



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**“Tipificación HLA y epítomos de CTLs asociados en  
pacientes VIH positivos del Instituto Nacional de  
Enfermedades Respiratorias”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGO**

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

**JOSÉ HUMBERTO VALENZUELA PONCE**



**DIRECTOR DE TESIS:  
DR. SANTIAGO ÁVILA RÍOS**

**2010**



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS  
Secretaría General  
División de Estudios Profesionales

Votos Aprobatorios

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ  
Jefe de la División de Estudios Profesionales  
Facultad de Ciencias  
P r e s e n t e

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

**Tipificación HLA y epítomos de CTLs asociados en pacientes VIH positivos del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias**

realizado por **Valenzuela Ponce José Humberto** con número de cuenta **0-9932783-1** quien ha decidido titularse mediante la opción de tesis en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario Dra. Klinty Julieta Torres Hernández

Propietario M. en Salud Pública Gustavo Reyes Terán

Propietario M. en C. Santiago Ávila Ríos  
Tutor

Suplente Q.F.B. Criselda Mendoza Milla

Suplente Q.F.B. Joel Armando Vázquez Pérez

Atentamente,

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Ciudad Universitaria, D. F., a 12 de noviembre de 2009

EL COORDINADOR DEL COMITÉ ACADÉMICO DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

DR. PEDRO GARCÍA BARRERA

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA  
DE BIOLOGÍA

Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.  
'nlm.

### Hoja de Datos del Jurado

Formato	
1. Datos del alumno Autor Apellido paterno: Apellido materno: Nombre(s): Teléfono: Universidad: Facultad o escuela: Carrera: No. de cuenta:	1. Datos del alumno  Valenzuela Ponce José Humberto 044 5537334241 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 099327831
1. Datos del tutor Grado: Nombre(s): Apellido paterno: Apellido materno:	1. Datos del tutor Dr Santiago Ávila Ríos
1. Datos del sinodal 1 Grado: Nombre(s): Apellido paterno: Apellido materno:	1. Datos del sinodal 1 Dra Klintsy Julieta Torres Hernández
1. Datos del sinodal 2 Grado: Nombre(s): Apellido paterno: Apellido materno:	1. Datos del sinodal 2 M en Saluda Pública Gustavo Reyes Terán
1. Datos del sinodal 3 Grado: Nombre(s): Apellido paterno: Apellido materno:	1. Datos del sinodal 3 Dra Criselda Mendoza Milla
1. Datos del sinodal 4 Grado: Nombre(s) Apellido paterno: Apellido materno:	1. Datos del sinodal 4 Dr Joel Armando Vázquez Pérez
1. Datos del trabajo escrito Título:  Subtítulo: Número de páginas: Año:	1. Datos del trabajo escrito Tipificación HLA y epítomos de CTLs asociados en pacientes VIH positivos del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias  84 páginas 2010

# ÍNDICE

Abreviaturas .....	3
Índice de Figuras y Tablas.....	5
RESUMEN .....	6
INTRODUCCIÓN.....	7
Complejo Principal de Histocompatibilidad .....	7
Organización Genética .....	7
Genes HLA de clase I .....	8
Genes HLA de clase II y III.....	9
Estructura molecular de las proteínas HLA .....	9
Nomenclatura de los genes HLA .....	12
Expresión y Regulación de los genes HLA .....	13
Polimorfismo Genético de los genes HLA de clase I.....	14
Procesamiento de Antígenos presentados por MHC clase I y reconocidos por linfocitos T CD8 <sup>+</sup> .....	15
Unión de péptidos a las moléculas HLA .....	17
Mecanismos de destrucción de las células infectadas mediados por CTLs .....	18
Virus de la Inmunodeficiencia Humana .....	20
Introducción y Origen.....	20
Clasificación Taxonómica y Estructura .....	20
Ciclo de replicación .....	22
Historia Natural de la Enfermedad.....	26
El Antígeno Leucocitario Humano (HLA) y el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) .....	27
Alelos HLA en la infección por VIH .....	28
Importancia de los linfocitos T CD8+ en el control de la replicación viral .....	29
Importancia del polimorfismo de los genes HLA de clase I.....	30
Respuesta inmune por CTLs y evolución viral .....	30
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN .....	34
OBJETIVOS.....	35
Objetivos Generales .....	35
Objetivos Particulares .....	35
HIPOTÉISIS.....	36
METODOLOGÍA.....	37
Grupo de Estudio.....	37
Procesamiento y Almacenamiento de Muestras .....	37
Separación de PBMCs.....	37
Extracción de DNA.....	38

Cuantificación de DNA .....	38
Tipificación de genes HLA.....	39
Determinación de la Carga Viral de VIH .....	40
Conteo de Linfocitos T CD4+ .....	40
Análisis de Datos y Estadísticos.....	41
Frecuencias Alélicas y Haplotípicas .....	41
Determinación de la existencia de Desequilibrio de Ligamiento.....	42
Valores de Carga Viral /Linfocitos T CD4+ y asociaciones con alelos HLA .....	43
Comparaciones de frecuencias alélicas HLA de VIH positivos contra otras poblaciones VIH negativas .....	44
Búsqueda de Epítomos de CTLs restringidos por los alelos HLA más frecuentes .....	44
RESULTADOS .....	45
Frecuencias Alélicas HLA .....	45
Desequilibrio de Ligamiento.....	51
Asociaciones entre la presencia de grupos alélicos HLA y los valores de los parámetros clínicos (carga viral y conteo de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> ) .....	52
Comparación de las frecuencias HLA de pacientes VIH positivos con poblaciones no infectadas .....	57
Búsqueda de Epítomos de VIH .....	59
DISCUSIÓN.....	66
CONCLUSIONES .....	71
REFERENCIAS.....	72

## Abreviaturas

CA	Cápside
Cdk9	Cinasa dependiente de Ciclina 9
CIENI	Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas
CPA	Célula Presentadora de Antígeno
cT	Célula T
CTLs	Linfocito T CD8 <sup>+</sup> Cytotóxico
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
Env	Proteína de Envoltura
Gag	Proteína Grupo Antígeno Específico
HLA	Antígeno Leucocitario Humano
IN	Integrasa
INER	Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
INF $\gamma$	Interferón gamma
LTR	Repeticiones Terminales Largas
MA	Matriz (p17)
Mb	Megabase
MHC	Complejo Principal de Histocompatibilidad
mRNA	RNA mensajero
Nef	Factor Negativo
NES	Secuencia de Exportación Nuclear
NFAT	Factor Nuclear de Células T activadas
NF $\kappa$ B	Factor Nuclear $\kappa$ B
NK	Células Asesinas Naturales
NLS	Señal de localización nuclear
N-TEFs	Factores Negativos de la Transcripción-Elongación
PBMC	Células Mononucleares de Sangre Periférica
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PIC	Complejo de Preintegración
Pol	Polimerasa
PR	Proteasa
RE	Retículo Endoplásmico
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAPII	RNA polimerasa tipo II
RRE	Elemento de Respuesta a Rev
RT	Transcriptasa Inversa
RTC	Complejo de Retrotranscripción

SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
SIV	Virus de Inmunodeficiencia Simiana
SSP	Iniciador Secuencia Específico
TAP	Proteína Transportadora de Péptidos
TAR	Elemento de Respuesta de la Transactivación
Tat	Proteína Transactivadora
TCR	Receptor de Células T
TNF $\alpha$	Factor de Necrosis Tumoral alfa
Vif	Factor de Infectividad Viral
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
Vpr	Proteína viral R
Vpu	Proteína viral U
$\beta_2m$	$\beta_2$ -microglobulina

## Índice de Figuras y Tablas

Figura 1. Mapa genético de los genes del MHC	7
Figura 2. Moléculas HLA de clase I	10
Figura 3. Moléculas HLA de clase II	11
Figura 4. Unión del péptido a las moléculas HLA	11
Figura 5. Residuos polimórficos de las moléculas HLA	12
Figura 6. Segregación de los genes HLA en haplotipos	14
Figura 7. Presentación cruzada de antígenos a los linfocitos T CD8+	16
Figura 8. Vía de procesamiento antigénico de clase I	17
Figura 9. Mecanismos de la lisis mediada por CTLs	19
Figura 10. Formación del conjugado entre CTL y una célula blanco	19
Figura 11. Virus de la Inmunodeficiencia Humana	21
Figura 12. Genoma del VIH	22
Figura 13. Eventos tempranos en el ciclo de replicación: fusión, retrotranscripción e integración	24
Figura 14. Eventos tardíos en el ciclo de replicación: transcripción, traducción y gemación viral	26
Figura 15. Gel de agarosa cargados con productos de SSP-PCR	40
Figura 16. Distribución Alélica HLA (genes A, B y C)	49
Figura 17. Distribución Haplotípica HLA (2 y 3 loci)	51
Figura 18. Box plots de los conteos de linfocitos T CD4+ entre los diferentes grupos alélicos HLA	54
Figura 19. Box plot del conteo de Linfocitos T CD4+ de pacientes B*53 positivos vs. B*53 negativos y B*14 positivos vs. B*14 negativos	54
Figura 20. Box plots de los valores de carga viral entre los diferentes grupos alélicos HLA	56
Figura 21. Box plot de los valores de Carga Viral de pacientes B*58 positivos vs. B*58 negativos y B*57 positivos vs. B*57 negativos	56
Figura 22. Distribuciones HLA de VIH positivos y poblaciones VIH negativas	57
Figura 23. Frecuencias HLA significativamente diferentes entre VIH+ y mestizos mexicanos sanos	58
Figura 24. Frecuencias HLA significativamente diferentes entre VIH+ y latinos sanos	59
Figura 25. Frecuencias HLA significativamente diferentes entre VIH+ y caucásicos sanos	59
Tabla 1. Nomenclatura HLA	13
Tabla 2. Polimorfismo HLA; Base de datos IMGT/HLA	14
Tabla 3. Genes del VIH y sus funciones	22
Tabla 4. Asociaciones HLA con la infección por VIH	29
Tabla 5. Características de la cohorte de VIH+ del centro de México	45
Tabla 6. Haplotipos HLA de pacientes VIH+ y parámetros clínicos	45
Tabla 7. Equilibrio Hardy-Weinberg en los loci HLA-A, B y C	48
Tabla 8. Distribución de las Frecuencias Alélicas (genes A, B y C)	48
Tabla 9. Frecuencias haplotípicas más frecuentes (2 y 3 loci)	50
Tabla 10. Diferentes alelos HLA encontrados	51
Tabla 11. Desequilibrio de Ligamiento	52
Tabla 12. Asociaciones de alelos HLA y número de linfocitos T CD4+	53
Tabla 13. Asociaciones entre grupos alélicos HLA y Carga Viral	55
Tabla 14. Epítomos de VIH reportados y restringidos por alelos del locus HLA-A	60
Tabla 15. Epítomos de VIH reportados y restringidos por alelos del locus HLA-B	62
Tabla 16. Epítomos de VIH reportados y restringidos por alelos del locus HLA-C	64

## RESUMEN

La respuesta de linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos (CTLs) es importante en el control de la replicación del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) y está restringida por las moléculas del Antígeno Leucocitario Humano (HLA) de clase I. Algunos alelos HLA de clase I específicos se han asociado con diferencias en susceptibilidad a la infección por VIH o con un avance lento o rápido de la enfermedad en distintas poblaciones; sin embargo, no se conoce la distribución alélica HLA en individuos VIH positivos (VIH+) mexicanos, ni posibles asociaciones entre alelos HLA y la progresión de la enfermedad en esta población. Se tipificaron los genes HLA de clase I A, B y C en 120 pacientes VIH+ del centro del país por PCR con primers secuencia específicos (SSP UniTray). Las frecuencias alélicas HLA se compararon con las de otras poblaciones y se buscaron asociaciones entre alelos HLA y parámetros clínicos indicativos del avance de la infección por VIH. Los alelos más frecuentes fueron: A\*02 (37%), A\*24 (15%), B\*35 (19%), B\*39 (16%), Cw\*07 (30%) y Cw\*04 (19%). Los haplotipos más frecuentes para 2 loci fueron: B\*35-Cw\*04 (12%), B\*39-Cw\*07 (10%), A\*02-Cw\*07 (10%) y A\*02-Cw\*04 (10%), y para 3 loci fueron: A\*02-B\*35-Cw\*04 (7.5%), A\*02-B\*39-Cw\*07 (4.1%) y A\*02-B\*15-Cw\*01 (2.9%). Las frecuencias alélicas observadas en los loci HLA-A, B y C se encontraron en equilibrio Hardy-Weinberg. Se encontraron asociaciones entre los alelos B\*53 y B\*14 y conteos mayores de linfocitos T CD4<sup>+</sup> ( $p=0.0054$ ;  $q=0.06$  y  $p=0.0067$ ;  $q=0.06$ , respectivamente) y entre los alelos B\*58 y B\*57 y valores menores de carga viral ( $p=0.0097$ ;  $q=0.02$  y  $p=0.02$ ;  $q=0.03$ ). Se encontraron diferencias significativas en las frecuencias alélicas HLA de pacientes VIH+ y mestizos mexicanos no infectados (Cw\*07/08, A\*02/23/69 y B\*39/55), latinos (B\*39) y caucásicos (B\*39/08/35/07/44/57/52, A\*01/03/24/25/02/11/32/36/31/33 y Cw\*08/06/03/04/05/01). Nuestros datos corroboran las características inmunogenéticas únicas de la población mexicana y, sugieren posibles diferencias en las frecuencias de alelos HLA entre la población infectada y la no infectada que podrían representar factores de protección y de riesgo en nuestra población.

# INTRODUCCIÓN

## Complejo Principal de Histocompatibilidad

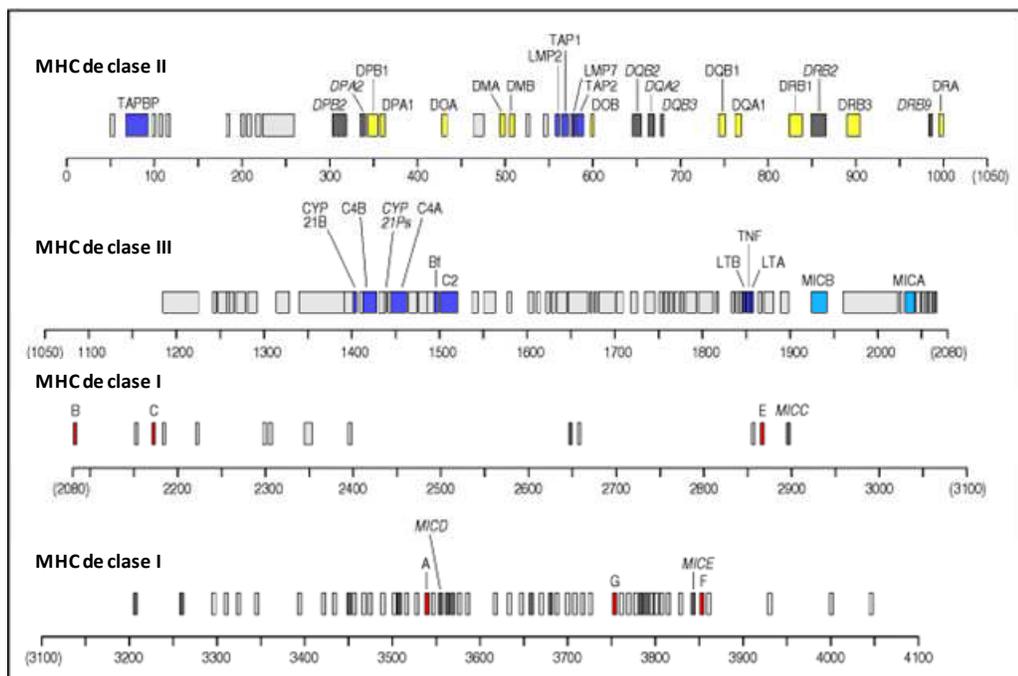
### Organización Genética

El complejo principal de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés) es un grupo de genes que abarca una región extensa del genoma de la mayoría de los vertebrados y que juega un papel fundamental en el establecimiento de la respuesta inmune, la autoinmunidad y en el éxito reproductivo. Los genes MHC se localizan en el brazo corto del cromosoma 6, específicamente en la banda 6p21.3 ocupando aproximadamente 4 megabases (Mb, millón de pares de bases). Muchos de estos genes están relacionados entre sí funcional y estructuralmente.

El MHC fue descubierto como un locus extendido con un alto contenido de genes sumamente polimórficos que determinaban el pronóstico de los tejidos transplantados entre individuos. Los primeros descubrimientos se realizaron en cepas cosanguíneas de ratones que tenían rechazo agudo a injertos tisulares<sup>1</sup>.

El MHC está dividido de manera arbitraria en tres regiones designadas como clases, estas son clase I, II y III, mismas que en conjunto contienen más de 200 loci<sup>2</sup>, aunque se piensa que existen muchos más genes sin función conocida aún. La región de la clase I se encuentra en el extremo más telomérico del MHC, ocupa aproximadamente 2 Mb y hasta ahora se conocen 25 loci, aunque se calcula que podría tener más de 50. La región de clase II es la más centromérica del MHC, tiene un tamaño de aproximadamente 0.8Mb y contiene unos 34 loci. La región clase III se encuentra entre los genes de la clase I y II, ocupa unas 2.2Mb y contiene 63 loci (Figura 1).

