Saida Briones

“Prevalencia de mutaciones asociadas a resistencia antirretroviral, en personas con diagnóstico reciente de infección por Virus de Inmunodeficiencia Humana Tipo 1 (VIH-1) y nunca tratadas”



## INTRODUCCIÓN.

Los primeros casos del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida), aparecieron hace más de veinte años; el primer reporte se escribió bajo el título de “*Pneumocystis pneumonia*”<sup>1</sup> Este primer reporte describía a cinco hombres jóvenes que tenían sexo con hombres, quienes presentaban una rara afección: neumonía por *Pneumocystis carinni* y otras infecciones oportunistas inusuales. Los datos de laboratorio de estos pacientes indicaban una disminución selectiva en algunas subpoblaciones de linfocitos<sup>2</sup>.

Aunque en un principio la infección fue descrita principalmente en hombres que tienen sexo con hombres (HSH), usuarios de drogas intravenosas (UDI) y personas que recibieron transfusiones sanguíneas incluyendo a aquellos con hemofilia<sup>3</sup>, una vez que se conocieron los datos en países de bajos recursos, fue evidente que era una infección que afectaba a todos los grupos poblacionales. De acuerdo con los datos proporcionados por ONUSIDA y por la Organización Mundial de la Salud (OMS), hasta diciembre del 2009 existían en todo el mundo 33.3 millones de personas infectadas, con un total de 7,000 nuevas infecciones diarias. Aproximadamente el 90% de las personas infectadas viven en países en vías de desarrollo. Actualmente el sida es la tercera causa de muerte en estos países<sup>4</sup>.

En mayo de 1983 se logró aislar al virus de un paciente con sida<sup>5</sup>, y un año después se realizaron los primeros ensayos de detección para el VIH<sup>6</sup>. Desde hace más de 20 años se identificó al VIH-1 como el agente causal del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida)<sup>7,8</sup>.

El VIH pertenece a la familia de los Lentivirus, es un virus de RNA de doble cadena positiva, de aproximadamente 9700 pares de bases (pb), que está constituido por nueve genes, tres de ellos estructurales y de seis genes accesorios. Ver tabla1.

Tabla 1. Genes del VIH-1 y propiedades de las proteínas que codifican<sup>9</sup>.

<b>Gen</b>	<b>Proteína</b>	<b>Función</b>
<b>env</b>	gp160	Poliproteína precursora
	SU/gp120	Proteína de la envoltura viral Interacción con el receptor CD4
	TM/gp41	Fusión de membranas
<b>gag</b>	p55	Poliproteína precursora
	CA/p24	Proteína del cápside
	MA/p17	Proteína de la matriz
	NC/p7	Proteína de la nucleocápside
	p6	Ribonucleoproteína, esencial para la encapsidación viral
<b>pol</b>	Reverso transcriptasa	Retrotranscripción Actividad RNasa H
	Integrasa	Integración
	Proteasa	Procesamiento postraduccional de las poliproteínas gag y gag-pol
<b>tat</b>	Tat	Elongador del RNAm Transactivador Inducción de apoptosis
<b>rev</b>	Rev	Regulador del transporte y procesamiento del RNAm
<b>nef</b>	Nef	Aumento en la infectividad viral Incremento de la retrotranscripción Regulación negativa de CD4 y HLA de clase I Inducción de apoptosis en CTL
<b>vif</b>	Vif	Aumenta la infectividad viral Interacción y neutralización de factores celulares antivirales: APOBEC
<b>vpr</b>	Vpr	Transactivador viral Transporte del complejo de preintegración al núcleo Arresto del ciclo celular G2. Inducción de Apoptosis
<b>vpu</b>	Vpu	Secuestro de CD4 en el retículo endoplásmico Aumenta la generación de viriones

La partícula viral tiene un diámetro de 100 nm y está cubierta por una membrana lipoproteica. Cada partícula contiene 72 complejos glicoproteicos, los cuales se encuentran incluidos en esta membrana lipídica, cada uno de ellos está compuesto por una glicoproteína externa gp120 y una proteína transmembranal gp41. La proteína p17 se ancla en la parte interna de la membrana viral. El centro vírico está compuesto por 2000 copias de la proteína viral p24. El centro vírico envuelve dos copias de RNA y es parte del complejo proteína-ácido nucleico; así como la nucleoproteína p7 y la reverso transcriptasa p66. La partícula viral contiene toda la maquinaria enzimática necesaria para la replicación: reverso transcriptasa (RT), Integrasa p32 y la proteasa p11<sup>7</sup>.

### **Progresión a sida.**

La historia natural de la infección por el VIH-1 varía considerablemente de un individuo a otro. El curso típico de la infección por el VIH-1 se caracteriza por la infección primaria que puede ser asintomática o presentarse como un síndrome retroviral agudo pobremente sintomático o muy florido, un período prolongado de latencia seguido por un estado clínico de enfermedad comúnmente caracterizado por la manifestación de enfermedades oportunistas y neoplasias<sup>8</sup>. El establecimiento de la infección crónica se caracteriza por una fuerte respuesta inmune humoral, una respuesta celular progresivamente deficiente, así como por un estado de estimulación inmune persistente que se genera desde el momento de la infección primaria. Aunque la respuesta inmune temprana puede reducir la carga viral (nivel de RNA del VIH-1 en el plasma) considerablemente, falla en la eliminación de las partículas virales del cuerpo<sup>10</sup>.

La progresión de la infección por el VIH-1 generalmente se caracteriza por un descenso gradual de los linfocitos CD4+ (de 50 a 80 células por año) con una viremia estable que al final de la historia natural presenta un incremento progresivo. El nivel de la carga viral (CV) es el mejor predictor de la progresión y muerte por sida en forma aislada y en combinación con el conteo de células CD4+: ambos se convierten en buenos marcadores de la progresión de la

enfermedad<sup>11</sup>. El tiempo promedio de, la infección por el VIH-1 al desarrollo de sida es aproximadamente de 7 a 10 años (75% de los casos). Se han reportado casos de desarrollo de sida en un tiempo breve de 3 a 6 meses<sup>12</sup> y un porcentaje aproximadamente del 20% de los infectados desarrolla sida en menos de 5 años. Sólo un porcentaje menor al 5% de los individuos infectados por el VIH-1, permanecen libres de enfermedades definitorias de sida, así como con cuentas de CD4+ mayores de 500 células/mm, por períodos mayores a 10 años, sin la necesidad de la terapia antirretroviral<sup>3,13</sup>.

### **Terapia antirretroviral.**

Se han desarrollado diferentes medicamentos en la lucha contra el sida, la Zidovudina (AZT) hace su aparición en 1987 y hasta 1995, la monoterapia o el tratamiento doble (combinaciones de AZT con otro antirretroviral biterapia) fueron los primeros fármacos disponibles. El primer inhibidor de la proteasa fue aprobado en 1995 para su uso en personas con infección por el VIH-1 y, un año después se aprobó el primer inhibidor no nucleósido de la transcriptasa reversa<sup>14</sup>. Con el uso de combinaciones de tres medicamentos se generó una nueva del tratamiento antirretroviral ya que estas combinaciones demostraron su alta eficacia en la reducción de la carga viral y en el incremento del número de CD4, así como en la disminución de las infecciones oportunistas, morbi-mortalidad y en los ingresos hospitalarios<sup>15,16, 17</sup>.

La estandarización de la terapia antirretroviral altamente activa TAAA, o lo que se conoce como HAART (por sus siglas en inglés) ha sido ampliamente aplicada a los pacientes que presentan infección por el VIH-1, a partir de su introducción en la década de los noventas (1995 – 1996)<sup>18</sup>. En 1996 y como consecuencia del uso de esta nueva estrategia de tratamiento se hacen los primeros reportes desde que inicio la epidemia, donde se nota un decremento en el número de casos de sida así como en la mortalidad asociada<sup>19</sup>.

La historia natural de la enfermedad nos ha permitido conocer que la multiplicación viral es un proceso altamente dinámico, en el cual un gran número de viriones son creados y eliminados por el sistema inmune cada día<sup>20</sup>. Se

estima que la capacidad de replicación viral es de  $10^{10}$  -  $10^{12}$  partículas virales por día y la alta tasa de error generada por la reverso transcriptasa es aproximadamente de  $4 \times 10^{-5}$  mutaciones por ciclo de replicación, esto significa que cada nuevo genoma contiene 0.2 mutaciones por cada ciclo de replicación. La gran mayoría de los errores se generan durante la transcripción del DNA por la RNA polimerasa II, ya que esta no tiene actividad de exonucleasa para corregir los errores de copiado<sup>21, 22, 23</sup>. Las mutaciones en el genoma del VIH producen cambios en la estructura de las proteínas, generando una gran variedad de cepas dentro de un mismo individuo, las cuales se conocen como cuasiespecies. Las mutaciones son el resultado de un proceso estocástico, en el cual una mutación individual tiene mayor probabilidad de ocurrencia, que la aparición de dos o más mutaciones<sup>24</sup>. Esta nueva partícula "Cuasiespecie" puede tener una mayor capacidad replicativa comparada con sus antecesores y predominar dentro de las poblaciones existentes en un individuo<sup>25</sup>. Tales mecanismos son importantes como vías de escape para evadir la presión ejercida por el sistema inmune del huésped así como a los antirretrovirales. Por otro lado, existen otros mecanismos de variación viral como los procesos de recombinación, que son comunes en todos los retrovirus y son consecuencia del intercambio de información entre las cadenas de RNAs durante la retrotranscripción, **Figura 1**. La capacidad de recombinación es común en todos los retrovirus y es debida a el cambio de templete de las cadenas de RNA durante la reverso transcripción. La recombinación ocurre cuando la infección se lleva a cabo por virus heterócigos (dos diferentes cepas virales) y los virus heterócigos son producidos por células que están coinfectadas por dos distintos provirus<sup>26, 27</sup>.

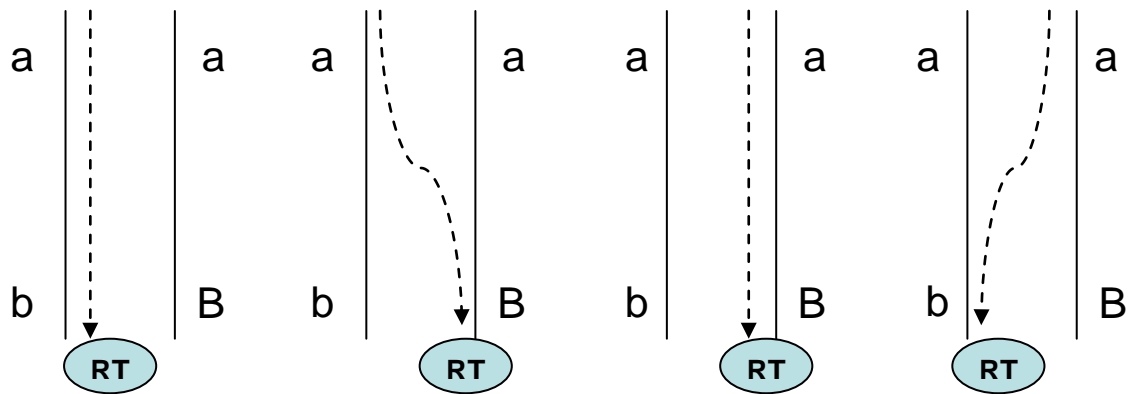


Figura. 1. Modelo de recombinación retroviral<sup>27</sup>.