Se calcula que aproximadamente el 10% de la secuencia de DNA del MHC codifica para proteínas funcionales, pero la función del 90% restante se desconoce<sup>3</sup>.



**Figura 1. Mapa genético detallado de los genes del MHC.** Se muestra la organización de las clases I, II y III de los genes HLA con distancias genéticas aproximadas en pares de bases (pb). Los genes con función conocida son mencionados en el texto.

genes adicionales indicados en la clase I (por ejemplo E, F y G) pertenecen a esta clase, codificando para moléculas Ib (no clásicas); los genes adicionales en la clase I son pseudogenes. Los genes mostrados en la clase III codifican para proteínas del complemento C4 (dos genes, C4A y C4B), C2 y el factor B (en el mapa aparece como Bf), así como los genes que codifican para TNF $\alpha$  y linfotóxina (LTA y LTB). Cercanamente relacionados a los genes C4 se encuentra el gen de la 21-hidroxilasa (CYP 21B). Los genes en color gris y escritos en itálicas son pseudogenes. Los genes en rojo son de HLA clase I, con excepción de los genes MIC, que están en azul. Los genes HLA clase II se muestran en amarillo. Los genes que tienen función inmunológica y que están en la región MHC (pero no relacionados con HLA clase I y II) se muestran en morado. Tomado de Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M. & Sclomchik, M. Immunobiology. Garland Science, (2001).

### **Genes HLA de clase I**

Algunos genes del MHC reciben nombres específicos dependiendo de la especie en que se encuentren. En el humano, esta familia de genes se conoce como HLA, (del inglés, *Human Leucocyte Antigens*). En ratones, estos genes se llaman H2 y presentan una alta homología con el MHC humano. De ahora en adelante en este trabajo se utilizará el término HLA para referirse a los genes del complejo MHC en humanos.

Los genes HLA agrupados en la región de clase I del MHC codifican para proteínas que se expresan en la superficie de la mayoría de las células de los vertebrados que los presentan. Estas proteínas tienen la función de presentar péptidos al receptor de células T (TCR, *T Cell Receptor*, *Receptor de células T*) provenientes de patógenos intracitoplasmático y que son procesados en el interior de las células. Algunos genes HLA parecen haber perdido esa función ya que, aunque la estructura de la proteína sugiere que en algún momento tuvieron la capacidad de unir péptidos, no son capaces de presentarlos en la superficie celular. La estructura de las proteínas codificadas por esos genes atípicos es muy distinta a la estructura de las proteínas codificadas por los genes HLA de clase I llamados clásicos. Aún cuando los genes atípicos no presentan necesariamente funciones inmunológicas precisas, algunos expertos los consideran funcionalmente relacionados a los genes clásicos<sup>4</sup>. Los genes clásicos incluyen a los HLA-A, B y C que sí llevan a cabo la función de presentación de péptidos procesados intracelularmente.

En la región de clase I, los loci de HLA están entremezclados con otros loci no relacionados y cuya función inmunológica se desconoce, algunos ejemplos de ellos son el locus que codifica para la cadena de  $\beta$  tubulina, el gen de la proteína de unión a GTP, el factor de transcripción de unión a octámeros, entre otros.

De los loci HLA de clase I, se sabe que ocho de ellos son genes funcionales (HLA-A, B, C, E, F, G, MICA y MICB), cuatro son pseudogenes (HLA-H, J, K y L), cuatro son pseudogenes truncados (HLA-75, 16, 80 y 90) y tres son fragmentos de genes (HLA-17, 21 y 30). Los genes HLA clase I se dividen en dos categorías: clase Ia y clase Ib, los de clase Ia (genes clásicos; HLA-A, B y C) unen péptidos y los presentan al receptor de células T, estas proteínas se expresan en la superficie de las células somáticas pero en mayor cantidad en células linfoides y en poblaciones humanas tienen un alto grado de polimorfismo. Las proteínas codificadas en los genes de clase Ib (genes no clásicos; HLA-E, F y G) presentan péptidos a un subgrupo de células T, su patrón de expresión en los tejidos es distinto al de las moléculas Ia y presentan un número reducido de variantes o alelos (bajo polimorfismo)<sup>5</sup>. Los loci HLA-E, -F y -G parecen tener aún restos de funcionalidad o bien se han especializado en presentar ciertos péptidos con otros ligandos, en el ratón algunas moléculas clase Ib aparentemente se han especializado en presentar péptidos codificados en genes del DNA mitocondrial. Finalmente también están los pseudogenes

recientemente inactivados y pseudogenes truncados (fragmentos de genes)<sup>6</sup> que no presentan ninguna función.

### **Genes HLA de clase II y III**

La región de clase II contiene una gran cantidad de genes tales como los LMP2 y LMP7 que codifican para subunidades del proteasoma y los genes TAP1 y TAP2 que codifican para proteínas transportadoras de péptidos, también se encuentra el pseudogen HLA-Z1. Las moléculas HLA de clase II son heterodímeros formados por una cadena alfa y otra beta y están clasificadas en cinco familias: HLA-DP, -DN, -DM, -DO, -DQ y -DR. Cada una de estas regiones incluye dos genes: A y B, que codifican para la cadena  $\alpha$  y  $\beta$  respectivamente. Notoriamente, las dos cadenas que forman una molécula HLA de clase II provienen de la misma familia; así por ejemplo la cadena DP alfa se asocia con una cadena DP beta y una DM alfa con DM beta. Con respecto a la familia DR, todos los humanos tienen un locus DRA (DR alfa) pero difieren en el número de loci DRB por cromosoma (pueden ser de 2 a 5 loci diferentes). Se conocen nueve loci DRB: HLA-DRB1, -DRB3, -DRB4 y -DRB5 que son funcionales; HLA-DRB2, -DRB6, -DRB7 y -DRB8 que son pseudogenes; y HLA-DRB9 que es un gen truncado. Los diferentes números y combinaciones de los genes DRB definen varios haplotipos HLA-DR<sup>7</sup>.

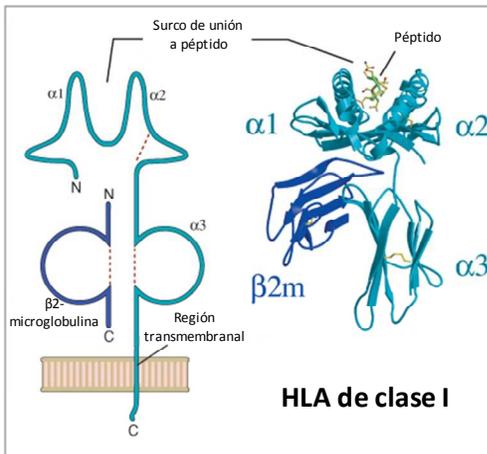
La región de clase III contiene genes que están principalmente involucrados en la inmunidad natural. En primer lugar encontramos los genes que codifican para los componentes iniciales de la cascada del complemento como C4, C2 y el factor B, así como los genes del factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) y la linfotóxina. Además existen otros genes como los de las proteínas de choque térmico, la 21-hidroxilasa, la valil-tRNA sintasa, entre otros (Figura 1)<sup>7</sup>.

### **Estructura molecular de las proteínas HLA**

Tanto los genes de clase I como los de clase II están divididos en exones e intrones; el gen completo, excepto su región reguladora, es transcrito a RNA, pero los intrones son removidos durante el procesamiento del transcrito primario<sup>8</sup>. La organización de los exones e intrones de los genes HLA de clase I es muy similar a la de otras especies de vertebrados. Cada gen de clase I contiene 6 o 7 exones, el exón 1 abarca la región 5' no traducida (5'UT) y un pequeño espacio de DNA que codifica para el péptido señal. La región 5'UT es transcrita a RNA que forma parte de la secuencia de mRNA pero no es traducida a proteína. El péptido señal es el responsable del paso de la proteína a través de la membrana durante la síntesis en el retículo endoplásmico, después de esto el péptido señal es eliminado. Los exones 2, 3 y 4 codifican para tres dominios denominados  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 y  $\alpha$ 3 respectivamente (Figura 2)<sup>7</sup>.

Las moléculas de clase I constan de dos cadenas polipeptídicas unidas de forma no covalente: una cadena alfa (cadena pesada) codificada por genes HLA de 44 a 47kDa y una subunidad de 12kDa no codificada en el MHC denominada  $\beta$ <sub>2</sub>microglobulina. Cada cadena alfa está orientada de manera que aproximadamente tres cuartas partes del polipéptido se extienden hacia el medio extracelular, un breve segmento hidrofóbico cruza la membrana celular y los residuos carboxilos terminales se localizan en el citoplasma. Los segmentos amino terminal, cada uno con una longitud aproximada de 90 residuos, interactúan para formar una plataforma de una lámina de 8 hebras antiparalelas con plegamiento beta

que soportan dos hebras paralelas de hélice alfa. Esto forma la hendidura de unión a péptidos de las moléculas de clase I. El tamaño que tiene es suficientemente grande (aprox.  $25\text{\AA} \times 10\text{\AA} \times 11\text{\AA}$ )<sup>1</sup> para unir péptidos de 8 a 11 aminoácidos con una conformación extendida y flexible. Los extremos de las hendiduras de unión a péptidos de clase I están cerrados de forma que los péptidos grandes no pueden unirse<sup>7</sup>.

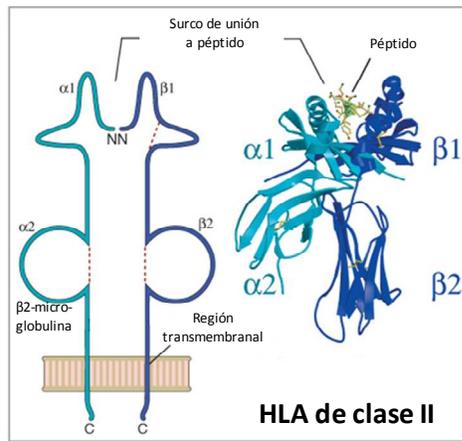


**Figura 2. Moléculas HLA de clase I.** El diagrama de la izquierda ilustra las diferentes regiones de la molécula HLA de clase I (no en escala). Las moléculas HLA clase I están compuestas de una cadena polimórfica  $\alpha$  unida no covalentemente a una  $\beta 2$ -microglobulina no polimórfica. Se observa que los dominios  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  contienen un sitio de unión a péptido; el dominio  $\alpha 3$  está unido no covalentemente a  $\beta 2m$ ; una región hidrofóbica que atraviesa la membrana; y una pequeña cola intracitoplasmática carboxilo terminal. El diagrama de cintas (derecha) muestra la estructura de la porción extracelular de una molécula HLA-B\*27 unida a un péptido (cristalografía de rayos X). Tomada de Abul K. Abbas & Andrew H. Litchman. Inmunología Celular y Molecular. Elsevier Imprint, Madrid, España (2004).

Los dominios  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  contienen los sitios de unión a péptidos producidos durante el procesamiento de antígenos; a estos dominios se les llama dominios fijadores de péptido. El dominio  $\alpha 3$  tiene una estructura característica que también existe en las inmunoglobulinas, este segmento es altamente conservado en todas las moléculas de clase I. El exón 5 codifica para la región transmembranal de la molécula y los exones 6 y 7 para la región citoplásmica de la proteína. En el extremo carboxilo terminal del dominio  $\alpha 3$  hay una extensión de aproximadamente 25 aminoácidos hidrofóbicos que atraviesa la bicapa lipídica de la membrana plasmática. Inmediatamente después existen unos 30 residuos localizados en el citoplasma en los que se incluye un grupo de aminoácidos básicos que interactúan con la cabeza de los fosfolípidos de la cara interna de la bicapa lipídica y que anclan las moléculas de HLA en la membrana plasmática<sup>7</sup>.

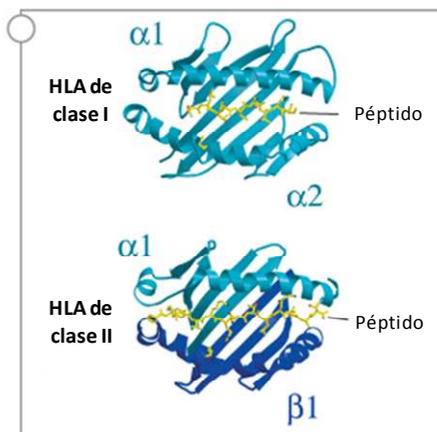
El gen de la  $\beta 2$ -microglobulina se encuentra en el cromosoma 15. La  $\beta 2$ -microglobulina interactúa de forma no covalente con el dominio  $\alpha 3$ , es estructuralmente homóloga a un dominio Ig y no varía en todas las moléculas de clase I.

En cuanto a las moléculas de clase II, los genes A tienen cinco exones y los genes B seis exones. En ambos genes el exón 1 contiene la región 5'UT y la secuencia que contiene el péptido señal; el exón 2 codifica para el dominio  $\alpha 1$  (genes A) o el  $\beta 1$  (genes B), estos dominios contribuyen a la región de unión del péptido; el exón 3 codifica para los dominios  $\alpha 2$  y  $\beta 2$ ; los exones restantes codifican para el péptido de conexión, la región transmembranal y citoplásmica<sup>7</sup>.

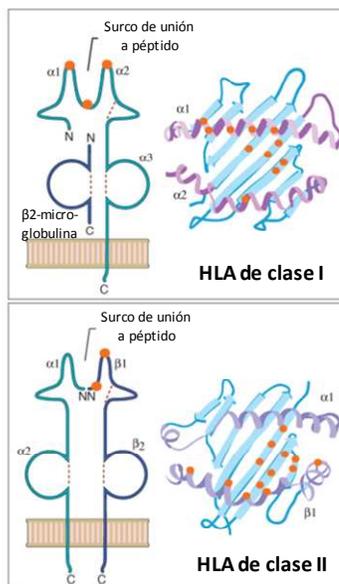


**Figura 3. Moléculas HLA clase II.** La figura de la izquierda ilustra las diferentes regiones de una molécula MHC clase II. Las moléculas MHC clase II están compuestas por una cadena polimórfica  $\alpha$  unida no covalentemente a una cadena polimórfica  $\beta$ . Ambas cadenas están glicosiladas (no se muestran los residuos de carbohidratos). El diagrama de listón (derecha) muestra la estructura de la porción extracelular de una molécula HLA-DR1 unida a un péptido (cristalografía de rayos X). Tomada de Abul K. Abbas & Andrew H. Litchman. *Inmunología Celular y Molecular*. Elsevier Imprint, Madrid, España (2004).

Las moléculas MHC clase II están compuestas por dos cadenas polipeptídicas asociadas de forma no covalente, una cadena alfa de 32 a 34kDa y una cadena beta de 29 a 32kDa (Figura 3). A diferencia de las moléculas clase I, ambas cadenas están codificadas por genes polimórficos del MHC. Los segmentos amino terminales  $\alpha 1$  y  $\beta 1$  de las cadenas clase II interactúan para formar la hendidura de unión a péptidos, que es similar desde el punto de vista estructural a la las moléculas clase I (Figura 4). Cuatro hebras del suelo de la hendidura y una de las hélices están formadas por  $\alpha 1$ , mientras que las otras cuatro hebras del suelo y la segunda hélice están formadas por  $\beta 1$ . Los residuos variables están localizados en  $\alpha 1$  y  $\beta 1$ , en el interior y alrededor de la hendidura de unión a péptidos. En las cadenas clase II la mayor parte de los polimorfismos se encuentran en la cadena beta (Figura 5). El sitio de unión a péptidos se encuentra abierto en sus extremos, de manera que pueden entrar péptidos de 30 residuos o más<sup>7</sup>.



**Figura 4. Unión del péptido a las moléculas HLA.** Se muestran las estructuras cristalinas de las moléculas HLA y el péptido (en amarillo) descansando sobre el suelo de las hendiduras o surcos. El péptido muestra residuos de reconocimiento a los receptores TCR de los linfocitos T. La molécula de clase I que se observa es HLA\*A02 y la molécula de clase II es HLA\*DR1. Se observa que la hendidura de la molécula de clase I está cerrada, mientras que la de clase II se encuentra abierta. Como resultado las moléculas de clase II acomodan péptidos más grandes que las de clase I. Tomada de Abul K. Abbas & Andrew H. Litchman. *Inmunología Celular y Molecular*. Elsevier Imprint, Madrid, España (2004).



**Figura 5. Residuos polimórficos de las moléculas HLA.** Los residuos polimórficos de las moléculas HLA de clase I y II (que se muestran en puntos naranjas) se localizan en las hendiduras de unión a péptidos y en las hélices alfa alrededor de las hendiduras. En la molécula de clase II representada (HLA-DR), básicamente todo el polimorfismo se encuentra en la cadena beta. Sin embargo, otras moléculas de clase II presentan diversos grados de polimorfismo en la cadena alfa y normalmente mucho más en la cadena beta. Tomada de Abul K. Abbas & Andrew H. Litchman. *Inmunología Celular y Molecular*. Elsevier Imprint, Madrid, España (2004).

### Nomenclatura de los genes HLA

En el sistema HLA los genes se designan por letras mayúsculas y un número. En primer lugar se indica la familia de alelos (HLA), seguido de un guión (-) y el locus o gen (A, B, C, DR1, DQ, etc.). Las letras se denotan en mayúscula y los dígitos se separan con un asterisco (\*). Todos los alelos reciben por lo menos un nombre con cuatro dígitos, los nombres con seis u ocho dígitos son asignados cuando es necesario. El largo del nombre del alelo depende de la secuencia del alelo y de su parecido con otros alelos<sup>9</sup>.