La recombinación está directamente relacionada con las reinfecciones o las superinfecciones; este fenómeno implica la infección con una segunda cepa viral a pesar de que exista una previa infección. La evidencia de estos casos se ha demostrado en infecciones duales con diferentes genotipos<sup>29</sup>.

### Resistencia a los antirretrovirales

La resistencia a los antirretrovirales es consecuencia de esta variación viral en presencia de la presión selectiva del medicamento. Existen asimismo diferentes mecanismos de resistencia para cada uno de los grupos de los antirretrovirales: inhibidores de la transcriptasa reversa análogos nucleósidos (ITRAN), inhibidores de la transcriptasa reversa no nucleósidos (ITRNN) e inhibidores de la proteasa (IPs).

El gen de la reverso transcriptasa codifica para un heterodímero de 66 kDa, que está compuesto por dos subunidades 66 y 51 (p66 y p51). La subunidad p51 es generada durante el ensamblaje viral y en la maduración vía la disociación del extremo carboxilo terminal (C-terminal) de la subunidad p66. La subunidad p66 se ha descrito con una figura similar a una mano derecha; con los subdominios mayores de la polimerasa en los dedos (residuos 1-85, 118-155), la palma (86-117) y dedo gordo (238-318). Adicionalmente p66 tiene dos subdominios

mayores de conexión (residuos 319-426) y en el extremo C-terminal una RNasa H (427-565) **Figuras 2 y 3.**

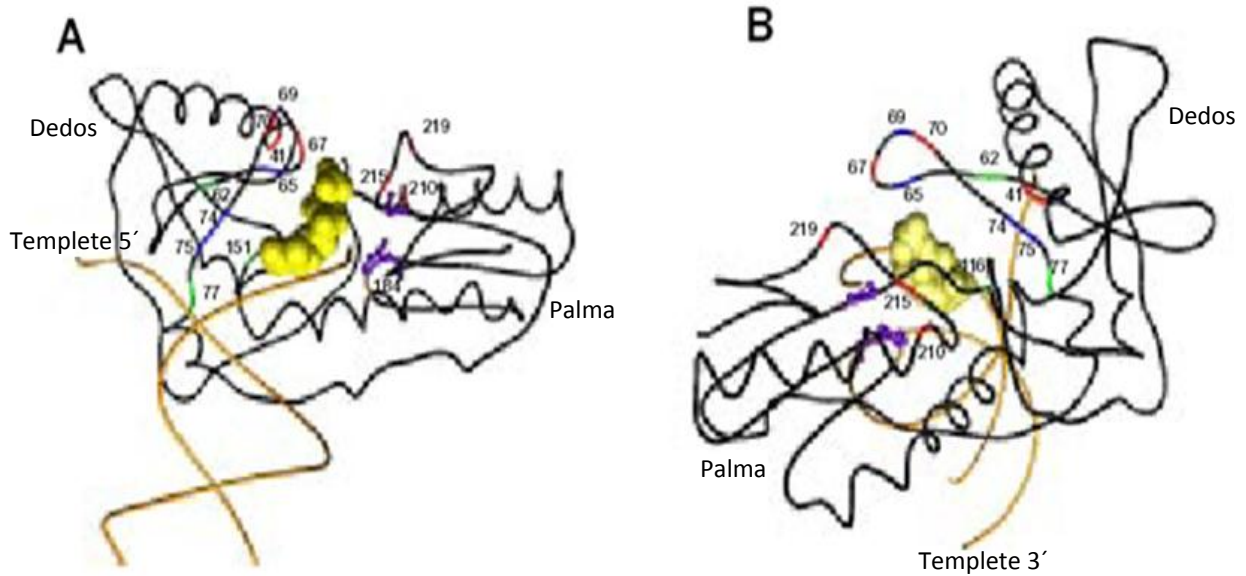


Figura. 2. Modelo estructural de la Reverso Transcriptasa, marcada con los sitios de resistencia a los INTRAN. Se aprecia la columna del polipéptido de los dedos y el dominio de la palma (posiciones 1 -235) y el DNA primer y las cadenas templete. El sitio activo (posiciones 110,185, 186) se muestra en rama con cadenas. El nucleótido entrante está en la parte central. Este esquema está basado en la estructura publicada por Huang et al.<sup>30</sup>

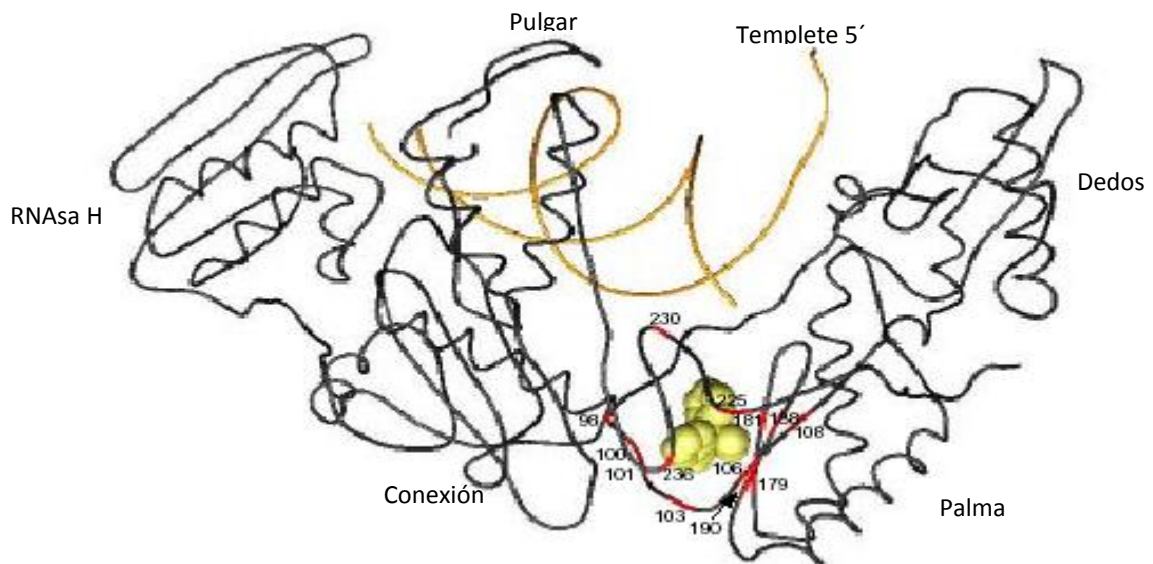


Figura. 3. Modelo estructural de la reverso transcriptasa del VIH-1, indicando los sitios asociados con la resistencia a los ITRNN. La columna de la subunidad completa p66 (posiciones 1 -560), DNA primer y cadenas templete. Este esquema está basado en el modelo de Kohlstaedt y

Steitz, en el cual la RT esta cristalizada con Nevirapina. Las posiciones relacionadas con la resistencia a los ITRNN rodean al dominio hidrofóbico al cual se une la NVP o cualquier otro no nucleosido<sup>31</sup>.

Las mutaciones asociadas con la perdida de respuesta a tratamiento antirretroviral o falla a los ITRAN ocurren principalmente en los dedos y en la palma; sin embargo existen mutaciones en ambas subunidades de la RT (p66 y p51)<sup>32</sup>.

### **Resistencia a los ITRAN e ITRNN**

El grupo de los ITRAN está integrado por la Zidovudina (AZT), Estavudina (d4T), Didanosina (ddl), Zalcitabina (ddC), Lamivudina (3TC), Abacavir (ABC), Emtricitavina (FTC) y el Tenofovir (TFV); que son análogos nucleótidos que impiden la elongación del DNA naciente.

La familia de los ITRAN incluye a las prodrogas que sólo son efectivas después de que se convierten en trifosfatos. Los análogos nucleótidos requieren solamente de dos pasos de fosforilación en vez de tres. La fosforilación de los ITRAN compite con los dNTPs presentes en la naturaleza. La incorporación de un ITRAN dentro del DNA proviral bloquea a la elongación del DNA, deteniendo la elongación de la cadena.

Existen tres principales mecanismos bioquímicos para generar resistencia a los ITRAN:

- Inhibición estérica: Es causada por las mutaciones que permiten a la reverso transcriptasa reconocer a las diferencias estructurales entre los ITRAN y los dNTPs. Las siguientes mutaciones poseen estas características: M184V, Q151M, L74V y K65R<sup>33</sup>.
- Remoción vía fosforolisis de un ITRAN incorporado al extremo 3' terminal de cadena naciente del DNA viral<sup>34</sup>. Este efecto es principalmente causado por las TAMs o mutaciones asociadas con los análogos timidínicos.



La familia de los ITRNN compuesta por Nevirapina (NVP), Delaviridina (DVD) y el Efavirenz (EFV) inhiben a la enzima de la reverso transcriptasa viral. Los ITRNN son pequeñas moléculas que se unen a la bolsa hidrofóbica cerca del sitio activo de la RT. Las mutaciones generadas en el sitio de unión reducen la afinidad de los ITRNN a la RT.

### **Resistencia a los IPs**

La proteasa es la responsable del procesamiento postranscripcional de las poliproteínas virales Gag y Gag-Pol, para generar a las proteínas estructurales y a las enzimas del virus. La enzima es una proteasa aspártica, compuesta de dos monómeros no covalentes e idénticos en longitud (99 aminoácidos). El sitio activo es similar al de otras proteasas aspárticas y se caracteriza por conservar a la triada Asp-Thr-Gly en las posiciones 25 -27. La hendidura hidrofóbica del sustrato reconoce y divide a nueve diferentes secuencias para producir la matriz, la cápside, la nucleocápside, y a las proteínas p6 de la poliproteína Gag y de la proteasa, la RT a las integrasas de la poliproteína Gag-Pol. **Figura 4.**

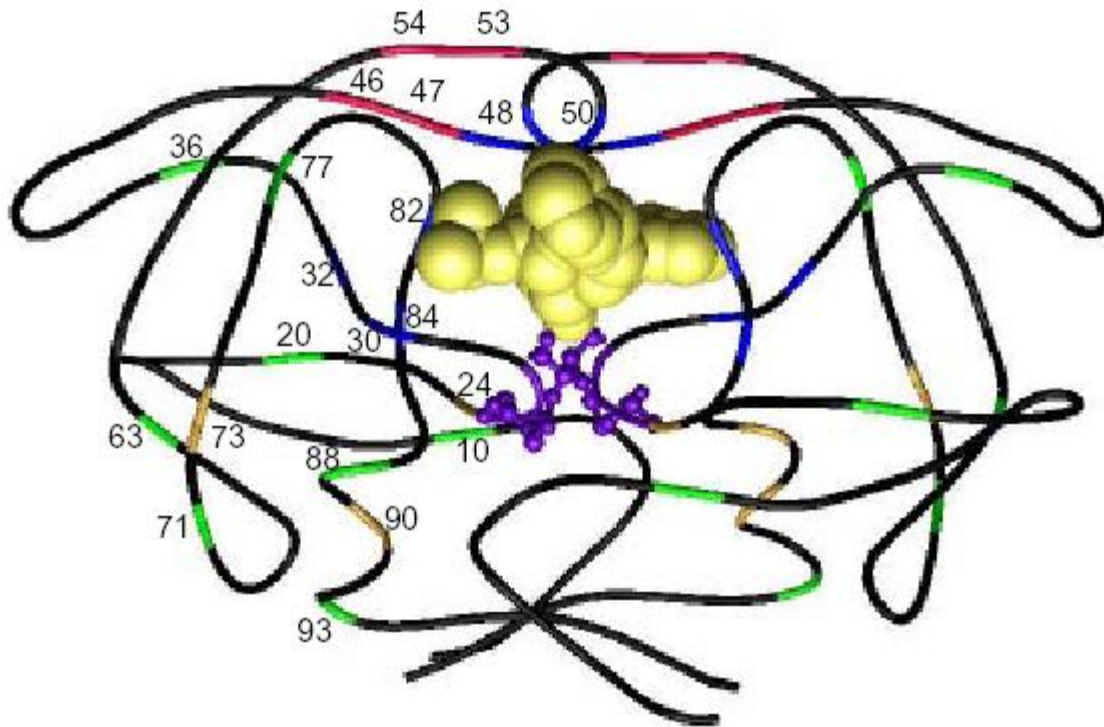


Figura 4. Modelo estructural del homodímero de la proteasa, donde se indican los sitios de las mutaciones asociados con la resistencia a los Inhibidores de la proteasa. Se aprecia la unión de ambas subunidades (posiciones 1-99) mediante una columna. El sitio activo (posiciones 25 – 27) se muestra con rama y esferas. La proteasa fue cristalizada con un inhibidor de proteasa, el cual se aprecia en el espacio central<sup>35</sup>.