Los primeros dos dígitos describen el tipo o grupo de alelo al que pertenecen, que corresponde generalmente a su tipificación serológica. El tercer y cuarto dígitos son usados para designar los subtipos o alelos en específico (según sea el caso). Estos dos números son designados en el orden en que las secuencias de DNA fueron determinadas o descubiertas. Los alelos que difieren en los primeros cuatro dígitos son diferentes en una o más substituciones en el alelo que cambia la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada. Los alelos que difieren sólo por una substitución sinónima (no codificante) en un nucleótido dentro de la secuencia codificante son distinguidas con el uso del quinto y sexto dígito. Los alelos que sólo difieren por polimorfismos en la secuencia en los intrones o en las regiones sin traducir 5' o 3' que flanquean los exones e intrones son distinguidas con el uso del séptimo y octavo dígito<sup>9</sup>.

Además de la combinación de números única de cada alelo existen sufijos opcionales que se pueden añadir al alelo indicando su estado de expresión. Los alelos que no se han visto expresados se les añade el sufijo N (*null*). Los alelos que tienen una expresión diferente pueden tener los sufijos L, S, C, A y Q. El sufijo L (*low*) es usado para indicar que un alelo tiene una baja expresión en la superficie celular comparada a la expresión normal de otros alelos. El sufijo 'S' (*secreted*) es usado para denotar un alelo

que tiene una proteína que es expresada como una proteína soluble secretada y que no es presentada en la superficie celular. El sufijo C (*cytoplasm*) indica un producto de un alelo presente en el citoplasma pero nunca expresado en la superficie celular. El sufijo A (*aberrant*) indica que la expresión de un alelo es aberrante, en la que existe la duda de que la proteína es realmente expresada. Y finalmente el sufijo Q (*questionable*) se usa cuando la expresión de un alelo se cuestiona dado que tiene una mutación que previamente se ha observado afecta los niveles normales de expresión. A marzo del 2007, ningún alelo ha sido nombrado con los sufijos C o A<sup>9</sup>.

Tabla 1. Nomenclatura HLA

Nomenclatura	Significado
<b>HLA</b>	La región HLA y prefijo para un gene HLA.
<b>HLA-A</b>	Un locus en particular
<b>HLA-A*02</b>	Un grupo de alelos del gen A
<b>HLA-A*0201</b>	Un alelo HLA específico o subtipo de alelo.
<b>HLA-A*0201N</b>	Un alelo nulo
<b>HLA-A*020102</b>	Un alelo que difiere por una mutación sinónima
<b>HLA-A*02010102</b>	Un alelo que contiene una mutación fuera de la región codificante
<b>HLA-A*02010102L</b>	Un alelo que codifica para una proteína con una expresión significativamente baja, donde la mutación se encuentra fuera de la región codificante
<b>HLA-A*02010102S</b>	Un alelo que codifica una proteína que es expresada sólo como molécula secretada.
<b>HLA-A*0201Q</b>	Un alelo que contiene una mutación que se ha visto afecta la expresión en la superficie celular, pero no se ha confirmado y se mantiene como cuestionable.
<b><i>HLA-A0201</i></b>	Cuando está escrito en cursivas indica una proteína específica y no un locus o gen.

Tomada de Nomenclatura HLA. Anthony Nolan Research Institute. [www.anthonynolan.org.mx](http://www.anthonynolan.org.mx). 2007.

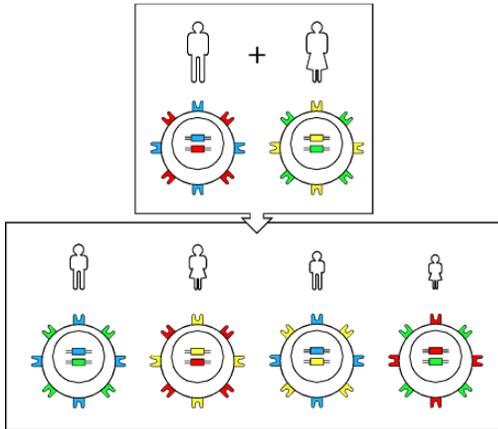
### Expresión y Regulación de los genes HLA

Los genes de clase Ia (HLA-A, B y C; "a", nomenclatura antigua para genes clásicos o de clase I) se expresan en la mayoría de las células somáticas adultas. Sin embargo, hay algunas excepciones como: neuronas, células del páncreas exócrino, células del miocardio, espermatozoides en ciertas etapas del desarrollo, ciertas células de la placenta, óvulos no fertilizados y células de embriones recién formados. Entre todas las células somáticas, los linfocitos T y B expresan niveles altos de moléculas clase Ia con relación a otras moléculas. La expresión puede aumentar o disminuir por el estímulo de factores como las infecciones virales y citocinas<sup>7</sup>.

La expresión de los genes Ia está regulada por secuencias "corriente arriba" de la región codificante. Estas secuencias cortas, llamadas motivos o cajas, son sitios que se unen a las proteínas (factores de transcripción) encargadas de iniciar la transcripción de DNA en RNA<sup>7</sup>.

Los genes HLA se heredan en bloque en forma de haplotipos (término que proviene de haploide), por lo que cada individuo tiene una combinación de genes que se segregaron del padre y otra combinación de la madre. La recombinación puede existir a muy bajos niveles (<1%). Los genes HLA se expresan de forma codominante en cada individuo, es decir, cada persona expresa todos los alelos HLA heredados de ambos padres. Para los individuos, esto eleva al máximo el número de moléculas HLA disponibles para unirse a péptidos para su presentación a los linfocitos T (Figura 6). En los seres humanos determinados alelos HLA presentes en diferentes locus se heredan conjuntamente con más frecuencia de lo que se

espera por una asignación al azar, este es un fenómeno que se denomina desequilibrio de ligamiento<sup>1</sup> (*linkage disequilibrium*).



**Figura 6. Segregación de los genes HLA en haplotipos.** Los genes HLA se segregan en forma de bloque (haplotipo), esto da como resultado que cada uno de los hijos tenga una de las posibles combinaciones de los haplotipos paternos. De igual manera, todos los alelos HLA heredados son expresados de forma codominante. Tomada de Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M. & Sclomchik, M. Immunobiology. Garland Science, (2001).

### Polimorfismo Genético de los genes HLA de clase I

Los genes HLA de clase I son los genes más polimórficos en el genoma humano<sup>1,10</sup>. Una situación que se repite en algunos genes polimórficos es que uno o dos alelos se encuentran con mayor frecuencia y los demás alelos se encuentran con poca frecuencia. Sin embargo, el polimorfismo de los loci del HLA se caracteriza por la enorme cantidad de alelos de cada locus y porque muchos de estos alelos se encuentran con frecuencias similares. Según la base de datos IMGT/HLA<sup>11</sup> al mes de marzo del 2010 se conocen 965 alelos de HLA-A, 1543 alelos de HLA-B (siendo este el más polimórfico del genoma humano) y 626 alelos de HLA-C (Tabla 2).

**Tabla 2. Polimorfismos HLA; Base de datos IMGT/HLA<sup>11</sup>**

		Número de alelos HLA										
		Alelos HLA clase I										3,249
		Alelos HLA clase II										1,198
		Alelos HLA totales										4,447
		Otros alelos no HLA										109
		HLA clase I										
Gen		A	B	C	E	F	G					
Alelos		965	1,543	626	9	21	46					
Proteínas		718	1,230	464	3	4	15					
Nulos		53	43	11	0	0	2					
		Pseudogenes HLA Clase I										
Gen		H	J	K	L	P	U	T	V	W	X	
Alelos		12	9	6	5	4	0	0	3	0	0	
Proteínas		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Nulos		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		HLA clase II										
Gen		DRA	DRB	DQA1	DQB1	DPA1	DPB1	DMA	DMB	DOA	DOB	
Alelos		3	855	35	107	28	138	4	7	12	9	

Proteínas	2	657	26	78	16	120	4	7	3	4
Nulos	0	10	1	1	0	3	0	0	1	0
<b>HLA clase II – Alelos DRB</b>										
Gen	DRB1	DRB2	DRB3	DRB4	DRB5	DRB6	DRB7	DRB8	DRB9	
Alelos	762	1	52	14	19	3	2	1	1	
Proteínas	591	0	42	8	16	0	0	0	0	
Nulos	5	0	0	3	2	0	0	0	0	
<b>Otros alelos no HLA</b>										
Gen	MICA	MICB	TAP1	TAP2						
Alelos	68	30	7	4						
Proteínas	57	19	5	4						

La variabilidad de los loci de HLA de clase II se localiza principalmente en el exón 2, mientras que en los genes de clase I el polimorfismo radica en los exones 2 y 3. Además, dentro de esos exones la variabilidad se concentra principalmente en los sitios de unión al péptido, mientras que el resto de la secuencia permanece constante (Figura 5)<sup>7</sup>.

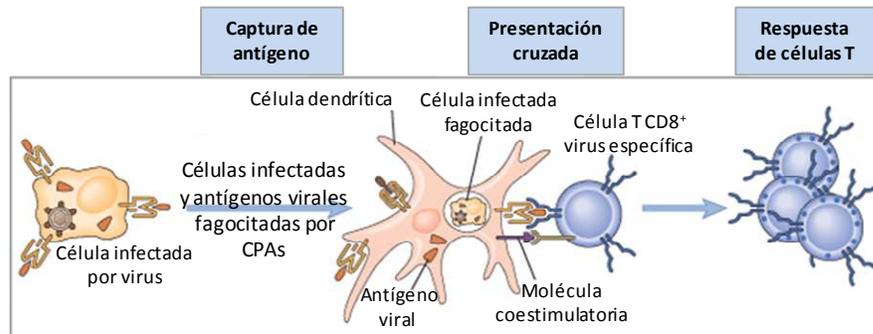
Debido a la poligenia del sistema de genes HLA, cada persona expresará por lo menos tres diferentes moléculas HLA clase I presentadoras de antígeno y tres (o a veces cuatro) diferentes moléculas HLA clase II en sus células.

### **Procesamiento de Antígenos presentados por MHC clase I y reconocidos por linfocitos T CD8<sup>+</sup>**

Todas las células nucleadas pueden presentar péptidos asociados al HLA de clase I, estos péptidos son derivados de antígenos proteicos citosólicos a los linfocitos T CD8<sup>+</sup>. La mayoría de los antígenos proteicos extraños que están presentes en el citosol fueron sintetizados en el interior celular, como las proteínas virales presentes en las células infectadas por virus y las proteínas mutantes en células tumorales. Todas las células son sensibles a la infección por virus, por lo que es importante que el sistema inmune pueda reconocer los antígenos citosólicos de cualquier célula. Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> diferenciados (que funcionan con células citotóxicas, CTLs), pueden reconocer péptidos o epítomos asociados al MHC clase I y destruir cualquier célula que exprese antígenos extraños. La expresión ubicua de las moléculas de clase I permite que los CTLs restringidos por la clase I reconozcan y eliminen cualquier tipo de célula infectada por virus o tumoral. Los antígenos fagocitados también pueden ser reconocidos por las CTLs, debido a que algunos antígenos proteicos se pueden transportar desde las vesículas fagocíticas hacia el citosol<sup>7</sup>.

Para que se activen para proliferar y diferenciarse hacia CTLs efectoras, los linfocitos CD8<sup>+</sup> vírgenes deben reconocer los antígenos peptídicos asociados a la clase I y también deben detectar moléculas estimuladoras sobre las células presentadoras de antígeno (CPA, *Antigen Presenting Cell*) o señales emitidas por los linfocitos T CD4<sup>+</sup> cooperadores. Las células tumorales o infectadas por virus son capturadas por las CPAs, estas presentan los antígenos virales o tumorales a los linfocitos CD8<sup>+</sup> vírgenes para iniciar una respuesta primaria (Figura 7). Este proceso se denomina presentación cruzada o

activación cruzada, para indicar que una CPA puede presentar antígenos de otras células (células tumorales o infectadas por virus) y activar linfocitos T específicos para esos antígenos<sup>7</sup>.



**Figura 7. Presentación cruzada de antígenos a los linfocitos T CD8<sup>+</sup>.** Las células infectadas por virus son capturadas por células presentadoras de antígeno (CPAs, en especial por células dendríticas) y los antígenos virales (epítopos) son procesados y se presentan asociados a moléculas de HLA de clase I de las APC. Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> reconocen los antígenos virales y se activan las moléculas coestimuladoras de las CPAs y del linfocito T. Como resultado de esta sinapsis inmunológica se activan los linfocitos específicos T CD8<sup>+</sup> específicos contra esos antígenos virales. Tomada de Abul K. Abbas & Andrew H. Litchman. Inmunología Celular y Molecular. Elsevier Imprint, Madrid, España (2004).

Los péptidos asociados al HLA de clase I se producen por la degradación proteolítica de proteínas citosólicas, el transporte de los péptidos generados en el retículo endoplásmico y la unión a las moléculas HLA recién sintetizadas. El primer paso para que se dé el procesamiento antigénico es que existan proteínas antigénicas en el citosol. Estas proteínas extrañas son degradadas en péptidos más pequeños. El principal mecanismo de generación de péptidos a partir de los antígenos proteicos citosólicos es la proteólisis llevada a cabo por el proteasoma.

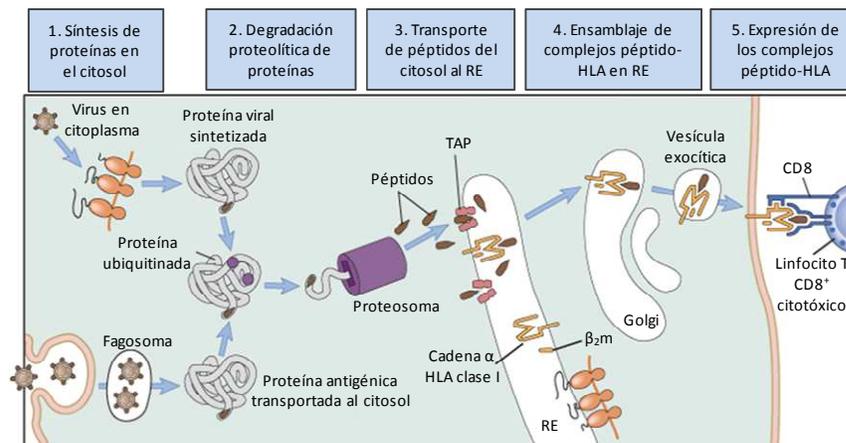
El proteasoma es un complejo enzimático multiproteico con un amplio espectro de actividades proteolíticas. Una forma de proteasoma de 700kD aparece como un cilindro compuesto de un conjunto apilado de anillos internos y dos anillos externos, cada uno de ellos compuesto por siete subunidades. Otro proteasoma mayor (1500kD), es importante para generar péptidos de unión a las moléculas MHC clase I y tiene una estructura formada por varias subunidades adicionales de 700kD que regulan su capacidad proteolítica. Las subunidades catalíticas de los proteasomas de 1500kD (denominadas LMP-2 y LMP-7) se codifican por los genes del MHC. Los péptidos que se van a degradar son ubiquitinados (unión covalente de moléculas de un pequeño péptido llamado ubiquitina). Después de su ubiquitinación, las proteínas se despliegan (pierden conformación secundaria y terciaria), se eliminan las ubiquitininas y se cortan las proteínas en pequeños péptidos en el proteasoma<sup>7</sup>.

Cuando las células están en presencia de INF $\gamma$  se produce un aumento en la transcripción y síntesis de las subunidades LMP-2 y LMP-7 del proteasoma. Esto da un cambio en la especificidad de sustrato del proteasoma, de modo que los péptidos producidos tienen una longitud de 6-30 aminoácidos con carboxilo terminal básicos o hidrofóbicos. Ambas características son típicas de los péptidos que se transportan a la vía de clase I y que se unen a las moléculas HLA de clase I. Este es un mecanismo mediante el cual esta citocina potencia la presentación antigénica<sup>7</sup>.

Los péptidos generados por el proteasoma en el citosol se transportan mediante un transportador especializado hacia el retículo endoplásmico (RE), donde hay moléculas del HLA de clase I recién sintetizadas para unirse a los péptidos. Los genes del MHC codifican para las dos cadenas de un

heterodímero denominado transportador asociado al procesamiento antigénico (TAP). Curiosamente estos genes se encuentran cerca de los genes LMP-2 y -7, y la síntesis de la proteína TAP también se estimula mediante INF- $\gamma$ . La proteína TAP se encuentra principalmente en el RE, donde interviene en el transporte activo dependiente de ATP de los péptidos desde el citosol hacia la luz del RE. En el lado luminal de la membrana del RE, la proteína TAP se une de manera no covalente a las moléculas del MHC clase I recién sintetizadas mediante una proteína de unión llamada tapasina. Cuando el péptido entra en el RE a través de TAP, el péptido se fija a los sitios de la molécula clase I. A continuación, el complejo péptido-HLA clase I se libera de la tapasina y puede salir del RE y transportarse a la superficie celular (Figura 8).

Los complejos péptido-HLA de clase I estables se mueven a través del complejo de Golgi y se transportan hacia la superficie celular mediante vesículas exocíticas<sup>7</sup>.



**Figura 8. Vía de procesamiento antigénico de clase I.** Las etapas del procesamiento de las proteínas citosólicas corresponden a las que se describen en el texto. (1) Los péptidos que se presentan unidos a las moléculas de MHC clase I derivan de proteínas citosólicas, la mayoría de las cuales se sintetizan endógenamente en las células, las proteínas también se pueden derivar de microorganismos fagocitados. (2) Las proteínas del citosol son procesadas en el proteosoma (3) y los péptidos son transportados al retículo endoplásmico mediante la proteína transportadora TAP; (4) en el retículo endoplásmico se unen a las moléculas de MHC clase I; (5) después el complejo MHC-péptido se transporta a la superficie celular mediante vesículas exocíticas. Tomada de Abul K. Abbas & Andrew H. Litchman. *Inmunología Celular y Molecular*. Elsevier Imprint, Madrid, España (2004).

### Unión de péptidos a las moléculas HLA

La unión de péptidos a las moléculas del HLA es una interacción no covalente mediada por residuos tanto en los péptidos como en las hendiduras de las moléculas HLA. Los antígenos proteicos se fragmentan por acción proteolítica en las células presentadoras de antígeno para dar lugar a los péptidos que se unirán y serán presentados por las moléculas HLA. Estos péptidos se fijan a las hendiduras de las moléculas HLA con una conformación extendida. Una vez unidos, los péptidos y sus moléculas de agua asociadas rellenan las hendiduras creando amplios contactos con los residuos de aminoácidos que forman las hebras beta del suelo y las hélices alfa de los lados de la hendidura. En la mayoría de las moléculas HLA, las hebras beta del suelo de la hendidura contienen "bolsillos" (pockets). Los residuos de aminoácidos de un péptido pueden contener cadenas laterales que encajan en estos bolsillos y se unen a los aminoácidos complementarios en la molécula HLA, casi siempre mediante interacciones hidrofóbicas. Estos residuos del péptido se denominan residuos de anclaje porque contribuyen en la mayoría de las interacciones favorables de la unión, es decir, anclan el péptido en la hendidura de la molécula HLA. Los residuos de anclaje pueden localizarse en el centro o en los extremos

del péptido. Cada péptido que se fija a la molécula HLA suele contener uno o dos residuos de anclaje y esto permite, en teoría, una mayor variabilidad en el resto de residuos del péptido, que son reconocidos por linfocitos T específicos<sup>7</sup>.

No todos los péptidos utilizan residuos de anclaje para unirse a la molécula HLA, especialmente en las moléculas clase II. Las interacciones específicas de los péptidos con los lados helicoidales alfa de las hendiduras del HLA contribuyen también a la fijación formando puentes de hidrógeno o interacciones polares. Los péptidos que se unen a clase I contienen normalmente aminoácidos básicos o hidrofóbicos en sus extremos carboxílicos que contribuyen también a la interacción.

Como la mayoría de los residuos que se encuentran en el interior y alrededor de la hendidura de unión a péptidos de las moléculas del HLA son polimórficos (es decir, difieren en los diferentes alelos HLA), diferentes alelos favorecen la unión de distintos péptidos.

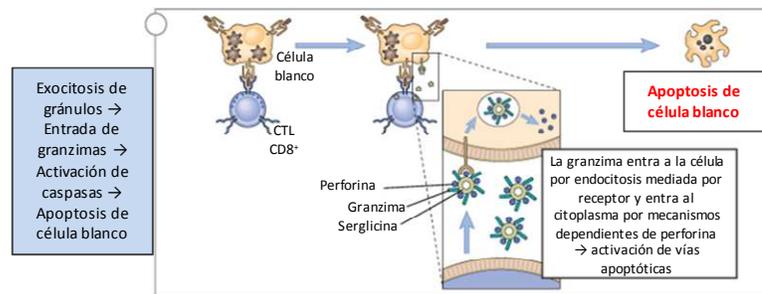
Una porción del péptido fijado queda expuesta en el extremo superior abierto de la hendidura de la molécula HLA y las cadenas laterales de aminoácidos de esta porción del péptido son reconocidos por los receptores antigénicos de los linfocitos T específicos. El mismo TCR del linfocito interactúa con los residuos polimórficos de las hélices alfa de la molécula HLA. Así, los aminoácidos del péptido antigénico y de las moléculas HLA contribuyen al reconocimiento antigénico por los linfocitos T, siendo el péptido responsable de la especificidad fina del reconocimiento antigénico y contribuyendo los residuos del HLA a la restricción del HLA de los linfocitos T<sup>7</sup>.

### **Mecanismos de destrucción de las células infectadas mediados por CTLs**

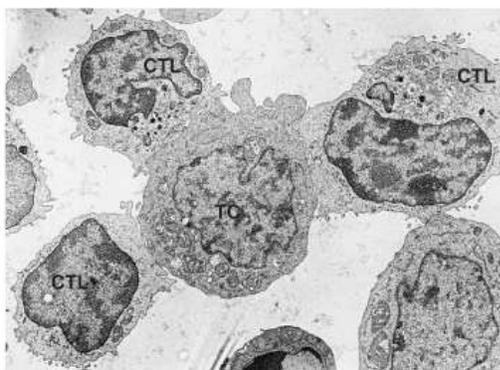
La muerte celular mediada por CTLs es específica de antígenos y dependiente de contacto<sup>7</sup>. Los CTLs destruyen a las células infectadas que expresan el mismo antígeno asociado a la molécula HLA de clase I que desencadena la proliferación y diferenciación de los mismos. Esta especificidad de la función efectora de los CTLs asegura que las células no infectadas no sean destruidas por los CTLs que reaccionan contra las células infectadas. Esta alta especificidad destructora se debe a que la actividad de los CTLs está desencadenada por el contacto físico con sus blancos y a que se dirige hacia objetivos determinados. El CTL se une a la célula blanco usando su receptor antigénico y moléculas accesorias, como CD8 y la integrina LFA-1. Para reconocerse eficazmente por los CTLs, las células blanco deben expresar moléculas HLA de clase I unidas a su péptido y la molécula de adhesión intercelular-1 (el ligando principal de LFA-1). A los pocos minutos de haberse dado el reconocimiento CTL-célula blanco, la célula blanco sufre cambios que la inducen a morir por apoptosis. El mecanismo principal de la citólisis mediada por CTLs es la liberación de las proteínas citotóxicas de los gránulos en la célula blanco<sup>7</sup>. Cuando el reconocimiento se lleva a cabo, el citoesqueleto de los CTLs se reorganiza de modo que el centro que organiza los microtúbulos de la célula se mueve hacia el área del citoplasma más cercana al contacto con la célula blanco. Los gránulos citoplásmicos de las CTLs se concentran en esta misma región y la membrana de los gránulos se fusiona con la membrana celular. La fusión de las membranas da lugar a un exocitosis del contenido de los gránulos de la CTL sobre la superficie de la célula blanco. Las dos proteínas de los gránulos más importantes para el efecto citotóxico son la

perforina y granzima. La perforina es una proteína que forma poros y que está presente en forma de monómero en los gránulos de la CTL. Cuando se excita de los gránulos, el monómero de perforina se polimeriza formando un canal acuoso en la membrana celular de la célula blanco. La granzima B, la más importante de estas enzimas, rompe proteolíticamente y por tanto, activa las caspasas que a su vez escinden otros sustratos e inducen la apoptosis de la célula blanco. Además, si se crea un número suficiente de poros de perforina en la membrana de la célula blanco, la célula será incapaz de eliminar iones y agua. La célula blanco muere en parte debido a que la entrada de agua provoca un desequilibrio osmótico y en parte a que la alta concentración de ión calcio que penetra en la célula puede desencadenar la apoptosis<sup>7</sup> (Figura 9). En la figura 10 se puede observar tres linfocitos T CD8<sup>+</sup> de una línea celular clonada para HLA-A\*02 que se unen a una célula blanco (que expresa HLA-A\*02) a un minuto de mezclar CTLs y células blanco, se puede observar que la CTL de la parte superior izquierda tiene sus gránulos citotóxicos se han redistribuido a la célula blanco.

Los CTLs utilizan otro mecanismo de destrucción mediado por el ligando de Fas (FasL) que se une a su proteína blanco Fas, la cual se expresa en muchos tipos de células. Esta interacción también da lugar a la activación de las caspasas y la apoptosis de las células blanco<sup>7</sup>.



**Figura 9. Mecanismos de la lisis mediada por CTLs.** Los CTLs destruyen las células blanco mediante dos mecanismos principales. El mecanismo del diagrama explica la exocitosis de los gránulos que contienen perforina y granzima de las CTLs. La perforina se polimeriza en formando canales acuosos en la célula blanco dejando entrar granzima e induciendo apoptosis de la célula blanco. Tomada de Abul K. Abbas & Andrew H. Litchman. *Inmunología Celular y Molecular*. Elsevier Imprint, Madrid, España (2004).



**Figura 10. Formación del conjugado entre CTL y una célula blanco.** Tres CTLs de una línea celular clonada para HLA-A\*02 se unen a una célula blanco (TC) que expresa HLA-A\*02 un minuto después de mezclar CTLs y células blanco. Se observa que la CTL de la parte superior izquierda se le han redistribuido los gránulos hacia la célula blanco. Tomada de Abul K. Abbas & Andrew H. Litchman. *Inmunología Celular y Molecular*. Elsevier Imprint, Madrid, España (2004).

# Virus de la Inmunodeficiencia Humana

## Introducción y Origen

Hace más de veinte años se identificó al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) como el agente etiológico del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). El blanco principal del VIH son células que expresan en la superficie la molécula CD4, principalmente linfocitos T y sus precursores. El VIH también es capaz de infectar monocitos, eosinófilos, macrófagos, células dendríticas y de la microglia en el sistema nervioso central<sup>12;13</sup>. La infección por el VIH provoca un deterioro progresivo del sistema inmune y finalmente las manifestaciones clínicas del SIDA.

La primera evidencia de que el SIDA es causado por un retrovirus surgió en 1983, cuando Barré-Sinoussi, Chermann y Montaigner, en el Instituto Pasteur, recuperaron un virus que contenía una enzima transcriptasa reversa de un ganglio linfático de un hombre con linfadenopatía persistente<sup>12</sup>. Levy y sus colaboradores confirmaron esta hipótesis al describir un retrovirus asociado al SIDA<sup>14</sup>. Fue hasta el año 1986 que el Comité Internacional para Taxonomía de los Virus recomendó dar el nombre Virus de la Inmunodeficiencia Humana o VIH al agente causal del SIDA<sup>15</sup>.

La propagación y replicación persistente del VIH conduce a una inmunodeficiencia grave ocasionada por una reducción gradual del número de células T (cT) CD4<sup>+</sup>. Esto resulta en la aparición de múltiples infecciones oportunistas y tumores malignos<sup>16</sup>. La gravedad de la enfermedad está determinada por el balance entre la virulencia del microorganismo y la resistencia del hospedero<sup>17</sup>.

En la mayoría de los casos, durante las primeras seis semanas después de la exposición, los individuos infectados desarrollan un síndrome agudo, caracterizado por valores elevados de viremia (carga viral, CV) en la sangre periférica y síntomas parecidos a un resfriado<sup>18</sup>. Posteriormente se monta una respuesta inmune específica contra el VIH que provoca un descenso importante en la viremia plasmática<sup>19</sup>. A continuación los individuos entran en una etapa asintomática clínicamente estable que, dependiendo de factores inmunológicos, virológicos y genéticos, puede durar un número variable de años. En esta etapa las concentraciones del virus en la sangre periférica son relativamente bajas, sin embargo, la replicación del virus e infección de cT CD4<sup>+</sup> son procesos dinámicos, que son equilibrados por una tasa igualmente dinámica de depuración viral, muerte de células infectadas y abastecimiento de nuevas cT CD4<sup>+</sup>, este equilibrio mantiene niveles plasmáticos relativamente estables de viremia y de cT CD4<sup>+</sup>. Sin embargo, esta viremia plasmática reducida pero persistente provoca la reducción gradual de las cT CD4<sup>+</sup>, que invariablemente, en poco o mucho tiempo, conduce a SIDA.

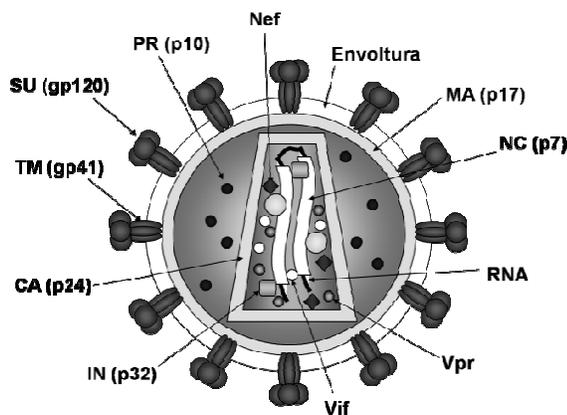
## Clasificación Taxonómica y Estructura

El Virus de la Inmunodeficiencia Humana es miembro de la familia Retroviridae perteneciente al género Lentivirus<sup>20</sup>. Los retrovirus tienen las siguientes características: a) un genoma de RNA, b) una estructura viral organizada por tres genes poliprotéicos llamados grupo antígeno específico (*gag*), polimerasa (*pol*) y envoltura (*env*), c) un ciclo de replicación en donde se incorpora el genoma viral dentro del material genético del hospedero mediante una transcripción reversa, y d) genoma altamente variable como resultado de mutaciones, dinámica de replicación notable y recombinación lo que causa que se puedan

seleccionar aquellas cuasiespecies virales con mejor *fitness* (adecuación) dado las presiones de selección del hospedero. Los lentivirus además de los genes estructurales de los retrovirus, se caracterizan por presentar una compleja combinación de genes accesorios o genes no estructurales y de tener largos periodos de latencia clínica durante la infección<sup>21</sup>.

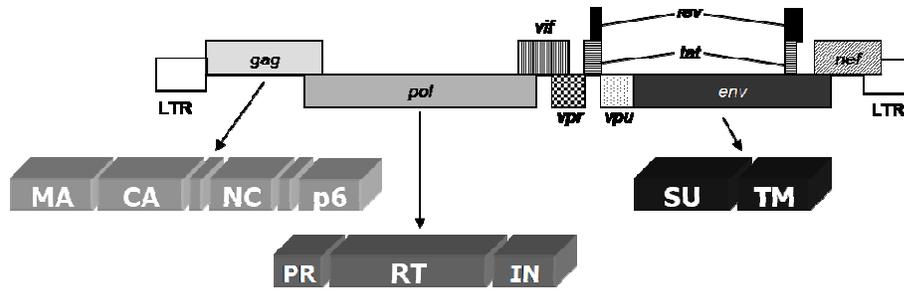
El VIH es un virus envuelto. Posee cerca de 72 espículas en su superficie, cada espícula consta de 6 glicoproteínas (3 gp41 y 3 gp120)<sup>22</sup>. Estas glicoproteínas se derivan de un solo precursor (gp160) codificado en el gen *env*. La partícula es icosaédrica y mide 110nm de diámetro. La glicoproteína transmembranal gp41 es una molécula que interactúa no covalentemente con la glicoproteína gp120, formando así una estructura oligomérica de carácter trimérico (Figura 11).

La forma y la integridad de los viriones están dadas por los productos del gen *gag*. La matriz está compuesta por la proteína p17 de *gag*, la cual está sujeta a la cara interna de la membrana lipídica. Una segunda proteína de *gag* llamada p24 genera la forma cónica característica de la cápside. Dos proteínas más de *gag* conocidas como p7 y p6 generan la nucleocápside en donde se encuentra el genoma viral, el cual está compuesto por dos cadenas simples positivas de RNA. La cápside contiene toda la información genética y proteínas necesarias para la replicación viral, dentro de ella se encuentran dos copias de RNA genómico (dentro de la nucleocápside), un RNA de transferencia reclutado durante el proceso de liberación del virión y tres enzimas llamadas transcriptasa reversa (RT), integrasa (IN) y proteasa (PR), codificadas por el gen *pol*<sup>21</sup>.



**Figura 11. Virus de la inmunodeficiencia humana.** El VIH es un virus envuelto. La glicoproteína transmembranal gp41 interactúa no covalentemente con la glicoproteína gp120 en la superficie del virión. La matriz está compuesta por la proteína p17 de *gag*. p24 genera la forma cónica característica de la cápside. p7 y p6 generan la nucleocápside en donde se encuentra el genoma viral, el cual está compuesto por dos cadenas simples positivas de RNA. En la cápside se encuentran el genoma viral (2 copias de RNA) y las proteínas necesarias para la replicación viral (RT, IN y PR), además contiene un RNA de transferencia reclutado durante el proceso de liberación del virión. El virión puede contener proteínas de superficie como el receptor CD4, moléculas HLA clase I y II, entre otros. Tomada de Coffin, J.M., Hughes, S.H. & Varmus, H. E. *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview (NY) (1997).

El genoma de RNA del VIH tiene una longitud aproximada de 9.2kb y una organización básica de las secuencias de RNA característica de todos los retrovirus conocidos (Figura 12).