El grupo de los inhibidores de proteasa (IPs) incluye los siguientes medicamentos: Nelfinavir (NFV), Saquinavir (SQV), Indinavir (IDV), Ritonavir (RTV), Atazanavir (ATV), Amprenavir (AMP), FosAmprenavir (fAMP), Lopinavir (LPV), Tipranavir (TPV) y Darunavir (TMC114). El mecanismo primario generado para la resistencia a los IPs implica la acumulación de las mutaciones que alteran o bloquean al sitio de unión de la proteasa (PR). Las mutaciones en el gen de la proteasa pueden conferir así mismo hipersusceptibilidad a otros IPs. Se ha descrito por otra parte, que las mutaciones en el gen *gag* también pueden afectar a la susceptibilidad a los IPs probablemente como consecuencia de los cambios conformacionales contiguos<sup>36</sup>.

## **Resistencia Primaria**

La carga viral detectable en presencia de TARAA que se define como falla virológica está comúnmente asociada con la emergencia de mutaciones relacionadas con la resistencia a las drogas empleadas para el tratamiento del VIH-1, comprometiendo la terapia actual, así como las terapias futuras. La resistencia del VIH-1 a los antirretrovirales involucra la acumulación de mutaciones primarias y secundarias que arriesgan la actividad de los medicamentos. En vista de que las cepas resistentes son circulantes y pueden alcanzar mucosas, se ha detectado la transmisión de las mismas a un individuo recién infectado, hecho que complica su respuesta futura a los tratamientos. Este fenómeno denominado resistencia transmitida, es otra de las características que hacen difícil el combatir la pandemia del VIH/sida.

La resistencia primaria es la resistencia del VIH antes de recibir tratamiento. Aunque esta resistencia podría deberse a las mutaciones que se generan espontáneamente y se asocian con un efecto muy limitado en la susceptibilidad a un determinado medicamento, en general, la resistencia primaria se relaciona a la transmisión de las cepas resistentes por cualquier vía, ya sea sexual o por contaminación de productos sanguíneos, por lo cual se le llama también resistencia transmitida.

La resistencia transmitida tiene varias particularidades. La más importante es sin lugar a dudas que no es igual de frecuente para las diferentes clases de medicamentos ni para las mutaciones específicas, hechos que nos hablan de varios fenómenos entre los que destacan la frecuencia del uso de un medicamento en una comunidad así como la probable selección en formas específicas de transmisión, de algunas cepas resistentes, hecho que probablemente tenga que ver con el "fitness" (capacidad de un virus para infectar, replicar y reproducir una progenie infecciosa en un entorno) de las cepas posiblemente transmitidas. Se ha estimado que la transmisión de virus resistentes se produce alrededor del 80% con menos frecuencia de lo esperado cuando se compara con la población de virus transmisores potenciales. Sin

embargo se ha demostrado que las poblaciones de virus con una baja capacidad de replicación son capaces de establecer infección<sup>33</sup>.

En años recientes diferentes investigadores han comenzado a monitorear la prevalencia (Proporción de individuos que poseen un trastorno o afección dado, en un punto específico del tiempo) de mutaciones asociadas con el tratamiento antirretroviral en individuos recién diagnosticados con la infección por VIH-1. Diferentes estudios han reportado prevalencias de la resistencia primaria asociada con el tratamiento antirretroviral en los individuos con reciente seroconversión; estos porcentajes oscilan entre un 0 a 17% en algunas ciudades de países industrializados tales como Grecia, Francia, Estados Unidos, Italia, Canadá, Alemania, España, Reino Unido y Luxemburgo<sup>37,38,39</sup>. Por otro lado otros estudios han reportado altos índices de prevalencia: 5.0 – 27.4% (Suiza, Italia, Alemania, España, Reino Unido y Estados Unidos)<sup>40,41</sup>.

Como consecuencia de la selección ya mencionada, varios de los estudios especialmente en los E.U., han demostrado un incremento creciente de la transmisión de las cepas resistentes a los ITRNN, en especial con la mutación K103N, asociándose no sólo con la gran frecuencia de uso de Efavirenz sino también a la alta capacidad de replicación de los virus que tienen dicha mutación.

Considerando la vía sexual como la forma más común de la transmisión del VIH, la resistencia transmitida responde a un evento en que una persona con cepas resistentes las transmite en una relación sin protección. Se ha probado, sin embargo, que la resistencia transmitida generalmente se asocia con los grupos de los individuos recién infectados que transmiten una misma cepa resistente a varios individuos. Considerando esto, la disminución reportada recientemente en la transmisión de las cepas resistentes en los países desarrollados, sea mas probablemente debida a una mayor cobertura del tratamiento antirretroviral más que a una conducta sexual más responsable. Este fenómeno, ante un acceso menor y una monitorización menos adecuada de los tratamientos antirretrovirales en los países en desarrollo así como una detección más tardía

de aquellos infectados, no ha mostrado una disminución como la referida para los países desarrollados.

## **JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.**

Este trabajo tiene como objetivo principal determinar la prevalencia de la resistencia transmitida o resistencia primaria, en individuos con infección reciente por el VIH-1 en México; y como objetivo secundario el poder comparar estos resultados interpretados de acuerdo con los diferentes algoritmos, los usados para la resistencia secundaria y los específicos para la resistencia transmitida.

Los programas de vigilancia epidemiológica de la resistencia transmitida a los antirretrovirales proporcionan información que ayuda a fortalecer a los sistemas de salud, en el desarrollo de programas de educación y prevención para minimizar el impacto de la transmisión de los virus resistentes; así como brindar apoyo en la racionalización del uso de los antirretrovirales en los programas de tratamiento clínico y políticas de salud pública (programas de prevención efectivos, protección en contra de la discriminación, reducción del estigma, empoderamiento en las mujeres y proveer acceso a pruebas de diagnóstico y tratamiento)<sup>41,42,43,44</sup>. Esta información es empleada para el desarrollo de recomendaciones para el inicio de la terapia antirretroviral en aquellos individuos que así lo ameriten; por otro lado puede ser empleada como un indicador que ayude a evaluar la efectividad de los programas de prevención.

De acuerdo con las guías internacionales del tratamiento, es de suma importancia conocer la prevalencia de la resistencia transmitida, ya que tiene un efecto sobre el costo-beneficio de la introducción rutinaria de las pruebas de resistencia en aquellas poblaciones que tienen una prevalencia mayor al 5% de la resistencia transmitida<sup>45</sup>. Desafortunadamente en México se carece de información de la prevalencia de la resistencia transmitida en la población de los pacientes con diagnóstico reciente de infección por el VIH-1 o se encuentra limitada a una solo estado y/o centro<sup>46, 47</sup> y más aún estos resultados no son

equiparables con otras poblaciones de estudio. Debido a esto, es de suma importancia la información obtenida en este estudio, ya que es el primer reporte de la resistencia transmitida en nuestro país basado en un estándar para vigilancia epidemiológica (SDRM, por sus siglas en inglés Surveillance Drug Resistance Mutations), lo cual permitirá tener resultados que puedan ser comparables con otras poblaciones a nivel internacional.

### **Metodología.**

Para poder determinar la prevalencia de la resistencia transmitida en los pacientes con infección reciente por el VIH-1, se consideraron los datos reportados por CONASIDA hasta diciembre del 2003<sup>48</sup> en 9 estados del centro del país. El número de nuevos casos reportados de pacientes VIH-1 positivos por entidad federativa fue de 4,417 personas en ese año para todo el país. Para este estudio sólo se consideraron muestras de los siguientes estados: Distrito Federal con 1,078 nuevos casos, Jalisco con 176, Estado de México 187, Michoacán 83, Morelos 61, Oaxaca 163, Puebla 243, Tlaxcala 19 y Veracruz 485, generando un total de 2,495 nuevos casos para las entidades federativas participantes.

El cálculo de la muestra se realizó con base en el número de nuevos casos reportados sólo para los sitios participantes (2,495), esto con el fin de determinar una prevalencia mínima de resistencia transmitida o primaria del 5%, con un nivel de confianza y/o seguridad del 95% y una precisión del 2%, considerando los reportes de los individuos infectados durante el 2003.

El cálculo del tamaño de la muestra (n) se determinó con la siguiente ecuación<sup>49</sup>:

$$n = \frac{N * Z_{\alpha}^2 * p * q}{d^2 * (N-1) + Z_{\alpha}^2 * p * q}$$

Donde:

- **N** = total de la población
- $Z_{\alpha}^2 = 1.96^2$  (si la seguridad es del 95%)
- **p** = 1 – p (en este caso 1 – 0.05= 0.95)
- **d** = precisión (en este caso deseamos un 2%)

Cálculo:

$$n = \frac{2495 * 1.96^2 * 0.05 * 0.95}{0.02^2(2495-1) + 1.96^2 * 0.05 * 0.95} = 385.80$$

Durante el periodo de enero del 2004 a Mayo del 2005 se colectaron 543 muestras de plasma de pacientes VIH-1 positivos. Los pacientes que desearon participar en este proyecto, debían cumplir con los siguientes criterios de inclusión:

- Ser mayor de 14 años al momento de la toma de la muestra. Se consideró establecer este rango de edad, dado que existen estudios y/o encuestas en los que se ha logrado determinar la edad de inicio de la actividad sexual, estableciéndola en un promedio a los 15.7 años para ambos géneros <sup>50</sup>, todo esto con el fin de poder detectar aquellas infecciones por el VIH que ocurren en los adolescentes.
- Ser residente de México por más de cinco años, con objeto de procurar que los resultados obtenidos fueran de infecciones adquiridas en el territorio nacional y no la adquisición de infecciones en otros países.
- No haber tomado tratamiento antirretroviral. Es fundamental no haber ingerido tratamiento antirretroviral, ya que el consumo, la interrupción de la terapia antirretroviral y/o el mal apego o adherencia, son factores que por sí mismos generan resistencia.
- **No tener evidencia de infección para VIH (prueba serológica o molecular positiva para el VIH-1) en los 6 meses previos a la toma de muestra.**

- No haber sido hospitalizado. Con objeto de descartar individuos que tuvieran una historia prolongada de infección por VIH y menos posibilidad de encontrar resistencia transmitida.