**Figura 12. Genoma del VIH.** Organización del genoma viral de ~9Kb en donde se observan los LTRs, los tres genes poliprotéicos (gag, pol y env) y las proteínas accesorias (Vif, Vpr, Vpu, Rev, Tat, Nef). Tomada de B. Matija Peterlin & Didier Trono. Hide, shield and strike back: how HIV-infected cells avoid immune eradication. Nature Reviews 3, 97-107 (2003).

Los LTRs (*long terminal repeats*; repeticiones terminales largas) son regiones que se encuentran en ambos extremos del genoma viral. Los LTRs regulan la integración del virus en el genoma hospedero, la expresión de los genes y la replicación viral. En la tabla 3 se resumen las funciones de los genes accesorios<sup>23</sup>.

**Tabla 3. Genes del VIH y sus funciones**

Gen	Función
<b>gag</b>	Poliproteína procesada por proteasa (PR). Proteínas de matriz (MA ó p17), proteínas de cápside (CA ó p24), proteínas de nucleocápside (NC ó p7) y p6.
<b>pol</b>	Enzimas: proteasa (p10 ó PR), transcriptasa inversa (RT) y la RNasa H (p66/51) e integrasa (IN ó p32). Todas procesadas por PR.
<b>env</b>	Proteína de envoltura gp160. Proteínas de envoltura: gp41 y gp120 que interactúan con CD4 y CCR5/CXCR4 de la célula. Intervienen en la infección viral; contiene RRE en donde se une Rev.
<b>vif</b>	Factor viral infeccioso. Reduce los efectos inhibitorios de factores celulares, dando lugar a complejos de RT más estables; regula la capacidad de infección de las partículas virales. Provoca degradación proteosómica de APOBEC3G, factor intracelular restrictivo hacia el VIH.
<b>vpr</b>	Proteína viral R (p15). Favorece la infección de macrófagos y la importación del genoma viral al núcleo. Arresta el ciclo celular en G <sub>2</sub> .
<b>tat</b>	Activador transcripcional (p14), necesario para la elongación de la transcripción viral (en presencia de Ck1 y Cdk9). Contiene sitio de unión a TAR.
<b>rev</b>	Proteína (p19) reguladora de la expresión de genes virales, favorece la salida del núcleo de transcritos de RNA no procesados o con procesamiento sencillo (mediante unión a RRE).
<b>vpu</b>	Proteína viral U, reduce la expresión de CD4 en la célula y participa en la liberación de viriones de la célula.
<b>nef</b>	Factor negativo, reduce la expresión de CD4 en la célula, reduce la expresión de HLA de clase I; potencia la infectividad de los viriones; altera el estado de activación celular; el progreso a la enfermedad disminuye significativamente en la ausencia de Nef.
<b>LTR</b>	Integración del DNA viral en el genoma celular; contiene los sitios de unión a factores de transcripción (NFκB, NFAT, SP1 y TBP); se requiere para el inicio de la transcripción; contiene la secuencia TAR a la que se une Tat.

### Ciclo de replicación

Al igual que otros virus, el VIH requiere infectar una célula para llevar a cabo su ciclo de replicación. El mecanismo de entrada a la célula comienza con el reconocimiento del receptor de membrana CD4 (linfocito T CD4<sup>+</sup>, principal célula blanco del virus) por medio de la glicoproteína gp120. Esta unión provoca un cambio conformacional en el complejo gp120/gp41 exponiendo un sitio altamente conservado de gp120 de unión a un correceptor celular. Estas moléculas son receptores de quimiocinas específicos<sup>24</sup>, CCR5 en macrófagos y CXCR4 en linfocitos T<sup>25</sup>. La unión de gp120 con el correceptor provoca un cambio conformacional que hace que la glicoproteína gp41 se exponga y se incruste en la membrana celular<sup>25</sup> dando como resultado la fusión de membranas, dejando entrar al virus al interior celular.

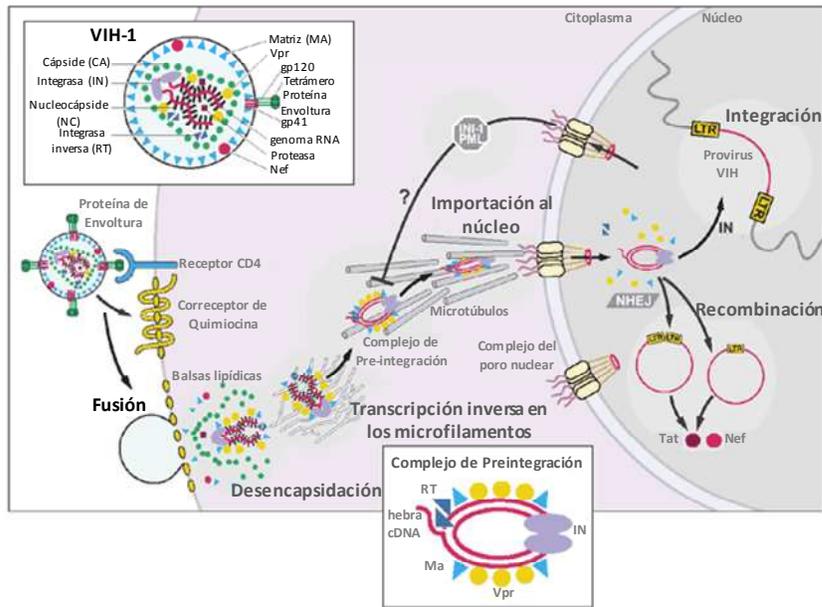
El correceptor CCR5 es utilizado por virus macrofagotrópicos no inductores de sincicios (virus R5) y el correceptor CXCR4 se utiliza por virus linfotrópicos inductores de sincicios (virus X4). Los virus R5 están involucrados cuando la infección se da por mucosas y por vía intravenosa, mientras que los virus X4 se encuentran en etapas tardías de la enfermedad<sup>26</sup>.

Una vez fusionadas las membranas, el core viral se rompe vaciando su contenido (enzimas y genoma viral) en el citosol. Se cree que este proceso se da por la fosforilación de la matriz viral por MAP (*mitogen activated protein*) cinasas<sup>27</sup>, de ciclofilina A<sup>28</sup> y por la acción de las proteínas virales Vif<sup>29</sup> y Nef<sup>30</sup>. La liberación de estos componentes da lugar al complejo de retro-transcripción, que comprende el genoma diploide de RNA, un iniciador (*primer*) de RNA de transferencia (tRNA<sub>Lys</sub>), RT, IN, MA, NC, Vpr y otras proteínas celulares. Este complejo de retro-transcripción se ancla a proteínas del citoesqueleto (microfilamentos de actina) mediado por la fosforilación de la matriz viral, esto es necesario para la eficiente síntesis de DNA viral. Adicionalmente, Vif estabiliza el complejo inhibiendo proteínas celulares que desestabilizan el complejo (Figura 8)<sup>22</sup>.

Después de la retrotranscripción del genoma RNA a cDNA se forma el complejo de preintegración (PIC, *preintegration complex*) que está compuesto por cDNA de doble cadena, IN, MA, Vpr, RT y el grupo de proteínas de unión a DNA de alta movilidad [HMGI(Y)] (Figura 13). El radio de este complejo se ha estimado en 28 nm<sup>23</sup>. Este complejo se transporta al núcleo con ayuda de los microtúbulos y se sitúa cerca de un poro nuclear. Una vez que el complejo de preintegración se encuentra anclado al núcleo se importa al interior del mismo. Se desconocen los mecanismos mediante los cuales se da este proceso, pero se sabe que las proteínas virales IN, MA y Vpr están involucradas. Se sabe que MA tiene una señal de localización nuclear (NLS) que es reconocida por importinas nucleares de la célula.

Dentro del núcleo, el PIC puede tener 4 diferentes destinos, de los cuales sólo uno da lugar a la formación del provirus funcional (DNA viral competente para la replicación dado que está inserto en el genoma celular). Se cree que para que se dé un provirus funcional se necesitan las proteínas celulares HMGI y BAF. La integrasa remueve nucleótidos de los extremos de DNA viral, esta reacción de corte corrige los extremos desiguales generados por la RT. La integrasa también cataliza la subsiguiente reacción que une el DNA del VIH al cromosoma celular. Alternativamente, los otros tres destinos del DNA viral pueden ser: 1) los extremos del DNA viral pueden unirse formando un genoma circular con 2 LTRs, 2) el DNA viral puede sufrir recombinación homóloga y formar un genoma circular con un solo LTR, y 3) el DNA viral puede autointegrarse y formar un genoma circular rearrreglado. Ninguno de estas especies provirales produce viriones infecciosos, sin embargo pueden formar transcriptos cortos para formar Tat y Nef<sup>31</sup> (Figura 13).

Los provirus pueden insertarse en muchos lugares dentro de los cromosomas celulares y cada una de las células puede tener más de un provirus inserto en su genoma. El lugar de integración proviral puede dar lugar a un provirus activo transcripcionalmente o a un provirus latente debido a su inserción en lugares muy compactos como la heterocromatina<sup>23</sup>. Debido a que puede haber más de un provirus en el genoma celular es probable que algún provirus esté activo transcripcionalmente.



**Figura 13. Eventos tempranos en el ciclo de replicación: fusión, retrotranscripción e integración<sup>23</sup>.** Descripción esquemática de los eventos tempranos después de la infección por VIH de una célula susceptible: interacciones entre gp120, CD4 y el correceptor de quimiocinas (CCR5 o CXCR4) dando lugar a la fusión mediada por gp41; seguido del desencapsidamiento del virión; retrotranscripción del genoma de RNA; importación nuclear del complejo de preintegración; e integración del cDNA viral de cadena doble en el genoma celular estableciendo un provirus. Tomado de Greene, W.C. & Peterlin, B.M. Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy. *Nat. Med.* 8, 673-680 (2002).

Uno de los mecanismos de latencia está dado justamente por el sitio de inserción en la cromatina del DNA viral. Sin embargo, la latencia no sólo está acotada por el sitio de inserción del provirus sino por falta de factores de transcripción celulares (dado el contexto de activación de la célula) o de proteínas virales.

Los LTRs 5' dentro del genoma celular funcionan como unidades de transcripción eucarióticas. Estas repeticiones contienen promotores "corriente abajo" y "corriente arriba" que incluyen al iniciador, la caja TATA y tres sitios SP1. Estas regiones ayudan a posicionar la RNA polimerasa tipo II (RNAPII) en el sitio de inicio de la transcripción, después de esto se forma el complejo de preiniciación. La transcripción inicia pero la RNA polimerasa falla en la elongación de la transcripción a lo largo del genoma viral, formando transcritos cortos. Estos transcritos cortos son estables y pueden ser traducidos debido a que el RNA puede formar una asa en forma de tallo llamada elemento de respuesta de transactivación (TAR, *transactivation response element*). Este elemento se une a Tat cuando esta proteína ya se ha traducido. Río arriba del promotor se encuentra un sitio potenciador de la transcripción en donde se unen factores de transcripción como el factor nuclear  $\kappa B$  (NF $\kappa B$ ), el factor nuclear de células T activadas (NFAT) y miembros de la familia Ets. NF $\kappa B$  y NFAT se encuentran en el núcleo celular cuando la célula se encuentra activada. NF $\kappa B$  mediante sus dos subunidades (p50 y p65) es capaz de aumentar la tasa de procesamiento de la RNA polimerasa dando lugar a transcripción viral completa<sup>32</sup>.

Tat juega un papel primordial en la transcripción de los genes virales. Esta proteína viral en asociación con ciclina T1 se une a TAR (en el transcrito en formación) y recluta a una cinasa llamada Cdk9 (cinasa 9 dependiente de ciclina)<sup>33</sup>. Todo este complejo es llamado P-TEFb (*transcription-elongation factor b complex*). Cdk9 del complejo P-TEFb fosforila el dominio carboxilo terminal de la RNA polimerasa II

aumentado su capacidad de procesamiento y permitiendo la formación de transcritos más largos. Otras proteínas blanco del complejo P-TEFb son los factores negativos de la transcripción-elongación (N-TEFs) como DSIF (*DRB-sensitivity inducing factor*) y NELFs (*negative elongation factors*)<sup>34</sup>.

Durante la transcripción del genoma viral se forman más de una docena de transcritos<sup>23</sup>. Algunos de ellos son procesados (*splicing*) en el momento de su formación, estos transcritos son rápidamente transportados al citoplasma. Los mRNA virales multiprocesados codifican para Nef, Tat y Rev. Los otros mRNA sencillamente procesados o sin procesar se quedan en el interior del núcleo, estos transcritos codifican para la estructura, las enzimas accesorias y el genoma de RNA del virus, y son indispensables para el ensamble de viriones infecciosos.

El transporte de estos mRNA depende de la producción de cantidades umbrales de Rev. Rev es una pequeña proteína transportadora que se une a asas en forma de tallo en los mRNA, en específico a una secuencia dentro del gen *env* llamada RRE (*Rev response element*). Esta unión da lugar a la multimerización de muchas moléculas de Rev alrededor de RRE. Esta proteína acarreadora contiene un sitio de localización nuclear (NLS) y una secuencia de exportación nuclear rica en leucinas (NES) que le permiten atravesar la membrana nuclear transportando los transcritos largos hacia el citoplasma celular. Este proceso es dependiente de energía debido a la participación del factor celular RanGTP<sup>23</sup>.

Para que la formación de viriones se lleve a cabo eficientemente, se necesita que exista un balance entre el procesamiento de transcritos y su transporte hacia el citoplasma. Si el procesamiento de transcritos es muy eficiente, sólo los transcritos multiprocesados son transportados al citoplasma. Sin embargo estos transcritos son insuficientes para que se lleve a cabo la replicación viral. Por otro lado, si el procesamiento de transcritos no es eficiente no se pueden sintetizar las cantidades suficientes de Tat, Rev y Nef, proteínas esenciales para la eficiente transcripción de los mRNA, transporte de los mismos y desregulación del contexto celular para mejorar la infectividad de los viriones.

En contraste con Tat y Rev que actúan directamente sobre los transcritos de RNA, Nef modifica el contexto de la célula infectada para optimizar la replicación viral<sup>25</sup>. La ausencia de esta proteína está asociada a lenta progresión a SIDA en humanos<sup>35</sup> y monos<sup>36</sup>. Esta función parece estar asociada a la habilidad de Nef de desregular cascadas de señalización como la de la activación asociada al receptor de células T (TCR) y de disminuir la expresión de CD4 en la superficie celular. Nef también promueve la producción y la salida de viriones más infecciosos<sup>37;38</sup>; puede afectar la vía de señalización de PI3-K, causando rearrreglos importantes en el citoesqueleto y evitando sus funciones efectoras; tiene la capacidad de regular negativamente la expresión del receptor CD4 desde su presencia en el retículo endoplásmico; así como de activar la expresión de FasL, el cual induce apoptosis en las células no infectadas que expresan Fas. Al mismo tiempo, Nef bloquea la apoptosis de las células infectadas mediante la regulación de la cinasa-1 (vía de apoptosis por Fas y TNFR) y por la fosforilación de la proteína inducida por virus Bad. Nef inhibe la apoptosis uniéndose a p53 e inhibiendo su función<sup>39</sup>.

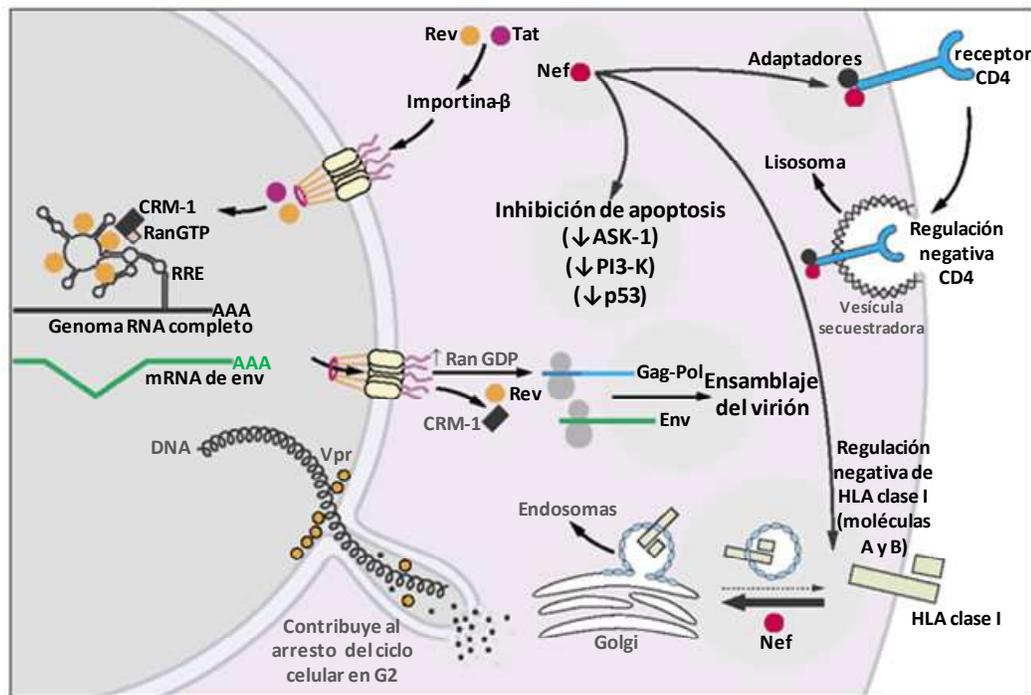
Una función notoria de Nef es su capacidad de disminuir la expresión de las moléculas HLA en la

superficie celular. Esta actividad reduce la visibilidad inmunológica de las células infectadas para ser localizadas y destruidas por las CTLs. Sin embargo, Nef no puede disminuir la expresión de las moléculas HLA-C<sup>40</sup>, por lo que las células infectadas pueden ser reconocidas por células NK. (Mejor arriba) Mediante todos estos mecanismos, Nef prolonga la vida de las células infectadas optimizando la replicación viral<sup>23</sup>.