Criterios de exclusión:

- Ser menor de 14 años.
- No residir en México.
- Haber tomado tratamiento antirretroviral.
- Contar con una prueba de VIH-1 positiva en los seis meses previos a la toma del estudio. **Este punto es de suma importancia ya que el haber tenido un examen positivo de Western Blot con una antigüedad mayor a 6 meses, puede generar una subvaloración de la resistencia transmitida o primaria, ya que existen estudios que confirman la desaparición de cepas resistentes en plazos menores a un año<sup>51, 52,53</sup>. Todo esto con el propósito de incluir a la mayor cantidad de pacientes con diagnóstico reciente de infección por el VIH-1 y/o con seroconversión reciente.**
- Haber sido hospitalizado

Además fueron colectados los siguientes datos demográficos:

- Género.
- Fecha de nacimiento
- Manifestaciones actuales o previas de sida.
- Factores de riesgo.
  1. Uso de drogas intravenosas.
  2. Transfusión sanguínea.
  3. Hombres que han tenido o tienen sexo con hombres.
  4. Relaciones heterosexuales.
  5. No sabe
  6. Otros



Todos los pacientes que participaron en este estudio firmaron el consentimiento informado.

Las muestras fueron colectadas en 11 sitios de referencia del centro del país; la distribución de los sitios se puede observar en la figura 5:

A1 CAPPSIDA.

A2 CENSIDA.

A3 FUNDACION MEXICANA PARA LA LUCHA CONTRA EL SIDA.

B1 CUERNAVACA.

B2 GUADALAJARA.

B3 MORELIA.

B4 OAXACA.

B5 PUEBLA.

B6 TOLUCA.

B7 TLAXCALA.

B8 XALAPA.

Todas las muestras fueron almacenadas a  $-70^{\circ}$  C hasta la fecha de procesamiento.

Genotipo.

Todas las muestras genotipificadas fueron procesadas con el estuche comercial ViroSeq™ HIV-1 Genotyping System v 2.0 Celera Diagnostics. La técnica se basa en la amplificación por RT-PCR del gen de la proteasa (*pol*) y las dos terceras partes del gen de la Reverso Transcriptasa *rt* del Virus de Inmunodeficiencia Humana tipo 1, el cual genera un producto de aproximadamente 1.8 Kb; subsecuentemente este producto es empleado para la secuenciación de 1.2 Kb de secuencia de datos. Una vez obtenida la secuencia mediante el secuenciador Applied Biosystems Avant 3100, los fragmentos generados y con un juego de siete primers de marcaje, son interpretados con el software HIV Genotyping software v2.5 Celera diagnostics, para el alineamiento

de la secuencia en comparación con la secuencia de la cepa de VIH-1 HXB2<sup>54</sup>  
Figura 6.



Figura 5. Distribución en México de los centros de recolección de muestras de los pacientes infectados con el VIH-1, con diagnóstico reciente.

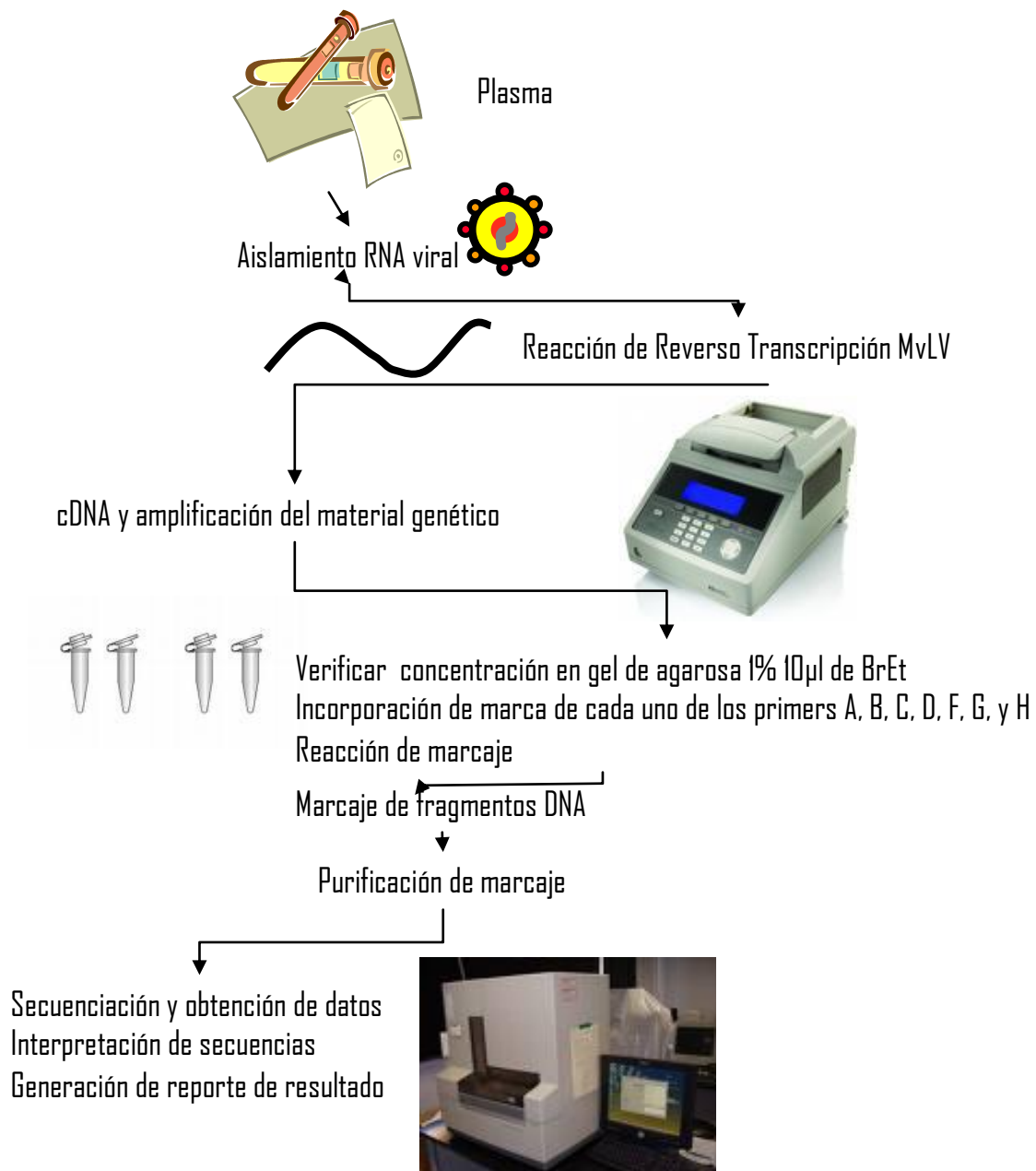


Figura 6. Diagrama de flujo de trabajo para la determinación de genotipos para el VIH-1.

Una vez obtenidas las secuencias, se procedió a obtener el formato **fasta** de cada una de ellas, para posteriormente ingresarlas al software de interpretación de resistencia HIV Drug resistance database de la Universidad de Stanford Calibrated Population Resistance tool (CPR) versión 2008, en la página electrónica<sup>54</sup> dicho software interpreta los algoritmos asociados con la

resistencia transmitida con un protocolo estandarizado y adicionalmente proporciona el subtipo viral de la secuencia sometida.

El algoritmo CPR es un software de vigilancia epidemiológica que permite la identificación de las mutaciones asociadas con la resistencia transmitida para el tratamiento de la infección por el VIH-1, que por sus siglas en inglés se conoce como SDRM (Surveillance Drug Resistance Mutations), el cual considera una lista de 80 mutaciones en 39 posiciones de la proteasa y la reverso transcriptasa<sup>44</sup>. Las mutaciones que fueron incluidas en esta lista deben cumplir tres criterios<sup>55,56</sup>.

- I. Son causa o contribuyen a la resistencia a drogas para el tratamiento de la infección por el VIH-1.
- II. No son polimórficas en personas sin tratamiento.
- III. Son válidas para todos los subtipos.

Los pasos para la selección y creación de la lista de las mutaciones para vigilancia epidemiológica asociadas con la resistencia transmitida para el algoritmo CPR se aprecian en la figura 7.

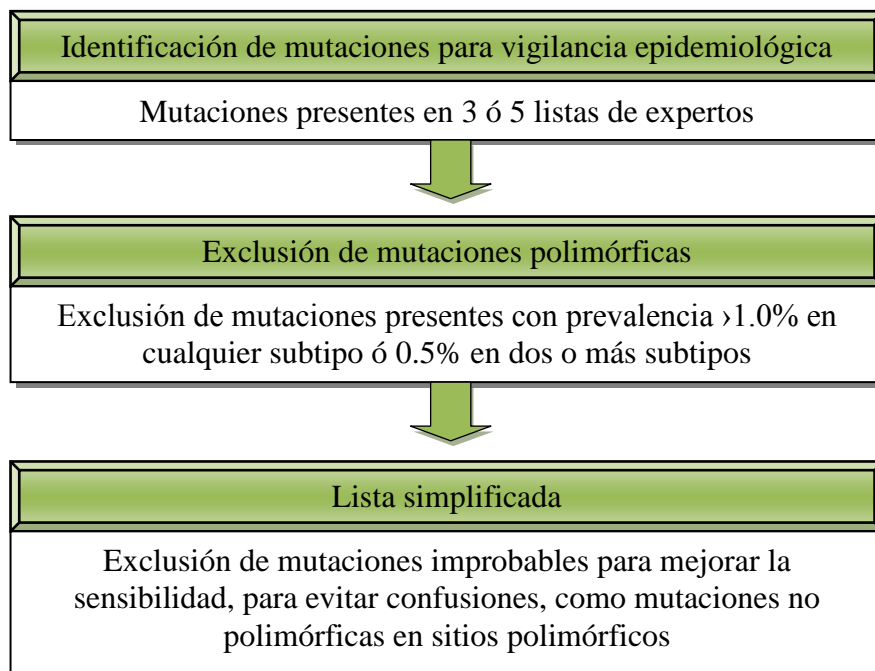


Figura 7. Lista de pasos para la selección de las mutaciones para vigilancia epidemiológica asociadas con la resistencia transmitida<sup>44</sup>.

La lista de las mutaciones para la vigilancia epidemiológica asociadas con la resistencia transmitida puede apreciarse en la tabla 1. Recientemente R.W. Shafer y colaboradores han actualizado la lista de las mutaciones SDRM 2008, por la lista SDRM 2009. Robert Shafer ha propuesto una lista de mutaciones para el monitoreo epidemiológico. En ésta última clasificación se han eliminado algunas de las mutaciones que pueden presentarse como polimorfismos y que son muy frecuentes, en ciertos subtipos, principalmente en los subtipos B del VIH<sup>44</sup>.

Grupo de anti-retrovirales	Tabla 1a. Mutaciones asociadas a resistencia transmitida										
<b>ITRAN</b>	M41L	K65R	D67N/G/E	T69D/Ins	K70R/E	L74V/I	V75S/A/T/M	F77L			
<b>ITRNN</b>	L100I		K101E/P		K103S/N	V106A/M	V179F	Y181C/I/V			
<b>IPs</b>	L23I	L24I	D30N	V32I	M46I/L	I47A/V	G48V/M	I50L/V	F53L/Y	I54S/A/M/T/L/V	<b>Q58E</b>

Grupo de anti-retrovirales	Tabla 1b. Mutaciones asociadas a resistencia transmitida										
<b>ITRAN</b>	Y115F	F116Y	<b>E138K</b>	Q151M	M184I/V	L210W	T215S/F/Y/E/V/C/D/I	K219Q/R/E/N			
<b>ITRNN</b>	Y188H/C/L		G190S/A/E		P225H	M230L	<b>P236L</b>				
<b>IPs</b>	G73S/A/T/C	<b>T74P</b>	<b>L76V</b>	V82S/F/A/T/C/L/M	<b>N83D</b>	I84A/C/V	<b>I85V</b>	N88S/D	<b>L89V</b>	L90M	

Tabla 1(a y b). Lista de mutaciones para la vigilancia epidemiológica asociadas con la resistencia transmitida. Las letras en negrilla para la nomenclatura de las mutaciones corresponden a la versión 2009 del SDRM. Las mutaciones en rojo son mutaciones que han sido removidas del listado del 2008.

Posteriormente se procedió a la comparación de los algoritmos para la vigilancia epidemiológica asociadas con la resistencia transmitida SDRM con el algoritmo CPR versus el algoritmo tradicional de la interpretación de resistencia asociada al uso de los antirretrovirales, HIV db program/Genotyping Resistance Interpretation versión 6.0.1 (Última actualización 5 de Junio del 2009), con el

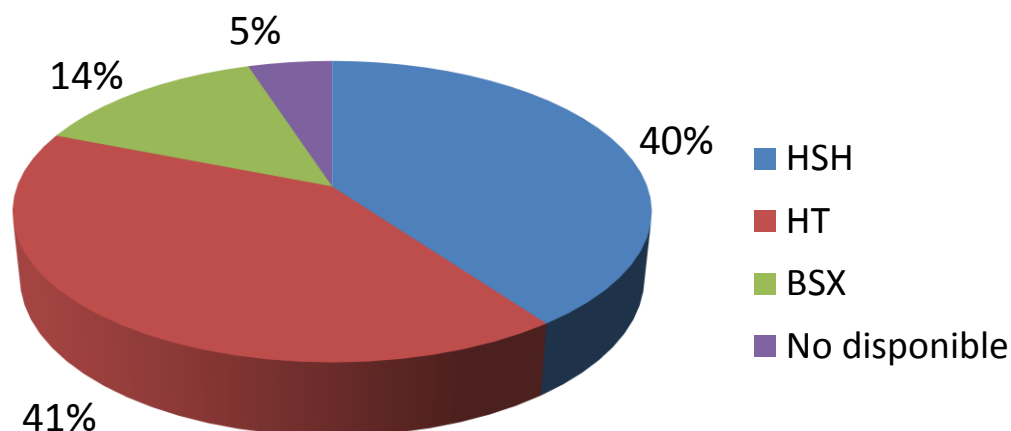
propósito de poder comparar este estudio con los resultados, previamente obtenidos a nivel mundial de otras cohortes de individuos con resistencia transmitida y reciente diagnóstico<sup>55</sup>.

## **RESULTADOS.**

De los 543 pacientes reclutados para este estudio 77.34% (420/543) eran de género masculino, 21.91% (119/543) de género femenino y en 0.7% no se contó con esta información (4/543).

Con respecto al factor de riesgo asociado con la infección por el VIH-1, se determinó que el 39.59% (215/543) tenía una preferencia sexual por su mismo género, HSH (Hombres que tienen sexo con Hombres); el 41.25% (224/543) tenían una preferencia por personas del género diferente, HT (Heterosexuales) y el 13.99% se refirieron como Bisexuales BSX (76/543). Solo en el 5.15%(28/543) no se contó con información del factor de riesgo. Ver Gráfica 1.

**Gráfico 1. Factor de riesgo asociado a preferencia sexual en pacientes con diagnóstico reciente de infección por el VIH-1**



La edad promedio de la población en estudio fue de 31.97 años al tiempo de la toma de muestra, con una moda 27 años con (33 individuos), y un valor medio o mediana de 31 años. Posteriormente los datos fueron agrupados conforme a la edad para establecer 5 clases (Tabla 2).

Tabla 2. Número de clases con frecuencia, frecuencia relativa y frecuencia acumulada.

Clase	Frecuencia	Punto Medio	Fr. Relativa	Fr. Acumulada
16 – 28	215	22	0.395	0.395
29 – 41	245	35	0.451	0.846
42 – 54	71	48	0.13	0.976
55 – 67	11	61	0.02	0.996
68 – 80	1	74	0.001	1

La frecuencia muestra un número mayor de individuos entre las clases 1 y 2 (16 a 41 años). Siendo estos individuos jóvenes con una mayor actividad sexual y económica. Desafortunadamente no se puede determinar si existe un

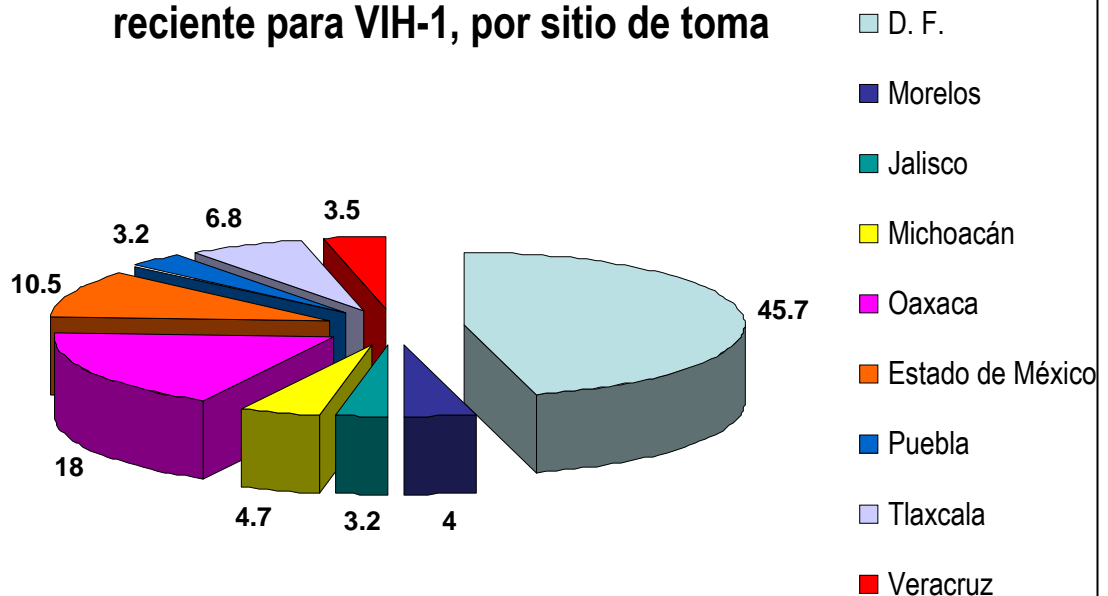
mayor riesgo de adquirir resistencia transmitida en estas clases dado que no fue el objeto de este estudio.

La distribución de las muestras obtenidas de acuerdo al sitio de origen se aprecia en la tabla 3 y gráfica 2.

Tabla 3 y gráfica 2. Distribución de pacientes por sitio.

Sitio	Estado	No. De muestras
A1 CAPPSIDA	D. F.	7
A2 CENSIDA	D. F.	164
A3 FUNDACION MEXICANA	D. F.	24
B1 CUERNAVACA	MORELOS	17
B2 GUADALAJARA	JALISCO	14
B3 MORELIA	MICHOACAN	20
B4 OAXACA	OAXACA	77
B5 TOLUCA	ESTADO DE MEXICO	45
B6 PUEBLA	PUEBLA	14
B7 TLAXCALA	TLAXCALA	29
B8 XALAPA	VERACRUZ	15

**Grafica 2. Porcentaje de pacientes con diagnóstico reciente para VIH-1, por sitio de toma**

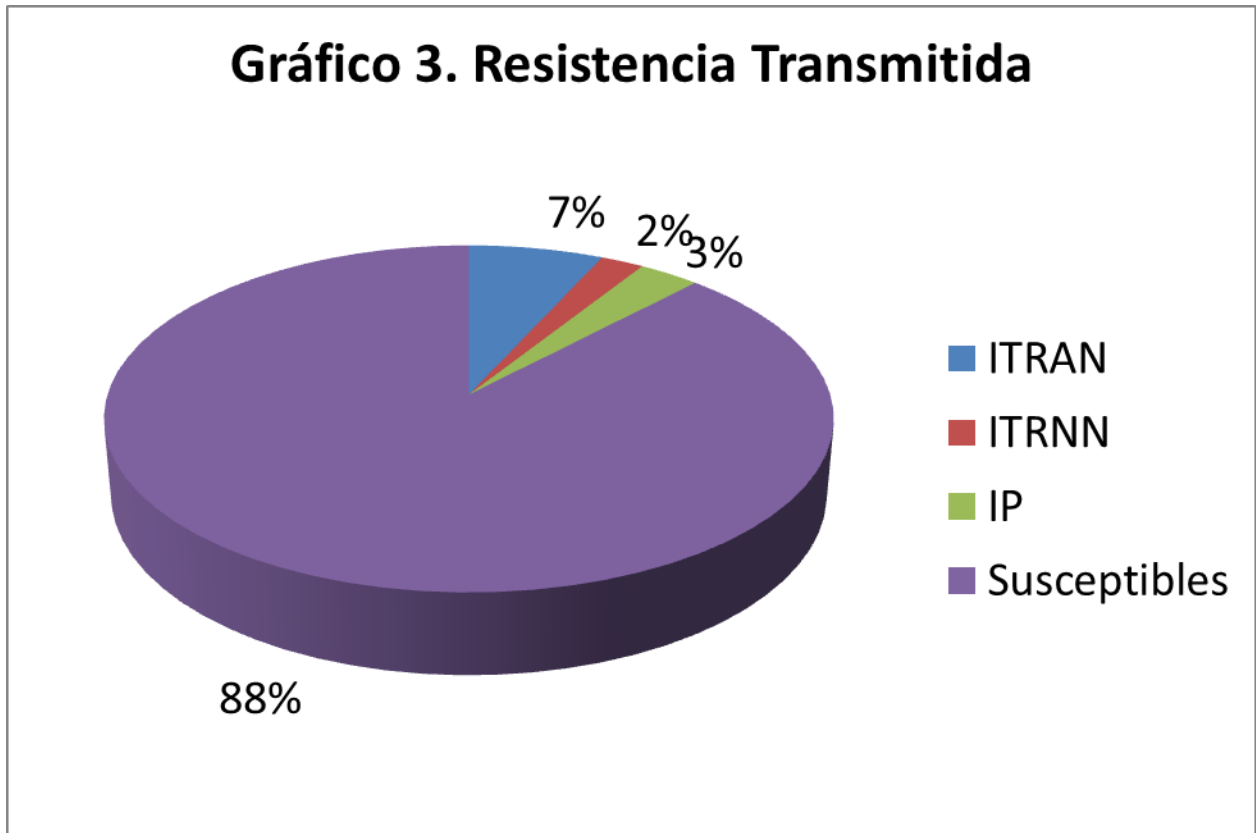




De acuerdo con el algoritmo de interpretación de la resistencia HIVDB de la Universidad de Stanford y las secuencias sometidas de los archivos fasta se pudo determinar el subtipo viral de las secuencias de los pacientes con diagnóstico **reciente** para el VIH-1, encontrando que el 99% de las infecciones son causadas por el subtipo B (422/426), mientras que sólo cuatro pacientes presentan infección por subtipos no B; dos de ellas son virus recombinantes con características de subtipos B/D y otra secuencia con características de recombinación de B/C. Sólo una secuencia resultó ser diferente al subtipo B, siendo esta un subtipo F puro, localizado en el estado de Veracruz.