Otras proteínas virales también participan en la modificación del contexto celular de las células infectadas. Un ejemplo es Vpr, que induce el arresto de las células infectadas en proliferación en fase G2/M del ciclo celular<sup>41</sup>. Debido a que el LTR es mucho más activo durante G2, este arresto por Vpr potencia la expresión de genes del virus<sup>42</sup>.

Todos los componentes del virión son ensamblados momentos antes de que la gemación del virión ocurra, esto sucede justo debajo de la membrana. Este proceso es dirigido por las poliproteínas Gag-Pol y Gag y también es dirigido por Env y requiere del reclutamiento de dos copias del genoma de RNA, así como de Vpr<sup>43</sup>. La formación de la cápside del virión inmaduro requiere del ensamble de aproximadamente 1500 poliproteínas de Gag<sup>44</sup>, en este proceso participa una proteína chaperona llamada HP68<sup>45</sup>.

La gemación de los viriones ocurre en regiones ricas en colesterol, esta composición lipídica favorece la liberación, estabilidad y fusión de los viriones con las células blanco (Figura 14).



**Figura 14. Eventos tardíos en el ciclo de replicación: transcripción, traducción y gemación viral.** Resumen de los eventos tardíos en una célula infectada que culminan en la gemación de nuevos viriones. Se destaca el papel de las proteínas virales en la optimización del contexto celular para la replicación viral: regulación negativa de CD4 y de HLA clase I; inhibición de la apoptosis por Nef; y arresto en G2 del ciclo celular por Vpr. También se muestra el papel de Rev que promueve la exportación de transcritos largos que codifican para enzimas así como el genoma viral que se integrará a los nuevos viriones. Tomada de Greene, W.C. & Peterlin, B.M. Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy. Nat. Med. 8, 673-680 (2002).

## Historia Natural de la Enfermedad

Durante la infección por el VIH se distinguen diversas fases o etapas, inducidas por la interacción entre

el virus y la respuesta inmune del hospedero<sup>46</sup>. La historia natural de la enfermedad se divide en las siguientes etapas sucesivas. Etapa de infección primaria, caracterizada por concentraciones de cT CD4<sup>+</sup> mayores a 500/ $\mu$ l. Etapa intermedia o de latencia clínica, con concentraciones entre 200 a 500 células T CD4<sup>+</sup>/ $\mu$ l. Etapa tardía donde los pacientes presentan concentraciones por debajo de 200 y hasta 50 cT CD4<sup>+</sup>/ $\mu$ l. Finalmente la etapa avanzada caracterizada por concentraciones por debajo de 50 cT CD4<sup>+</sup>/ $\mu$ l. En la etapa de infección primaria y pocos días después de la infección, la viremia se detecta en plasma alcanzando valores elevados. Al mismo tiempo ocurre una notable reducción de las cT CD4<sup>+</sup> en circulación; pero no es tan acentuada como sucede en las mucosas. Clínicamente los síntomas son inespecíficos y con estado de gravedad variable<sup>47</sup>. Sin embargo, en un período de tiempo en general corto, ocurre una contra-regulación de los niveles de replicación viral que disminuye considerablemente la viremia y aumentan los niveles circulantes de cT CD4<sup>+</sup> (aunque pocas veces a los niveles de referencia), con lo que se resuelve el cuadro clínico<sup>48</sup>. Esto sugiere que se desarrolla una eficiente respuesta inmune, como sucede en otras infecciones virales, durante el período de infección aguda, que es capaz de contener momentánea y parcialmente la infección<sup>49</sup>. El descenso en la viremia puede observarse durante los primeros 4 meses de infección, hasta llegar a lo que se conoce como el punto de equilibrio (*set point*) de la carga viral, que varía de persona a persona. El nivel del punto de equilibrio determina el pronóstico del curso de la enfermedad. A menor carga viral, menor el tiempo de evolución a SIDA y muerte<sup>50;51</sup>.

La etapa intermedia se caracteriza por niveles bajos o ausencia de viremia en sangre. Sin embargo, a partir de ese momento se observa un incremento gradual de la carga viral y disminución progresiva del número de las cT CD4<sup>+</sup>. Esta relación determina la progresión de la enfermedad.

De acuerdo a la duración de la historia natural de la enfermedad, se ha clasificado en dos grandes grupos a los individuos infectados por el VIH. Un grupo denominado no progresores a largo plazo (*long term non-progressors*) en quienes por lo menos durante 10 años de infección y sin tratamiento permanecen sin síntomas, con niveles circulantes de cT CD4<sup>+</sup> dentro de los límites de referencia y carga viral baja. A este grupo pertenece el 5 al 10% del total de infectados<sup>52</sup>. El otro grupo se denomina progresores (*progressors*) y en contraste, está constituido por más del 95% de la población infectada por el VIH. Este a su vez se divide en dos subgrupos: progresores promedio y progresores rápidos. Los progresores promedio, tienen una media de supervivencia de 10 años. En este se clasifica un 60 a 70% del total de infectados. El subgrupo de los progresores rápidos engloba al 30% de la población infectada y se caracteriza por un curso acelerado de la enfermedad, menos de 5 años, entre la infección y la muerte<sup>52;53</sup>.

### **El Antígeno Leucocitario Humano (HLA) y el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH)**

La respuesta inmune involucra una compleja interacción entre la inmunidad innata y adaptativa, que determinan el destino de las infecciones dadas por organismos patogénicos. Muchas familias de genes de la respuesta inmune, como los genes HLA clase I y II del MHC presentan polimorfismo extenso. Las

variantes de estos loci se han asociado con resistencia y susceptibilidad a diferentes enfermedades<sup>54</sup>. La susceptibilidad a la mayoría de las enfermedades es altamente compleja sobre todo debido al polimorfismo de los genes involucrados en el sistema inmune.

El VIH ha emergido muy recientemente en la historia del humano<sup>55;56</sup>, así que no pasado suficiente tiempo para que los genes deletéreos (o no protectores) hayan sido eliminados o que los genes protectores hayan aumentando su frecuencia en la población como consecuencia de selección natural. De esta manera, los alelos del sistema inmune que afectan el curso de la infección por VIH son más fácil de identificar que aquellos involucrados en la infección de patógenos antiguos (debido a la larga interacción patógeno-hospedero que es capaz de modificar las frecuencias alélicas por selección natural y en donde los alelos protectores prevalecen en la población y los deletéreos se encuentran en baja frecuencia).

El curso clínico de la infección por VIH-1 es altamente variable entre los individuos y estudios genéticos han identificado alelos en muchos genes del sistema inmune que tienen influencia en la infección o en la progresión a la enfermedad<sup>57</sup>.

### **Alelos HLA en la infección por VIH**

Existen estudios que demuestran la ventaja de la heterocigosidad HLA en la infección por VIH-1, donde la máxima heterocigosidad de los alelos HLA clase I está asociada al inicio tardío del SIDA en comparación a la homocigosidad en estos loci<sup>58;59</sup>. Esto es porque los individuos heterocigotos son capaces de presentar un conjunto de péptidos virales más amplio, dando como resultado en un repertorio de CTLs mucho mayor y en teoría, la habilidad reconocer o controlar al virus durante más tiempo (las mutantes de escape aparecen más tardíamente en la infección). Entonces, el mantenimiento de la variación genética de HLA parece ser una ventaja selectiva en contra de agentes patógenos y la heterocigosidad HLA puede por lo tanto tener un papel importante en el combate de las enfermedades infecciosas.

Otro fenómeno que ocurre a nivel poblacional es la selección dependiente de frecuencia, en donde el virus puede adaptarse (y por lo tanto volverse más resistente) a los alelos con mayor frecuencia en una población. De este modo, los alelos raros o infrecuentes pueden tener una ventaja de selección. Esto ha sido demostrado en el VIH-1, en donde un supertipo HLA tiene ventaja dada su rareza en la población<sup>60;61</sup>, sugiriendo que la selección dependiente de frecuencia puede ocurrir en el VIH. Estos resultados sugieren que los alelos HLA de clase I son importantes en la generación de respuestas inmunes en contra del VIH.

La combinación de la alta tasa de mutación y de la rápida replicación le permite al VIH adaptarse al hospedero mediante diversos genotipos<sup>62</sup>. Sin embargo, alelos en específico, sobre todo alelos del locus HLA-B, el locus de HLA más inmunogénico<sup>63</sup>, han sido implicados en la protección o la susceptibilidad a la progresión a SIDA (Tabla 4). Existen asociaciones consistentes de la lenta progresión a SIDA con los alelos HLA-B\*27 y HLA-B\*57<sup>64</sup>; y de la progresión rápida a SIDA con HLA-B\*35<sup>65;66</sup>. El papel central de HLA-B en la defensa contra el VIH ha sido analizado usando una combinación de factores funcionales y

genéticos<sup>63</sup>. HLA-B también muestra la asociación más fuerte con la tasa de progresión a SIDA en los loci de clase I. Finalmente, la presión de selección que ejerce el locus HLA-B es mayor que la ejercida por HLA-A o -C<sup>63</sup>.

**Tabla 4. Asociaciones HLA con la infección por VIH**

Asociación HLA	Efecto	Referencia
<b>Homocigosidad en HLA-A, -B, y -C</b>	Progresión acelerada a SIDA	Carrington et al. Science 1999. 283:1748-1752; Tang et al. AIDS Res Hum Retroviruses 1999. 15:317-324.
<b>HLA-B*35</b>	Progresión acelerada a SIDA	Gao et al. N Engl J Med 2001. 344:1668-1675; Itescu et al. J Acquir Immune Defic Syndr 1992. 5:37-45.
<b>HLA-B*57 y HLA-B*27</b>	Lenta progresión a SIDA	Kaslow et al. Nat Med 1996. 2:405-411.
<b>Haplotipo HLA-A*01-B*08-DRB1*03</b>	Progresión acelerada a SIDA	Kaslow et al. Lancet 1990. 335:927-930; Flores-Villanueva et al. J Immuno 2003. 170:1925-1929.
<b>Haplotipo HLA-DRB1*13-DQB*06</b>	Mantenimiento de la supresión viral en pacientes tratados tempranamente*.	Malhotra et al. J Clin Invest 2001. 107:505-517.

Tomada parcialmente de Maurenn P. Martin and Mary Carrington. Immunogenetics of viral infection. Current Opinion in Immunology 2005, 17:510-516. \*Esto se refiere a pacientes con diagnóstico de VIH-1 que comenzaron con terapia antirretroviral pronto después de su diagnóstico.

### **Importancia de los linfocitos T CD8+ en el control de la replicación viral**

Durante la fase aguda de la infección por VIH en adultos se da un incremento en la viremia a un pico de  $\sim 10^7$  copias de RNA de VIH por mililitro de plasma (copias RNA VIH/ml plasma) seguido por marcada disminución (en unas semanas) a una mediana de setpoint viral de 30,000 copias de RNA VIH/ml de plasma<sup>67</sup>. La asociación temporal observada entre esta disminución (de  $10^2$ - $10^3$  veces) de la carga viral y la aparición de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos (CTLs) específicos de VIH sugieren que los CTLs son los responsables de reducir los niveles de replicación viral en esta fase de la infección. La evidencia más directa del papel de los CTLs en el control de la replicación viral durante la fase aguda de la infección viene de los estudios del modelo de SIV en macacos, en donde la administración de anticuerpos monoclonales específicos para CD8 elimina la disminución de la viremia desde su pico de replicación en la fase aguda<sup>68-70</sup>. Anticuerpos monoclonales específicos para CD8 se administraron a macacos con infección crónica por SIV, esto dio como resultado un aumento en la carga viral en aquellos animales infectados por SIV que progresaban rápidamente a la enfermedad ("progresores") y en aquellos que controlaban la infección ("controladores", también conocidos como no progresos a largo plazo). El número de CTLs específicos de VIH fueron monitoreados usando tetrámeros acoplados a complejos MHC-péptidos<sup>70-72</sup>.

Tres evidencias más soportan el papel central de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> en el control de la infección por VIH: a) alelos HLA específicos son asociados consistentemente con alguna evolución o progreso particular a la infección por VIH; b) se ha observado una progresión más rápida hacia la enfermedad en individuos con homocigosidad en los genes HLA de clase I<sup>59;73</sup>. En contraste con estos resultados se encuentran las observaciones de que las respuestas de CTLs VIH específicas de alta frecuencia son usualmente detectables en individuos infectados por VIH que han desarrollado SIDA<sup>74;75</sup>; que la mayoría de los alelos HLA de clase I parecen tener poco impacto en el progreso de la enfermedad por VIH<sup>63</sup>; y

que la mayoría de las mutantes de escape seleccionadas por CTLs no afectan significativamente la carga viral<sup>76</sup>.

En conjunto, estos estudios llevan a la conclusión de que existen diferencias a lo largo de las especificidades de CTLs y a lo largo de las moléculas HLA de clase I que son cruciales para el control efectivo de la replicación viral en los diferentes individuos. Esto da lugar a la hipótesis de las asociaciones HLA de clase I con evoluciones hacia la enfermedad características de infecciones crónicas como el VIH en gran medida resultan de las respuestas de CTLs en contra de péptidos específicos de patógenos que son presentados por los diferentes alelos HLA de clase I.

### **Importancia del polimorfismo de los genes HLA de clase I**

Como se ha visto antes en esta introducción, de los tres loci de HLA de clase I (HLA-A, -B y -C) el locus HLA-B es el más polimórfico con 1431 moléculas descritas, comparadas con 893 moléculas distintas de HLA-A y 569 moléculas de HLA-C (ver la base de datos IMGT/HLA<sup>11</sup>). Las diferencias en las distribuciones alélicas de los loci HLA en poblaciones de todo el mundo ilustran la extraordinaria diversidad de los distintos humanos poblaciones con respecto a la expresión de alelos HLA. Casi todo el extenso polimorfismo de los loci HLA de clase I está restringido a aquellos residuos que conforman al surco de unión a péptido de estas moléculas<sup>77</sup>, por lo que definen los péptidos que se unen a cada una de las moléculas HLA. La importancia del polimorfismo de los loci HLA de clase I es que las diferencias a lo largo de las diferentes moléculas HLA y de los péptidos que presentan son de suficiente importancia para ser sujetos de selección natural Darwiniana, es resumen, estas diferencias son cuestión de vida o muerte. Aparentemente insignificantes, las diferencias de un solo aminoácido entre los alelos HLA relacionados pueden tener consecuencias cruciales en términos de la evolución de enfermedades en particular. En el contexto de la infección por VIH, los ejemplos incluyen la asociación de HLA-B\*3502 y HLA-B\*3503 con la rápida progresión y la falta de asociación con el alelo HLA-B\*3501 que difiere de HLA-B\*3502 y HLA-B\*3503 en sólo 3 y 1 aminoácido, respectivamente<sup>65;78;79</sup>. En un ejemplo más extremo, un estudio de la infección por VIH en Durban, Sudáfrica, encontró una fuerte asociación entre HLA-B\*5801 y una carga viral baja, mientras que HLA-B\*5802 que difiere de HLA-B\*5801 en sólo tres aminoácidos fue asociado con una carga viral alta. Una vez más, estas mínimas diferencias entre las aparentemente relacionadas moléculas HLA de clase I se traducen en diferencias sustanciales entre las especificidades de unión a péptido<sup>77</sup>. El examen de los péptidos presentados por moléculas HLA de clase I similares revela sutiles pero importantes diferencias, un estudio de cinco alelos HLA estrechamente relacionados dentro del supertipo HLA-B57 (HLA-B\*0702, B\*3910, B\*4201/02 y B\*8101) demuestran que incluso cuando un péptido idéntico es presentado por distintos alelos diferentes presiones de selección pueden ser impuestas sobre el virus<sup>80</sup>.

### **Respuesta inmune por CTLs y evolución viral**

EL VIH es un retrovirus altamente variable debido a ciertas características: a) tiene una dinámica de replicación notable (diariamente se pueden formar  $10^9$ - $10^{10}$  viriones nuevos<sup>81;82</sup>), b) su transcriptasa inversa (RT) tiene una alta tasa de mutación (0.2 errores por genoma por ciclo de replicación<sup>83</sup>) y c)

debido a sus eventos de recombinación (realizados también por RT)<sup>84-86</sup>.

Varias líneas de evidencia señalan la importancia de la respuesta celular, en particular la de los linfocitos T citotóxicos (CTLs), en el control de la replicación del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH)<sup>87-90</sup>. Estos estudios encuentran una asociación temporal con la aparición de la respuesta inmune por CTLs y el control de la viremia en la fase aguda de la infección.

La respuesta de CTLs está definida y restringida por las moléculas del principal de histocompatibilidad de clase I (HLA de clase I), las cuales presentan péptidos virales (epítomos) en la superficie de las células infectadas, para que estas sean reconocidas y destruidas por los CTLs específicas.