Solamente se pudo amplificar el genotipo en el 78.4 % (426/543) de las muestras analizadas. De éstas, en el 74.2 % (403/543) fue posible obtener secuencias completas para la reverso transcriptasa y la proteasa. En dieciséis muestras solo se pudo determinar la secuencia para el gen de la proteasa (2.94 %) y en 7 muestras solo fue posible obtener la secuencia del gen de la reverso transcriptasa (1.28%). De las 426 secuencias obtenidas y de acuerdo con el algoritmo de Stanford Surveillance Drug Resistance Mutations SDRM se encontró que 10.3 % (44/426) de las secuencias presentaron evidencia de resistencia transmitida, de éstas, 6.82% (28/410) de las secuencias presentaron evidencia de resistencia transmitida para el grupo de los ITRAN, 2.19% (9/410) de las secuencias presentaron evidencia de resistencia transmitida para el grupo de fármacos de los inhibidores de la transcriptasa reversa no nucleósidos y el 3.1 % (13/419) de las secuencias mostraron resistencia transmitida para el grupo de los IPs. Cabe señalar que el 88% de las secuencias fueron catalogadas como susceptibles por el algoritmo SDRM. Por otro lado cinco secuencias evidenciaron resistencia transmitida a más de un grupo de antirretrovirales; dos de ellas presentaron mutaciones asociadas con resistencia transmitida para los grupos de los fármacos ITRAN e IPs mientras que tres secuencias más

presentaron resistencia transmitida a los tres grupos (ITRAN, ITRNN e IPs)  
Grafica 3.



Grafica 3. Porcentaje de secuencias con resistencia transmitida de acuerdo con las mutaciones de vigilancia epidemiológica con base en el algoritmo SDRM.

La frecuencia de las mutaciones asociadas con la resistencia para la vigilancia epidemiológica para cada uno de los grupos de medicamentos, encontradas en la población de pacientes con diagnóstico **reciente** para el VIH-1 y nunca tratadas, de los sitios participantes de este estudio, se puede apreciar en las tablas 4, 5 y 6.

<b>SDRM IPs</b>	<b>Frecuencia (%)</b>
<b>L23I (1)</b>	0.23
<b>D30N (1)</b>	0.23
<b>M46I (1)</b>	0.23
<b>F53L (2)</b>	0.47
<b>I54M (1)</b>	0.23
<b>I54V (1)</b>	0.23
<b>Q58E (7)</b>	1.64
<b>V82A (1)</b>	0.23
<b>V82F (1)</b>	0.23
<b>I85V (1)</b>	0.23
<b>N88D (1)</b>	0.23
<b>L90M (2)</b>	0.47

Tabla 4. Frecuencias de SDRMs encontradas en los pacientes con diagnóstico reciente para el VIH-1 para el grupo de medicamentos Inhibidores del gen de la proteasa.

<b>SDRM RT/ITRAN</b>	<b>Frecuencia (%)</b>
M41L (8)	1.95
D67N (3)	0.73
D67G (2)	0.49
T69D (2)	0.49
K70R (5)	1.22
F77L (3)	0.7
Y115F (1)	0.24
F116Y (2)	0.49
E138K (1)	0.24
Q151M (2)	0.48
M184V (3)	0.73
L210W (4)	0.97
T215S (4)	0.98
T215F (2)	0.49
T215Y (2)	0.49
T215E (5)	1.22
T215C (1)	0.24
T215D (4)	0.97
T215I (1)	0.24
K219Q (2)	0.48
K219R (1)	0.24
K219E (3)	0.73

Tabla 5. Frecuencias de SDRMs encontradas en pacientes con diagnóstico reciente para el VIH-1 y asociadas con el grupo de medicamentos Inhibidores análogos nucleósidos del gen de la reverso transcriptasa.

SDRM RT/ITRNN	Frecuencia
L100I (3)	0.73
K103N (6)	1.46
V106A (2)	0.48
Y181C (1)	0.24

Tabla 6. Frecuencias de SDRMs encontradas en pacientes con infección reciente por el VIH-1 para el grupo de medicamentos Inhibidores no nucleósidos del gen de la reverso transcriptasa.

En base a la distribución de los pacientes con diagnóstico reciente y que presentaron resistencia respecto a la entidad federativa, la mayoría de los casos se localizaron en la Ciudad de México 54.5 % (24/44), seguido por el estado de Oaxaca con 18.1% (8/44) y en tercer lugar el Estado de México con un 9.0% (4/44) mientras que el resto de los centros participantes presentó un porcentaje combinado del 18.1 %.

Posteriormente se realizó una comparación entre dos algoritmos para la determinación de la resistencia, el primero de ellos es una herramienta para la interpretación de la resistencia secundaria o resistencia asociada con el uso de antirretrovirales denominado HIVDB program versión 4.2.6 usando como criterio de resistencia (Bajo nivel de resistencia, Resistencia Intermedia y Alto nivel de Resistencia) y se comparó contra el algoritmo estandarizado para las mutaciones para la vigilancia epidemiológica asociadas a resistencia transmitida CPR (Calibrated Population Resistance) versión 4.1 beta Stanford database 2008<sup>55</sup>. Para este análisis sólo se emplearon aquellas muestras con secuencias completas (403). El algoritmo CPR determinó que 42/403 presentaron resistencia transmitida o primaria, 10.4%, vs 31 muestras para HIVDB que equivale al 7.6% en HIVDB program versión 4.2.6 [Prueba de Pearson 0.77(p=0.0000)]; 28 secuencias evidenciaron resistencia en el algoritmo calibrado, (6.9%), vs 24 secuencias en el HIVDB program (5.9%) con respecto a los análogos nucleósidos; 9 muestras evidenciaron resistencia para el algoritmo calibrado, 2.2%, vs 10 (2.48%) para HIVDB program asociadas con

los no nucleósidos y finalmente 3.22% (13/403) para CPR contra 1.48% (6/403) en HIVDB para los IPs.

Cuando se consideraron los dos algoritmos se encontró que 44 secuencias presentaron resistencia, sin embargo 15 de ellas fueron discordantes, trece consideradas como resistentes para CPR pero sensibles en HIVDB, mientras que 2 fueron resistentes para HIVDB vs susceptibles para CPR. Tabla 7.

ID Secuencias	Reverso Transcriptasa CPR/HIVdb									Proteasa CPR/HIVdb				
	ABC	AZT	D4T	DDI	TDF	DLV	EFV	ETR	NVP	APV/r	fAPV/r	NFV	SQV/r	TPV/r
A10010														BNR/S
A10028						BNR/S	BPR/S	BPR/S	BNR/S					
A20111													BPR/S	
A20966														BNR/S
A20971										BPR/S	BPR/S			
A20996														BNR/S
A21038	BPR/S													
A30007														BNR/S
A30096				BNR/BPR										
B30021	S/BPR	S/BNR	S/BNR	S/BNR	S/BPR									
B40481								BPR/S						
B50357														BNR/S
B50373										BPR/BNR		RI/BNR		
B50105														BNR/S
B70195	S/BPR													

S: Susceptible, BNR: Bajo Nivel de Resistencia, BPR: Bajo Potencial de Resistencia, RI: Resistencia Intermedia.

ABC: Abacavir; AZT: Zidovudina; D4T: Estavudina; DDI: Didanosina; TDF: Tenofovir; DLV: Delaviridina; EFV: Efavirenz; ETR: Etravirina; NVP: Nevirapina; APV/r: Amprenavir/Ritonavir; fAPV/r: Fosamprenavir/Ritonavir; NFV: Nelfinavir; SQV/r: Saquinavir/Ritonavir y TPV/r: Tipranavir/Ritonavir.

Tabla 7. Niveles específicos de resistencia a drogas para el VIH de acuerdo con los algoritmos CPR y HIVDB en muestras con diagnostico reciente para el VIH-1.

En la Tabla 8, se aprecia la frecuencia de las mutaciones encontradas de acuerdo con cada programa.

Medicamento	CPR	HIVdb
<b>Inhibidor de Proteasa</b>		
TPV(n=6)	R	S
fAPV(n=1)	R	S
SQV(n=1)	R	S
<b>Inhibidor de la Reverso Transcriptasa</b>		
ZDV(n=1)	S	R
dT4(n=1)	S	R
ddl(n=1)	S	R
ABC(n=2)	R	S
ABC(n=2)	S	R
TDF (n=1)	S	R
EFV (n=1)	R	S
ETV (n=2)	R	S
NVP (n=1)	R	S
DLV (n=1)	R	S

S: Susceptible; R: Resistente.

Tabla8. Diferencias encontradas de resistencia transmitida de acuerdo con CPR y HIVDB para Antirretrovirales específicos.

## DISCUSIÓN

La infección por el VIH en nuestro país continua afectando primordialmente a los individuos del sexo masculino (2/3 partes) tal y como lo evidencian los datos obtenidos en este estudio, que reclutó abiertamente a individuos que buscaban su diagnóstico.

Se puede decir que la forma de transmisión del VIH dentro de nuestro territorio es preferentemente por la vía sexual, siendo las relaciones homosexuales entre hombres la conducta más relacionada, seguida de las relaciones heterosexuales, aunque cabe mencionar que el objetivo de este estudio no fue evaluar los factores de riesgo para la adquisición del VIH-1.

Los individuos principalmente afectados de acuerdo con la edad, son la población económicamente activa (rango de edad 16 – 41 años) representando al 82% de la población estudiada.

Se puede decir que actualmente la epidemia de VIH-1 en la región central de México es originada por el subtipo B en un 99% de los casos y solamente un uno por ciento de subtipos no B.

La resistencia primaria encontrada en este estudio fue del 10.3 %, principalmente al grupo de los inhibidores de la transcriptasa reversa, seguido del grupo de los inhibidores de la proteasa (3%) y finalmente para el grupo de los análogos. Es importante señalar que un 1% de las secuencias de pacientes con diagnóstico **reciente** para el VIH-1 presentó evidencia de resistencia transmitida para más de una familia (INTRAN, ITRNN e IPs).

La frecuencia de las mutaciones asociadas con la resistencia transmitida más prevalentes en este estudio correspondieron principalmente para el grupo de los inhibidores de la transcriptasa reversa análogos nucleósidos, principalmente asociadas con los medicamentos análogos timidínicos: M41L (1.95), K70R (1.22), T215F/Y (1.9) y K219Q/E (1.2). Para el grupo de los Inhibidores de la transcriptasa reversa no nucleósidos sólo la mutación K103N evidenció una prevalencia de 1.46 y finalmente para el grupo de los inhibidores de la Proteasa sólo la mutación Q58E mostró una frecuencia equiparable a las anteriores de 1.64; así como F53L y L90M con 0.47. Es importante señalar que

en general, todas las frecuencias encontradas son mayores a las reportadas a otros estudios<sup>56, 57,58</sup>. Esto puede deberse principalmente al uso extendido de los análogos timidínicos por un periodo de más de 15 años en México, por ser la estructura del TARAA y principalmente con la combinación con Efavirenz en los que se ha reportado un alto grado de resistencia en comparación con otras combinaciones<sup>59</sup>.