Los CTLs son capaces de controlar la replicación viral y ejercen presión selectiva sobre el VIH, esto se ha comprobado en estudios poblacionales en donde se ha encontrado que los CTLs pueden reconocer epítomos a lo largo del todo el genoma del VIH en distintas poblaciones con diferentes composiciones genéticas y étnicas<sup>91</sup>. Como respuesta a la presión ejercida por los CTLs se seleccionan mutaciones en epítomos de reconocimiento que muchas veces resultan en el escape al reconocimiento por CTLs. Estas mutaciones aparecen constantemente debido a la alta variabilidad del VIH pero no son seleccionadas debido a que no se encuentran en los epítomos reconocidos por el haplotipo HLA selector del hospedero. Las mutaciones de escape pueden interferir en diferentes puntos a lo largo del procesamiento y presentación antigénica, ya sea que los epítomos mutados no se puedan cortar y procesar correctamente (por lo que no se presentan para ser reconocidos por el TCR de las CTLs) o que los epítomos mutados dejen de ser reconocidos por las moléculas HLA o por el TCR de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> (CTLs). Los principales lugares en donde los epítomos mutados pueden escapar al procesamiento antigénico son: a) en el proteasoma, las mutaciones pueden interferir en el procesamiento por este complejo enzimático por lo que las proteínas mutadas no pueden ser cortadas en pequeños péptidos para ser acoplados a las moléculas de HLA en el retículo endoplásmico; b) en el transporte por TAP de los péptidos que se encuentran en el citosol hacia el retículo endoplásmico, la proteína transportadora dependiente de energía TAP transporta los péptidos que van a ser presentados del citosol hacia el interior del retículo endoplásmico, las mutaciones de los péptidos que interfieren con este transporte se quedan en el citosol y no pueden ser asociados a las moléculas HLA; c) y en el retículo endoplásmico, en donde proteasas celulares como ERAAP cortan los aminoácidos terminales de los péptidos para después sean asociadas a las moléculas HLA, algunas mutantes de escape no se cortan por estas proteasas celulares y estos péptidos debido a su tamaño no pueden asociarse a las moléculas HLA<sup>92</sup>.

Otras mutaciones en los epítomos pueden ser procesadas pero no presentadas debido a que las mutaciones disminuyen la afinidad y la avidéz del péptido con la molécula de HLA o con el receptor de linfocitos T<sup>92</sup>.

Aunque la respuesta inmune por CTLs no es capaz de erradicar completamente la infección por VIH, el conocimiento acumulado hasta ahora sugiere que esta respuesta juega un papel muy importante en el control parcial de la replicación viral. Por el otro lado, el VIH tiene la habilidad de mutar y evadir el reconocimiento por CTLs. Un tema crucial en la interacción virus-hospedero es si la respuesta inmune

del hospedero dirige la evolución viral, y si es así, en qué medida. Es obvio que una respuesta afirmativa a esta pregunta sería un soporte fuerte al papel de la respuesta inmune celular en el control parcial de la replicación viral.

Existe evidencia que sugiere que la interacción entre la respuesta de CTLs y la habilidad del VIH para evadir esta respuesta es similar a lo que pasa cuando una presión de selección es aplicada por el uso de algún antirretroviral. Dado esta posibilidad, la existencia de una respuesta de CTLs efectiva capaz de ejercer una presión inmune, obligaría al virus a evolucionar y mutar para evadir esta respuesta. En muchos casos esto impone una presión en la actitud replicativa del virus (fitness viral, capacidad de replicación del virus bajo una presión selectiva dada) y como consecuencia una reducción de la replicación viral. En la ausencia de la presión inmune, la mutante variante puede revertir a la cepa original (wild type), aumentando la actitud replicativa.

En un estudio longitudinal reciente en un solo individuo, se observó la acumulación secuencial de mutaciones de escape a CTLs en múltiples regiones del VIH, seguida de la pérdida de función de linfocitos T y pérdida del control de la replicación viral<sup>93</sup>. Además, en un estudio con cinco pacientes en el que fue monitoreado la evolución de la respuesta de CTLs en contra de dos epítomos inmunodominantes, la presión de selección fue influenciada por el estado de maduración de las CTLs<sup>94</sup>. De esta manera, no todas las posibles respuestas por CTLs tienen la misma habilidad de ejercer presión de selección sobre el VIH y de hecho algunas respuestas inmunodominantes pueden carecer de esta habilidad<sup>95</sup>. La existencia de respuestas de CTLs no efectivas puede explicar la observación de que el repertorio de CTLs se incrementa durante la fase crónica en paralelo con el incremento de la diversidad viral<sup>96</sup>.

Algunos autores han propuesto la existencia de dos diferentes tipos de interacciones entre las respuestas de CTLs y el virus<sup>97</sup>: respuesta de CTLs “conductora” (“driver”) y respuesta de CTLs “pasajera” (“passenger”). Una respuesta conductora es una respuesta inmune efectiva que dirige la evolución viral. Un ejemplo de este tipo de respuesta es la respuesta de CTLs dirigida un epítomo de Gag restringido por el grupo alélico HLA-B\*27<sup>98</sup>. En cambio, una respuesta no conductora es una respuesta no efectiva que controla la carga viral sin ejercer una presión de selección importante o significativa.

Existen estudios a nivel poblacional que apoyan la influencia de la presión de selección ejercida por los CTLs en la evolución viral, estos estudios analizan las asociaciones entre alelos HLA y mutaciones específicas<sup>62;99</sup>. En un estudio reciente, las secuencias de la transcriptasa reversa (RT) fueron examinadas en una cohorte de más de 400 pacientes con infección crónica por VIH<sup>62</sup>. Los polimorfismos en el genoma del VIH fueron más frecuentes en ciertas regiones de la RT (estos polimorfismos se agrupan en las regiones de mayor reconocimiento). A su vez, estos polimorfismos se asocian positivamente con alelos HLA en particular, es decir, que la presencia de un alelo se asocia positivamente al aumento de polimorfismos en cierto sitio del genoma. Las regiones en donde se agrupan estos polimorfismos coinciden con algunos epítomos ya reportados. Este patrón de evolución particular está dado por la distribución de alelos HLA de la población estudiada. En este estudio también se observó que el grado

que la selección asociada al HLA en la secuencia viral era predictiva del valor de carga viral.

Otro estudio utilizando otra aproximación metodológica, que involucra una búsqueda extensiva en bases de datos inmunológicas y de secuencia llegó a la misma conclusión<sup>99</sup>.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN**

La respuesta inmune involucra una compleja interacción entre la inmunidad innata y adaptativa, que determinan el destino de las infecciones producidas por organismos patogénicos. Muchas familias de genes de la respuesta inmune, como los genes HLA clase I del MHC presentan polimorfismo extenso. Las variantes de estos loci se han asociado con resistencia y susceptibilidad a la infección y progresión a la enfermedad causada por el VIH<sup>54</sup>.

Varias líneas de evidencia señalan la importancia de la respuesta celular, en particular la de los linfocitos T citotóxicos (CTLs, T CD8<sup>+</sup>), en el control de la replicación del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH)<sup>100-103</sup>. La respuesta de CTLs está definida y restringida por las moléculas HLA de clase I, las cuales presentan péptidos virales (epítomos) en la superficie de las células infectadas para que éstas sean reconocidas y destruidas por CTLs específicos.

Los CTLs son capaces de controlar temporalmente la replicación viral y ejercen presión selectiva sobre el VIH, esto se ha comprobado en estudios poblacionales en donde se ha encontrado que los CTLs pueden reconocer epítomos a lo largo del todo el genoma del VIH en distintas poblaciones con diferentes composiciones genéticas y étnicas<sup>91</sup>. De igual manera se ha observado que los alelos HLA están dejando una huella sobre la secuencia del VIH a nivel poblacional al acumularse mutaciones de escape en poblaciones determinadas<sup>62,99</sup>. Se ha sugerido que este patrón particular de evolución está fuertemente influenciado por las frecuencias alélicas HLA particulares de la población estudiada<sup>62</sup>.

Las frecuencias alélicas y los haplotipos HLA varían notoriamente según la población estudiada dada su composición étnica, por lo que es importante estudiar las frecuencias de estos genes en las diferentes poblaciones infectadas por el virus. Aunque existen reportes previos de frecuencias HLA en población no infectada en mestizos mexicanos y en hispanos<sup>104;105</sup>, en México se carece de estudios que establezcan posibles alelos HLA de riesgo o protectores hacia la infección por VIH ó hacia el avance a SIDA en pacientes VIH positivos. De igual manera, no existen estudios en los que se busquen características únicas de evolución del VIH de acuerdo a las características inmunogenéticas particulares de la población mexicana.

Por otro lado, un número considerable de estrategias para vacunas hacia la infección por el VIH ha sido dirigido hacia el diseño de vacunas basadas en las respuestas inmunes dirigidas a epítomos restringido por linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos (CTLs). No sólo las diversidades de secuencias virales globales y locales representan un obstáculo para el desarrollo de vacunas sino también los factores inmunogenéticos de los hospederos, especialmente la distribución de alelos HLA en la población, que tiene que ser tomada en cuenta cuando se seleccionen los candidatos a vacunas regionales que tendrían respuestas de CTLs efectivas.

Dada la importancia genética e inmunológica del sistema de genes HLA, se decidió realizar el presente estudio descriptivo con el objetivo de obtener las frecuencias alélicas y haplotípicas de los genes HLA en una cohorte de pacientes VIH<sup>+</sup> del centro de México.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivos Generales**

- Obtener las frecuencias de alelos HLA de clase I en pacientes VIH positivos del centro del país con el fin de evaluar el impacto de este factor inmunogenético en parámetros indicativos de la progresión y pronóstico de la enfermedad (carga viral y conteo de linfocitos T CD4+).
- Comparar las frecuencias alélicas de los genes HLA de clase I en pacientes VIH positivos mexicanos con las reportadas en otras cohortes, buscando diferencias significativas que pudieran mostrar tendencias evolutivas características de la enfermedad en nuestros pacientes.
- Realizar un análisis preliminar de sitios importantes en el genoma del VIH que podrían estar sujetos a presión selectiva por linfocitos T citotóxicos (CTLs, T CD8<sup>+</sup>), tomando en cuenta las frecuencias de alelos HLA en una cohorte de pacientes mexicanos y que podrían tener un impacto en el diseño de vacunas e implementación de tratamientos adecuados a nuestra población.

### **Objetivos Particulares**

- Tipificar los genes HLA de clase I (genes A, B y C) en una cohorte de pacientes VIH positivos del centro del país.
- Determinar los alelos y los haplotipos HLA con alta frecuencia en la cohorte de estudio.
- Buscar correlaciones entre la presencia de alelos HLA específicos y los valores de carga viral y conteo de linfocitos T CD4+, identificando alelos protectores y de riesgo en nuestros pacientes.
- Comparar las frecuencias alélicas de los genes clásicos (loci A, B y Cw) HLA de clase I obtenidas en la cohorte de estudio con las observadas en otras cohortes.
- Buscar en bases de datos epítomos de CTLs (epítomos ya reportados) que se espera tengan mayor frecuencia de reconocimiento dados los alelos HLA más frecuentes en la cohorte estudiada.

## **HIPOTÉISIS**

La distribución alélica HLA de pacientes VIH positivos será semejante a la reportada previamente para mestizos mexicanos, con posibles diferencias que podrían representar efectos protectores o de riesgo hacia la infección por VIH.

Se comprobarán efectos de alelos HLA protectores o de riesgo hacia el avance de la enfermedad por VIH previamente reportados en la población mexicana, observando posiblemente nuevos alelos protectores o de riesgo específicos para nuestra población.

Los grupos de alelos HLA-A\*02, B\*35 y Cw\*07/04 se encontrarán mayormente representados en la cohorte de acuerdo con las frecuencias alélicas descritas previamente en mestizos mexicanos VIH negativos.

## **METODOLOGÍA**

### **Grupo de Estudio**

Se estudiaron transversalmente muestras de 120 pacientes VIH positivos en etapa crónica de la enfermedad, provenientes de 4 estados del centro del país: Distrito Federal, Estado de México, Puebla e Hidalgo. Los pacientes fueron reclutados en el Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIENI) del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), como parte de las cohortes de investigación de Epidemiología Molecular y Evolución del VIH en la población mexicana, llevados a cabo en este centro de investigación.

Los criterios de inclusión fueron: a) pacientes sin tratamiento antirretroviral previo, b) con infección documentada por VIH (ELISA y western blot) y c) mayores de edad.

Los pacientes fueron reclutados entre los meses de octubre de 2005 y noviembre de 2006. La participación de los pacientes fue voluntaria, previa firma de carta de consentimiento informado. Toda la información proporcionada por los pacientes y generada a partir de este estudio fue manejada de manera confidencial. Los protocolos de investigación de los cuales se derivó este trabajo fueron evaluados y aceptados por el Comité de Ciencia y Bioética del INER.

### **Procesamiento y Almacenamiento de Muestras**

A cada paciente se le tomó una única muestra sanguínea por venopunción en 8 tubos con EDTA de 8ml y un tubo con EDTA de 6ml. Este último tubo se utilizó para realizar el conteo de linfocitos T CD4+. El plasma de los tubos restantes se separó (previa centrifugación a 2500 rpm, 20 min) y se utilizó para las pruebas de carga viral (CV). El plasma sobrante se alícuotó y se guardó a -80°C dentro de la plasmoteca del CIENI hasta su uso. Los paquetes celulares se procesaron para extraer células mononucleares de sangre periférica (PBMCs, siglas en inglés) como se indica en la sección correspondiente. A partir de una fracción de éstas se extrajo DNA para tipificar HLA de clase I (ver sección de extracción de DNA y tipificación HLA), mientras que el resto fue criopreservado a -80°C para otros estudios.

### **Separación de PBMCs**

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) son células con núcleos esféricos (por ejemplo: linfocitos y monocitos), estas células sanguíneas juegan un papel primordial en el sistema inmune para eliminar infecciones. Dentro de esta subpoblación de células se encuentran los linfocitos T CD4+ que son el blanco de infección por el VIH y su conteo es útil para caracterizar inmunodeficiencias.

Después de tomada la muestra sanguínea se prosiguió a separar las PBMCs mediante gradiente de ficol. Esta técnica utiliza la densidad diferencial de los componentes sanguíneos para separar las células mononucleares de los demás componentes. El ficol es un polisacárido hidrofílico de alta densidad ( $\rho=1.077\pm 0.001\text{g/ml}$ ) que se puede disolver en medios acuosos.

La manera en que se realiza la separación de PBMCs es la siguiente: se centrifugan las muestras sanguíneas (2500rpm durante 20min) y se obtiene el paquete leucocitario, al cual se le diluye con un volumen de medio Hanks (GIBCO HBSS, Invitrogen, Carlsbad, CA). Después en un tubo cónico de 50ml se coloca el ficol (Lymphoprep Hystopaque, Axis-Shield, Oslo, Noruega) y el paquete leucocitario diluido se

estratifica cuidadosamente sobre el ficol. Se centrifuga (2000rpm durante 20 minutos) para separar los componentes sanguíneos de acuerdo a sus densidades específicas, de tal manera que en el tubo se forman varias fases (de arriba hacia abajo): plasma/medio y otros componentes solubles, otra fase muy delgada que contiene las PBMCs, el ficol y en el fondo del tubo se encuentran eritrocitos y granulocitos. Después se retira el medio (fase superior del gradiente), se obtienen las PBMCs y se lavan con medio Hanks para eliminar el exceso de ficol.

Se contaron las PBMCs utilizando un hematocitómetro y se separaron de 6-10 millones de células para la extracción de DNA genómico. El resto de las células se preservaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  en medio de congelación conteniendo 90% de suero bovino fetal (FBS, Cambrex BioSciences, East Rutherford, NJ) y 10% de dimetil sulfóxido (DMSO, Sigma, St. Louis, MI) para futuros ensayos. Las células destinadas para la extracción de DNA genómico fueron centrifugadas, se retiró el medio de lavado y se procedió a la extracción. En caso de no procesar la muestra inmediatamente, el botón (pellet) se congeló a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

### **Extracción de DNA**

El DNA genómico de cada paciente se extrajo mediante el kit QIAmp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN®, Valencia, CA) de acuerdo a las especificaciones del proveedor. Este kit está diseñado para la extracción de en aproximadamente  $6\mu\text{g}$  de DNA total a partir de  $200\mu\text{l}$  de sangre total humana y hasta  $50\mu\text{g}$  de DNA a partir de  $200\mu\text{l}$  de buffy coat,  $5 \times 10^6$  linfocitos o células de cultivo que tengan juego de cromosomas completo.

Para este trabajo se extrajo DNA a partir de PBMCs. En caso de tener células criopreservadas en medio de congelación, éstas fueron previamente lavadas con medio HUT (medio RPMI 1640, Invitrogen, Carlsbad, CA; suplementado con glutamina  $1\text{mM}$  + penicilina  $100\text{U/ml}$  + estreptomicina  $100\mu\text{g/ml}$  + 10% Suero bovino fetal) tres veces.