Cuando se analizó la comparación entre los dos algoritmos CPR vs HIVDB program versión 4.2.6 se encontraron diferencias en 15 secuencias donde 13 casos fueron considerados como resistentes para CPR mientras que sensibles para HIVDB program y en dos casos resistentes para HIVDB program contra 2 sensibles para algoritmo CPR.

Cuando analizamos las diferencias encontradas entre los dos algoritmos CPR vs HIVDB program versión 4.2.6, las diferencias fueron relacionadas con Tipranavir (TPV) en 6 secuencias donde CPR las consideró como resistentes mientras que HIVDB fueron susceptibles. La misma diferencia fue observada en una secuencia para APV, SQV, NVP, DLV, EFV y DDI. Por otro lado el patrón de resistencia de acuerdo con HIVDB pero susceptible para CPR fue encontrado en una secuencia para ZDV, D4T, TDF y DDI. En el caso de ABC 2 secuencias mostraron ambos patrones de discordancia (Tabla8).

Es de suma importancia realizar la vigilancia epidemiológica de la resistencia transmitida con el algoritmo calibrado o estandarizado (CPR), con el fin de no subvalorar o sobrestimar la transmisión de cepas resistentes antes del inicio de la terapia antiretroviral, así como poder comparar los resultados obtenidos con otros estudios. Por otro lado el uso de algoritmos diseñados para el monitoreo de la resistencia secundaria solo debe considerarse una vez que el paciente se encuentra bajo terapia antiretroviral.

Ambos algoritmos están diseñados para cada uno de los propósitos vigilancia y manejo clínico.

De acuerdo con los datos de resistencia encontrados en este estudio México debería seguir la recomendación de iniciar terapia antirretroviral dirigida con una prueba de resistencia previa al inicio de tratamiento, para determinar el



esquema de tratamiento antirretroviral óptimo para cada paciente infectado con el VIH.

## **CONCLUSIONES.**

Los datos obtenidos en este estudio ayudan a reforzar las campañas de prevención sobre las poblaciones sexualmente activas principalmente en aquellas poblaciones que adoptan prácticas de riesgo (género masculino). Otro dato importante a señalar es que estas poblaciones son el principal aporte económico de sus familias y del país.

Las infecciones por el VIH en nuestro país son principalmente de un solo subtipo viral, lo que de alguna manera favorece el manejo clínico de los pacientes y el conocimiento de su progresión clínico-inmunológica.

El mayor porcentaje de resistencia transmitida o primaria encontrado en este estudio, correspondiente a los ITRAN, evidencia el uso extendido de éste grupo de medicamentos. La presencia de altas frecuencias de las mutaciones relacionadas con los análogos timidínicos está directamente relacionada por su uso ya que fueron columna vertebral de los esquemas antirretrovirales altamente activos (TARAA).

Por otro lado cabe señalar que el siguiente grupo de medicamentos en relación al porcentaje de resistencia transmitida es el grupo de los Inhibidores de proteasa. Aunque, sería de esperarse que en este grupo la tasa de resistencia transmitida fuera menor comparada contra los otros dos grupos de fármacos dada su alta barrera genética, el gran uso de inhibidores de proteasa en nuestro país así como lo complejo de su toma, en especial con aquellos de primera generación, con la consecuente menor adherencia pudieran estar relacionados con los resultados obtenidos.

La Ciudad de México, el estado de Oaxaca y el Estado de México presentan los mayores porcentajes de resistencia transmitida, esto puede deberse a muchos factores entre los que destacan, prevalencia de la infección, acceso a medicamentos y antigüedad en el inicio de la Terapia Antirretroviral.

Aunque la terapia antirretroviral ha reducido la morbi-mortalidad relacionada con el sida, ha permitido mejorar la calidad y cantidad de vida, así como restaurar y preservar la función inmunológica del paciente y mantener el mayor tiempo posible la supresión viral a niveles indetectables. La resistencia primaria o transmitida sigue siendo un reto para nuestros sistemas de salud, así como lo son también la reducción de costos en la compra de los medicamentos, la dificultad en la selección de segundos o terceros esquemas, así como las interacciones medicamentosas y la falta de adherencia.

Actualmente se desarrollan nuevos medicamentos con una mayor barrera genética y que son capaces de soportar mutaciones relacionadas con la resistencia que actualmente se encuentran en las cepas virales circulantes en la población de los pacientes recientemente infectados.

Los datos obtenidos de resistencia transmitida en este estudio sugieren la realización de las pruebas de resistencia antes del inicio del tratamiento, tal y como se realizan en los Estados Unidos; sin embargo desde el punto de vista del costo, así como de la logística de nuestro país, no es posible actualmente realizar estas pruebas en la mayoría de las instituciones donde se atienden a los pacientes con VIH-1 en México. Debido a esto, es muy importante que los sistemas de salud refuercen las campañas de sexo seguro entre las poblaciones actualmente infectadas, todo esto con el fin de evitar nuevas infecciones, así como de disminuir la transmisión de la resistencia primaria o transmitida. Por otro lado se debe establecer un fondo para realizar campañas de monitoreo periódico de la resistencia transmitida en los pacientes con diagnóstico reciente (al menos cada 5 años) y cuando exista ausencia de información se recomienda que se realicen estudios con una muestra de más de 500 individuos, que es el mínimo número de individuos que se requiere para detectar prevalencias entre el 5 y 10 %<sup>60, 61,62</sup>. También es indispensable crear un banco concentrador de la información con el fin de mantener una vigilancia epidemiológica que permita establecer vínculos con los sitios encargados del manejo clínico de los pacientes para que se detecten oportunamente aquellos brotes en las poblaciones en

riesgo y se manejen adecuadamente. Además reforzar las campañas de prevención de la transmisión del VIH, ya que una vez más queda de manifiesto que las poblaciones en riesgo sigue teniendo comportamientos de riesgo que permiten la transmisión del VIH y de las cepas resistentes. Por ahora se recomienda que los médicos tratantes mantengan una vigilancia estricta en los primeros 6 meses de tratamiento para detectar a aquellos individuos sospechosos de falla de respuesta al tratamiento por resistencia transmitida y como consecuencia, evitar el desarrollo de la resistencia a otros medicamentos.

Dada la trascendencia de la resistencia primaria a los antirretrovirales este es el primer trabajo donde se reporta la existencia de las mutaciones asociadas con la resistencia antirretroviral en individuos con diagnóstico reciente de la infección por el VIH-1 y que nunca han recibido tratamiento y que está analizado bajo un estándar internacional, lo que permite comparar nuestra población de pacientes con recién infección para el VIH-1 con los estudios que se han realizado en otros países.

El abarcar a una región geográfica más amplia del país a lo anteriormente reportado, hace de este estudio una fuente de información muy valiosa en el campo de la epidemiología molecular de la infección por el VIH-1 y contribuye con información indispensable para la optimización de las terapias iniciales en los pacientes con evidencia de resistencia transmitida y permite una reducción en los costos en la compra de medicamentos.

## **GLOSARIO.**

**Barrera genética:** se refiere a la cantidad de mutaciones necesarias para la generación de resistencia desde el punto de vista clínico en conjunto con la velocidad de aparición de dichas mutaciones y la capacidad de replicación asociada a ellas.

Así, una molécula de alta barrera genética es aquella que necesita varias mutaciones para generar resistencia o aquellas que aunque genere resistencia con una sola mutación ésta tarda mucho tiempo en aparecer gracias a una baja capacidad de replicación de la cepa viral que la expresa.

**Cuasiespecies:** cepas virales cuyo genoma varía entre el 1 y 2 %.

**Falla virológica:** carga viral persistente en presencia de tratamiento antirretroviral altamente supresor (TARAA).

**Fitness viral:** es la capacidad de un virus para infectar, replicar y reproducir una progenie infecciosa en un entorno.

**Mutación:** diferencia de amino ácidos de una o varias secuencias de referencia, en el caso del VIH-1 se emplean generalmente como secuencias de referencia las cepas HXB2 y NL43 del subtipo B.

**Personas con diagnóstico reciente de la infección por el VIH:** Individuos recién diagnosticados y sin exposición previa a antirretrovirales.

**Polimorfismos:** son mutaciones que ocurren al azar en virus no expuestos a una presión selectiva.

**Resistencia primaria:** es la resistencia a antirretrovirales encontrada en individuos sin tratamiento previo; en este tipo de resistencia las cepas resistentes son transmitidas de uno o varios intermediarios, generalmente personas con infección reciente documentada (6 ó 18 meses).

**Resistencia secundaria:** es la resistencia desarrollada en los individuos como consecuencia del uso de la terapia antirretroviral.

**Virión:** partícula viral circulante en el torrente sanguíneo.

## **BIBLIOGRAFÍA.**

1. Centers for Disease Control: *Pneumocystis* pneumonia Los Angeles.. MMWR Morb Mortal Wkly Rep1981; 30: 250-2.
2. Centers for Disease Control: Kaposi's Sarcoma and *Pneumocystis* Pneumonia among homosexual men-New York City and California. Los Angeles. MMWR Morb Mortal Wkly Rep1981; 30:305-8.
3. Saksena N., Wang B., and Dyer W. 2001. Biological and Molecular Mechanisms in Progression and non-Progression of HIV Disease. AIDS Rev; 3:133-144.
4. 2010 Report on the Global AIDS Epidemic. UNAIDS 2010 [en línea] < [http://www.unaids.org/globalreport/documents/20101123\\_GlobalReport\\_full\\_en.pdf](http://www.unaids.org/globalreport/documents/20101123_GlobalReport_full_en.pdf) >.
5. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Montagnier L. 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science; 220(4599): 868-871.
6. Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, et al. 1984. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. Science; 224(4648): 500-503.
7. Hoffmann- Rockstroh-Kamps, 2007. HIV Medicine 2007. 15<sup>TH</sup> edition. Flying Publisher [en línea] < <http://www.hivmedicine.com/hivmedicine2007.pdf> >.
8. Greene W, Peterlin B. 2002. Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy. Nature Med; 8(7):673-680.
9. Alcamí J. 2004. Avances en la inmunopatología de la infección por el VIH. Enferm Infecc Microbiol Clin; 22(8):486-496.
10. Daar E., Moudgil T., Meyer R., Ho D. 1991. Transient high levels of viremia in patients with primary human immunodeficiency virus type 1 infection. N Engl J Med; 324(14): 961-4.
11. Mellors J., Kingsley L., Todd J et al. 1995. Quantitation of HIV-1 RNA in plasma predicts outcome after seroconversion. Ann Intern Med;122: 573-579.

12. Jason J., Lui K-J., Hessel N. Darrow W.W. 1989. Risk of developing AIDS in HIV-infected cohorts of hemophiliac and homosexual men. *JAMA*; 261(5):725-727.
13. Rhodes D., Ashton L., Deacon N . 2000. Characterization of Tree nef-defective Human Immunodeficiency virus type 1 strains associated with Long-Term Nonprogression. *J Virol*; 74(22):10581-10588.
14. Sánchez M. M. Grant M. R. Porco T. C. Getz W. M. 2006. HIV Drug-resistant strains as epidemiologic sentinels. *Emerging Infectious Diseases*; 12:2: 191 - 197.
15. Erb P. Battegay M. Zimmerli W. et al. 2000. Effect of Antiretroviral therapy on viral load, CD4 cell count, and progression to acquired immunodeficiency syndrome in a community Human Immunodeficiency Virus-Infected cohort. *Arch Intern Med*; 160: 1134 – 1140.
16. Kaplan J. E. Hanson D. Dworkin M. S. Frederick T. Jones J. L. 2000. Epidemiology of Human Immunodeficiency Virus-Associated opportunistic infections in the United States in the era of High Active Antiretroviral Therapy. *CID*; 30 (Suppl 1): S5 – 14.
17. Hammer S. M., Saag M. S., et al. 2008. Treatment for adult HIV Infection: Recommendations of the International AIDS Society-USA panel. *JAMA*; 300(5):7: 555 – 570.
18. Anastos K., Barrón Y. Cohen M. H. Gange S. J. et al. 2004. The prognostic importance of changes in CD4+ cell count and HIV-1 RNA level in women after initiating Highly Active Antiretroviral Therapy. *Ann Intern Med*;140:256 – 264.
19. Gebhardt M., Rickenbach M., Egger M. . 1998. Impact antiretroviral combination therapies on AIDS surveillance reports in Switzerland. *AIDS*;12: 1195 -1201.
20. Phair J. P. Zolopa A. R. 2006. Mechanisms of HIV Drug resistance. *Clinical Care Options* [en línea] < <http://clinicaloptions.com/hiv>>.
21. Rambaut A. Posada D. Holmes E. C. et al. 2004. The cause and consequences of HIV evolution. *Nat Rev Genet*; 5 : 52 – 61.

22. Chen L. Perlina A. Lee C. J. 2004. Positive Selection in 40,000 Human Immunodeficiency Virus (HIV) type 1 sequences automatically identifies drug resistance and positive fitness mutations in HIV protease and reverse transcriptase. *J Virol*; 78(7): 3722 – 3732.
23. Svicher V. Silberstein F.C. Perno C. F. et al. 2005. Novel Human Immunodeficiency Virus type 1 protease mutations potentially involved in resistance to protease inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother*; 49(5): 2015 – 2025.
24. Keulen W., Boucher C., Berkhout B. 1996. Nucleotide substitution patterns can predict the requirements for drug-resistance of HIV-1 proteins. *Antivir Res*; 31:45 – 57.
25. De Ronde A., Van Dooren M. Hoek L. V. Goudsmit J. et al. 2001. Establishment of new transmissible and drug-sensitive Human Immunodeficiency Virus Type 1 wild types due to transmission of nucleoside analogue-resistant virus. *J Virol*; 75(2): 595 – 602.
26. Belew R., Chang M. W.. 2006. Modeling recombination's role in the evolution of HIV drug resistance [en línea]. <http://www.cogcsi.ucsd.edu/~rik/papers/hivPop-alifeX.pdf>
27. Althaus C. L. and Bonhoeffer S. 2005. Stochastic interplay between mutation and recombination during the acquisition of drug resistance mutations in Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J Virol*; 79(21): 13572 – 13578.
28. Bretscher M.T. Althaus C. L. Bonhoeffer S. et al. 2004. Recombination in HIV and the evolution of drug resistance: for better or worse? *Bioessays*; 26(2):180-188.
29. Chohan B., Lavreys L., Overbaugh J. et al. 2005. Evidence for frequent reinfection with Human Immunodeficiency Virus Type 1 of a different subtype. *J Virol*; 79(16):10701 – 10708.
30. Huang H., Chopra R., Harrison S.C. et al. 1998. Structure of a covalently trapped catalytic complex of HIV-1 reverse transcriptase: implications for drug resistance. *Science*; 282: 1669 – 1675.

31. Kohlstaedt L. A. and Steitz T. A. 1992. Reverse Transcriptase of human immunodeficiency virus can use either human tRNA (3Lys) or Escherichia coli tRNA (2Gln) as a primer in an in vitro primer-utilization assay. Proc Natl Acad Sci U S A; 89: 9652 -9656.
32. Sluis-Cremer D. Arion D. and Parniak M. A. 2000. Molecular mechanism of HIV-1 resistance to nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs). Cell Mol Life Sci; 57: 1408 – 1422.
33. Marcelin AG. Resistance to nucleoside reverse transcriptase inhibitors. In: Geretti AM, editor. Antiretroviral Resistance in Clinical Practice. London: Mediscript; 2006.
34. Goldschmith V. and Marquet R. 2004 Primer unblocking by HIV-1 reverse transcriptase and resistance to nucleoside RT inhibitor (NRTIs) Inter Journal Biochemistry Cell Biology 2004; 36(2004): 1687 – 1705.
35. Shafer R. W. Dupnik K., Eshleman S. H. et al. 2001. A guide to HIV reverse transcriptase and protease sequencing for drug resistance studies. HIV Seq Compend. 2001; 2001: 1-51.
36. Clotet B. 2004. Strategies for overcoming resistance in HIV-1 infected patients receiving HAART. AIDS Reviews 2004; 6: 123 -130.
37. Piers I. L. Soars M. A. 2004. Prevalence of Human Immunodeficiency Virus Drug resistance mutations and subtypes in drug naive, infected individuals in the army health service of Rio de Janeiro, Brazil. J Clin Microbiol; 42; 1: 426 – 430.
38. Weinstock H., Zaidi I., Heneine W., Kaplan J. E. et al 2004. The epidemiology of antiretroviral drug resistance among drug naive HIV-1 infected persons in 10 US cities. JID.2004; 189: 2174 – 2180.
39. Little S. J., Holte S., Routy J., Richman D. D. et al. 2002. Antiretroviral drug resistance among patients recently infected with HIV. N Engl J Med; 347(6): 385- 394.
40. Vella S and Palmisano L. 2005. The global status of resistance to antiretroviral drugs. CID. 2005; 41(Suppl4): S239-S246.



41. Wensing A., Vijver D. A., Angarano G., Boucher Ch. A. et al 2005. Prevalence of drug-resistant HIV-1 variants in untrated individuals in Europe: Implications for clinical management. JID. 2005; 192(6):958-966.
42. Kimberly Smith. Introduction: The Role of adherence in effective antiviral therapy. IN Clinical Care Options [en línea April 19 th 2012 ] <<http://www.clinicaloptions.com/HIV/Treatment%20Updates/First-Line/Modules/Smith/Pages/Page%201.aspx>>
43. Cingolani A., Antinori A., Rizzo M., Luca A et al. 2002. Usefulness of monitoring HIV drug resistance and adherence in individuals failing highly active antiretroviral therapy: randomized study (ARGENTA). AIDS; 16(3):369-379.
44. Grant R. M. Hecht F. M., Warmerdam M., Kahn J.O. et al. 2002. Time trends in primary HIV-1 drug resistance among recently infected persons. JAMA; 288 (2): 181-188.
45. Shafer R. W., Rhee S. Y., Bennett D. et al 2007. HIV protease and reverse transcriptase mutations for drug resistance surveillance. AIDS; 21(2): 215- 223.
46. Hirsch M., Brun-Vézinet F., Clotet B., Richman D.D. et al. 2003. Antiretroviral Drug Resistance testing in adults with Human Immunodeficiency Virus Type 1: 2003 recommendations of an International AIDS Society USA-Panel. CID. 2003; 37. (1 July) 113-128 .
47. Escoto-Delgadillo M., Vazquez-Valls E., Ramírez-Rodríguez M., Torres.Mendoza B.M. et al. Drug resistance patterns in HIV patients naïve to antiretrovirals in Mexico. CD Only: The XV International AIDS Conference: Abstract no. B11496
48. Escoto-Delgadillo M. et al. 2005. Drug resistance mutations in antirretroviral-naive patients with established HIV-1 infection in Mexico. HIV Medicine (2005); 6: 403-409.
49. SSA 2003. Panorama epidemiológico del VIH/SIDA e ITS en México. CONASIDA Diciembre 2003
50. Atención Primaria en la Red. Pina Fernández 2001. Determinación del tamaño muestral.

⟨<http://www.fisterra.com/mbe/investiga/9muestras/9muestras2.asp#tamaño>⟩  
[Abril 2004]

51. González-Garza., Rojas-Martínez R., Hernández-Serrato M., Olaiz-Fernández G. 2005. Perfil del comportamiento sexual en adolescentes mexicanos de 12 a 19 años de edad. Resultados de la ENSA 2000. Salud Pública de México 2005; 47(3): 209 – 218.
52. Devereux H. L., Youle M., Johnson M. A. Loveday C. 1999. Rapid decline in detectability of HIV-1 drug resistance mutations after stopping therapy. AIDS 1999; 13(18): F123-F127.
53. Little S. J. Koelsch K.K., Ignacio C.C. Wong J.K. et al. Persistence of transmitted drug-resistant virus among subjects with primary HIV infection deferring antiretroviral therapy. Eleventh Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, San Francisco, abstract 36LB, 2004
54. Iarikov D. E., Irizarry-Acosta M., Martorell C., Skiest D. J. et al. 2010. Use of HIV resistance testing after prolonged treatment interruption. J Acquir Immune Defic Syndr; 53(3): 333-337.
55. Guía de Usuario. ViroSeq™ Genotyping System v2.0 Celera Diagnostics.
56. Gifford RJ, Liu TF, Rhee SY, Kiuchi M, Hue S, Pillay D, Shafer RW (2009). The calibrated population resistance tool: standardized genotypic estimation of transmitted HIV-1 drug resistance. *Bioinformatics*, 2009 Mar 20. [En línea] <<http://cpr.stanford.edu/cpr.cgi>⟩
57. Shafer R. W. Rhee S. Y. and Bennett D. 2008. Consensus drug resistance mutations for epidemiological surveillance: basic principles and potential controversies. *Antiviral Ther* 2008; 13 Suppl 2: 59 -68.
58. Bennett D. SDRM 2009 [en línea] HIV Drug Resistance Database <[http://cpr.stanford.edu/input/sdrm/SDRM\\_2009.txt](http://cpr.stanford.edu/input/sdrm/SDRM_2009.txt)⟩
59. Bennett D., Camacho R. J., Otelea D., Shafer R.W. et al. 2009. Drug Resistance Mutations for surveillance of transmitted HIV-1 drug-resistance: 2009 Update. *Plos one* 2009; 4(3): 1- 8.

60. von Wyl V., Yerly S., Böni J. and Günthard H.F. 2012. Incidence of HIV-1 drug resistance among antiretroviral treatment-naive individuals starting modern therapy combinations. *Clin Infect Dis.* 2012; 54(1):131-140.
61. Jonson V. Brun-Vézinet F., Clotet B. Richman D.D. et al. International AIDS Society-USA Topics in HIV Medicine. Update of the drug resistance Mutations in HIV: Fall 2006. Vol.13 Issue 3 August/September 2006.
62. Lazzari S., Felici A., Sobel H., and Bertagnolio S. HIV Drug resistance surveillance: Summary of an april 2003 WHO consultation. *AIDS* 2004; 18(suppl 3): S49-53.