El principio de este kit se basa en la unión específica del DNA a la membrana de sílica-gel mientras que los contaminantes la atraviesan. Los inhibidores de PCR como iones o proteínas son removidas completamente mediante los dos lavados, dejando al DNA en la membrana, el cual se eluye en agua bidestilada o en la solución amortiguadora (buffer AE) de baja fuerza iónica provista con el kit. La tecnología utilizada por este kit produce DNA genómico, mitocondrial o viral a partir de sangre para utilizarse en reacciones en cadena de la polimerasa (PCR).

### **Cuantificación de DNA**

El DNA genómico purificado se cuantificó por espectrofotometría a  $260\text{nm}$  y su calidad fue verificada a través de la relación  $260/280$ , tomando como buena calidad valores de cocientes entre 1.7 y 1.9.

Debido a que los ácidos nucleicos (DNA y RNA) absorben la luz ultravioleta (a un pico máximo de absorción de  $260\text{nm}$ ), se utiliza espectrofotometría para determinar la concentración de DNA en una solución. Dentro de un espectrofotómetro, la muestra (solución con DNA) es expuesta a un haz de luz ultravioleta con una longitud de onda de  $260\text{nm}$  y un fotodetector mide la cantidad de luz que pasa a través de la muestra. Entre más luz UV absorbida por la muestra, mayor será la concentración de DNA

en la muestra.

Utilizando la ley de Beer Lambert es posible relacionar la cantidad de luz UV absorbida con la concentración de la molécula que absorbe la luz (DNA). A una longitud de onda de 260nm, el coeficiente de extinción (constante específica para cada sustancia que mide la capacidad intrínseca de la sustancia para dispersar y absorber radiación electromagnética) para DNA de doble cadena es  $20 \text{ (mg/ml)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ; para DNA de cadena sencilla o para RNA es  $25 \text{ (mg/ml)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Entonces, una densidad óptica (OD) de 1 corresponde a 50  $\mu\text{g/ml}$  de DNA de doble cadena, 33  $\mu\text{g/ml}$  para DNA de cadena sencilla o RNA. Este método sirve para calcular la concentración de DNA incluso para valores de densidad óptica de 2.

El cociente de absorción de luz UV a 260nm vs. 280nm es utilizado comúnmente para medir la pureza del DNA con respecto a la contaminación por proteínas, debido a que las proteínas (en particular los aminoácidos aromáticos) absorben a luz UV a 280nm.

El DNA cuantificado se utilizó de inmediato para la tipificación o se guardó a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su utilización.

### **Tipificación de genes HLA**

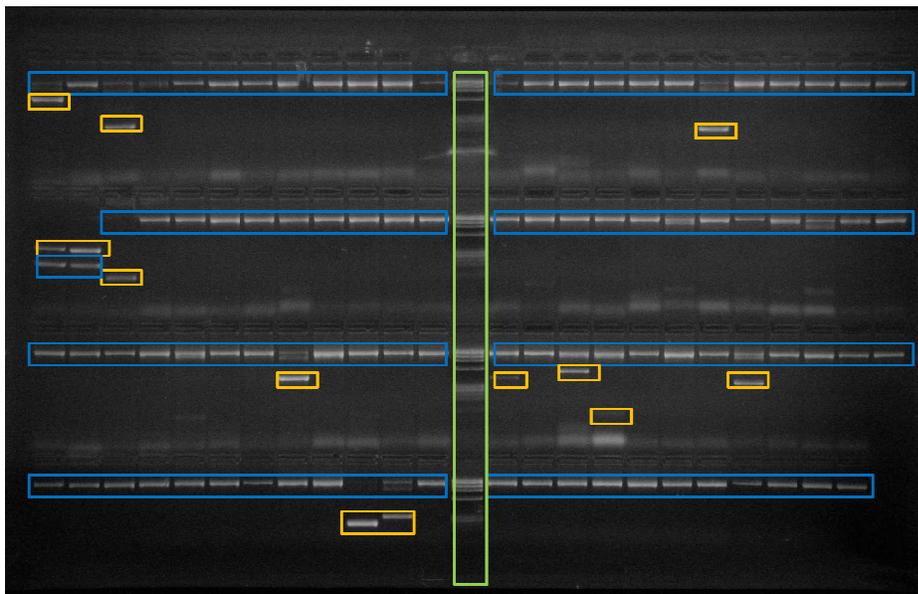
La tipificación de los genes A, B y C de HLA de clase I se realizó mediante PCR con primers secuencia específicos (SSP-PCR) con el kit ABC SSP UniTray (DynaL Biotech®, Invitrogen, Brown Deer, WI). Este método de tipificación es de baja a mediana resolución y es capaz de distinguir desde grupos alélicos hasta alelos en específico (resolución de tipificación de 2 a 4 dígitos). Este método de tipificación ha sido empleado ampliamente en la literatura<sup>59;61;106;107</sup> por lo que el nivel de resolución que proporciona es adecuado para los objetivos del presente trabajo y su implementación en el laboratorio fue factible en el momento de iniciar el estudio.

El kit de tipificación HLA consta de placas de 96 pozos, cada uno de los cuales contiene un par de primers distinto que amplifican regiones específicas de los 3 loci de HLA de clase I y que permiten definir polimorfismos útiles para la tipificación (pozos 1-24: gen HLA-A; pozos 25-73: gen HLA-B; pozos 74-95: gen HLA-C; pozo 96: control de contaminación). Cada pozo contiene además un par de primers que amplifican una banda control para validar la PCR en cada uno de los pozos. Cada tipificación requiere un volumen de 80 $\mu\text{l}$  de DNA con una concentración de 75-125ng/ $\mu\text{l}$ , el cual se agrega a la mezcla de PCR y se distribuye en cada uno de los pozos de una placa. Las condiciones de amplificación son las siguientes: Paso 1: 1 ciclo (1 minuto a  $96^\circ\text{C}$ ); Paso 2: 5 ciclos ( $96^\circ\text{C}$ -25s,  $70^\circ\text{C}$ -50s y  $72^\circ\text{C}$ -45s); Paso 3: 21 ciclos ( $96^\circ\text{C}$ -25s,  $65^\circ\text{C}$ -50s y  $72^\circ\text{C}$ -45s); Paso 4: 4 ciclos ( $96^\circ\text{C}$ -25s,  $55^\circ\text{C}$ -60s y  $72^\circ\text{C}$ -120s); Paso 5: mantener a  $4^\circ\text{C}$ .

Los 96 productos de PCR se cargan en un gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio, incluyendo marcadores de peso molecular (Fragmentos del fago  $\phi\text{X174}$  RF cortados con Hae III, Invitrogen). En la figura 15 se observa una fotografía representativa de un gel de agarosa cargado con los productos de SSP-PCR.

El tamaño de los productos de amplificación específicos cambia según el pozo y además se pueden presentar más de dos productos de PCR por pozo (además de la banda control). El tamaño esperado de los productos de cada PCR se puede consultar en las hojas de trabajo del gel, incluidas en el kit. El tamaño de las bandas control es de 1200pb para los pozos 1-24 y 27-96 y para los pozos 25 y 26 es de

200 pb. Los geles se fotodocumentaron en un transiluminador de luz UV y el patrón de bandas amplificadas se analizó con un software provisto por el fabricante (UniMatch Plus v3.2 de Dynal Biotech®) para obtener el haplotipo de HLA de cada uno de los pacientes. De igual manera se puede obtener el haplotipo mediante hojas de trabajo proporcionadas con el kit.



**Figura 15. Gel de agarosa cargado con productos de SSP-PCR.** Cada fila en el gel de agarosa consta de 25 pozos, los pozos se enumeran de izquierda a derecha en orden ascendente y comenzando por la fila de arriba. Las bandas control (en rectángulos azules) de los productos de PCR de los pozos 1-24 y 27-96 son de 1200pb y para los pozos 25-26 son de 200pb. Los marcadores de peso molecular (rectángulo verde) se encuentran cargados en el centro del gel. Las bandas positivas (en cuadros amarillos) tienen diferentes pesos moleculares en cada pozo, los cuales fueron comparados con la hoja de trabajo del kit de tipificación HLA. Las bandas que se pueden observar en la parte baja de cada carril de corrida corresponden a los primers no utilizados en las reacciones de PCR.

## Determinación de la Carga Viral de VIH

La carga viral (CV) es una prueba de amplificación de RNA del VIH para la determinación cuantitativa de las copias del virus en sangre periférica. En el contexto clínico, la CV es importante para tomar decisiones en cuanto al inicio del tratamiento antirretroviral altamente activo (TAVAA) y para monitorear cambios en la viremia durante el tratamiento, es un marcador para evaluar la eficacia del tratamiento para cada individuo y para predecir los cambios en las concentraciones de  $cT CD4^{+108-111}$ .

La cuantificación de la carga viral se llevó a cabo mediante el método RT-PCR Amplicor HIV-1 (Roche Molecular Diagnostics, Pleasanton, CA). Este procedimiento se basa en la retrotranscripción del RNA genómico viral y posterior amplificación del DNA complementario resultante mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

## Conteo de Linfocitos T CD4+

Los linfocitos humanos se clasifican en tres principales poblaciones de acuerdo a su función biológica y la expresión de antígenos de superficie celular: linfocitos T, linfocitos B y células NK (natural killers). Estos marcadores de superficie celular se denominan marcadores de diferenciación conocidos en la literatura como CD (del inglés, *cluster designation*). Los linfocitos ayudadores o cooperadores son una subpoblación de los linfocitos T ( $CD3^{+}$ ) que expresan en la superficie celular el marcador CD4. La cuantificación de los linfocitos  $CD3^{+}CD4^{+}$  se utiliza para caracterizar y hacer el seguimiento de

inmunodeficiencias<sup>112</sup>. Los recuentos de los linfocitos T ayudadores son útiles en el seguimiento de los individuos infectados con el VIH.

Mediante citometría de flujo se pueden detectar de forma sistemática distintas subpoblaciones de linfocitos. Para este estudio se utilizó el citómetro de flujo FACS Calibur (BD Biosciences, San Jose, CA). Para la cuantificación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> se utilizó un reactivo de inmunofluorescencia directa de tres colores llamado *TriTEST CD4/CD8/CD3* (BD Biosciences, San Jose, CA). Que está constituido por anticuerpos monoclonales conjugados a fluorocromos. El anti-CD4 esta conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) e identifica a los linfocitos T ayudadores/inductores por el antígeno CD4 Mr de 59 kDA.

Posteriormente las células marcadas con los anticuerpos se hacen pasar por el citómetro de flujo. Las células marcadas migran en fila por un capilar, una por una, y pasan a través del haz de un láser a 488 nm. La luz láser se dispersa y también provoca que las células teñidas emitan fluorescencia. Estas señales de dispersión y fluorescencia son detectadas por el equipo; se genera una señal visualizada en una gráfica de dos planos a partir de la cual se determina la cantidad de células que expresan el marcador de superficie buscado. Con estos datos el software MultiSET® calcula el número absoluto de células positivas por microlitro ( $\mu$ l) de sangre.

## **Análisis de Datos y Estadísticos**

### **Frecuencias Alélicas y Haplotípicas**

Las frecuencias de los alelos HLA pueden ser calculadas de dos maneras diferentes, que difieren en como son contados los homocigotos: la frecuencia poblacional, es la frecuencia de un tipo de alelo HLA por número de personas (en donde los homocigotos son contados como uno) y la frecuencia alélica es la frecuencia de un tipo de alelo HLA por número total de alelos (en donde los homocigotos son contados dos veces). Estos dos tipos de frecuencias se utilizan dependiendo del tipo de estudio. Para este estudio se calcularán las frecuencias alélicas debido a que nos interesa la proporción de los alelos HLA en la población y no la proporción de pacientes que portan cierto alelo HLA. Además, por cuestiones de uniformidad, la mayoría de los estudios utilizan las frecuencias alélicas HLA para caracterizar a las cohortes estudiadas.

La frecuencia alélica es el valor o medida de la frecuencia relativa de un alelo en un locus genético en una población. Normalmente, es expresada como proporción o porcentaje de valores que van de 0 a 1 o de 0 a 100%. En genética poblacional, las frecuencias alélicas son usadas para representar la diversidad genética a nivel individual, poblacional o especie. La frecuencia alélica parte de los siguientes supuestos: a) que existen un locus en un cromosoma y un gen que ocupa ese locus; b) una población de individuos que portan  $n$  loci en cada una de sus células somáticas (por ejemplo: dos loci en las células diploides, las cuales contienen dos pares de cromosomas); y c) la existencia de variantes o alelos del gen.

Por ejemplo, si la frecuencia de un alelo es de 20% (o 0.20) en una cohorte dada, entonces entre los miembros de la cohorte, uno en cinco cromosomas portarán ese alelo y cuatro de cinco cromosomas estarán ocupados por otras variantes del gen. Es importante notar que para genes diploides la fracción

de los individuos que portan este alelo es aproximadamente dos de cada diez. Si los alelos se distribuyen al azar, el teorema binomial aplicará: 32% de la población será heterocigota para el alelo (es decir, portarán una copia de ese alelo y una copia de otro alelo en cada célula somática) y 4% serán homocigotas para ese alelo (portando dos copias del alelo). En resumen, esto significa que se espera que 36% de los individuos diploides portarán un alelo que tiene una frecuencia alélica de 20%. Sin embargo, los alelos se distribuyen aleatoriamente solo bajo ciertos supuestos, incluyendo la ausencia de selección. Cuando estas condiciones aplican, se dice que las poblaciones se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg.

Para el análisis estadístico previamente se realizó la homologación del grado de resolución de la tipificación HLA a 2 dígitos (que definen el grupo alélico HLA). Las frecuencias alélicas se determinaron por conteo directo de los haplotipos y se corroboraron mediante la herramienta Frequency Analysis de la base de datos de VIH de Los Alamos (<http://www.hiv.lanl.gov/content/immunology/tools-links.html>). La frecuencia alélica (FA) se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$FA = \frac{\text{número de alelos}}{\text{número de alelos totales}}$$

Este resultado se suele multiplicar por 100 para obtener el porcentaje en valores que van de 0 a 100.

Por ejemplo, en la cohorte estudiada en esta tesis se encontraron 91 alelos que son HLA-A\*02 de 240 alelos tipificados (por cada loci), entonces:

$$FA \text{ de HLA-A*02} = 91/240 = 0.3791$$

La frecuencia alélica también representa la probabilidad de encontrar el alelo en la población si tomamos una muestra al azar, es decir, en nuestra cohorte la probabilidad de encontrar el alelo HLA-A\*02 es de 0.3791 o 37.91%.

La suma de todas las frecuencias alélicas debe ser 1 o 100 según la escala con la que se trabaje.

El equilibrio Hardy-Weinberg para cada locus se probó con el software Arlequin<sup>113</sup> (versión 3.11, website: <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>), el cual emplea una prueba exacta análoga a la prueba Fisher, teniendo en cuenta modificaciones al algoritmo de la cadena de Markov (descrito por Guo y Thompson<sup>114</sup>).

Las frecuencias haplotípicas fueron estimadas igualmente en Arlequin, utilizando el algoritmo de máxima verosimilitud (zipper version of expectation maximization). Debido al hecho de que la cohorte estaba compuesta por individuos no relacionados y de los cuales no se conoce sus antecedentes familiares, se realizó una estimación de la fase gamética más probable para cada individuo usando un algoritmo para predecir la fase gamética en que fueron heredados los haplotipos paternos y maternos.

### **Determinación de la existencia de Desequilibrio de Ligamiento**

La genética mendeliana plantea que las frecuencias de los alelos en un locus específico no influye la frecuencia de otro alelo en otro locus. Sin embargo para los genes HLA esto no aplica. Existen ejemplos dentro de los genes HLA en diferentes loci que aparecen juntos con más frecuencia de la esperada dado sus frecuencias alélicas. Este fenómeno es denominado desequilibrio de ligamiento.

El desequilibrio de ligamiento es una asociación no aleatoria de alelos en dos o más loci (normalmente

en el mismo cromosoma). Este fenómeno describe una situación en donde algunas combinaciones de alelos (o marcadores genéticos) ocurren a frecuencias más altas de lo que se espera por la formación aleatoria de haplotipos de alelos basados en sus frecuencias alélicas. El desequilibrio de ligamiento es generalmente causado por el ligamiento genético y por la tasa de recombinación (entre los alelos). Como se explicó en la sección de introducción, los alelos HLA se heredan en haplotipo (en paquete) y la tasa de recombinación entre estos alelos es baja (<1%) debido a la cercanía de los loci de los genes dentro del cromosoma. La alta frecuencia de estos haplotipos HLA puede representar una ventaja inmunológica, por lo que son seleccionados positivamente.

En este trabajo se buscó la existencia de desequilibrio de ligamiento entre los alelos HLA encontrados mediante la herramienta *HLA Linkage Disequilibrium* ofrecida por la base de datos de VIH de los Alamos. Este software en línea toma las frecuencias de alelos HLA y busca la existencia de desequilibrio de ligamiento mediante pruebas exactas de Fisher. Esta prueba toma en cuenta la cantidad de alelos HLA distintos para cada locus.

Para establecer el valor máximo significativo de los valores p para las comparaciones de dos vías se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Valor p máximo} = 0.05/\text{número de pruebas realizadas}$$

$$\text{Número de pruebas de dos vías} = (A*B)+(A*C)+ (B*C)$$

Siendo las letras mayúsculas los alelos distintos encontrados para cada locus HLA.

### **Valores de Carga Viral/Linfocitos T CD4+ y asociaciones con alelos HLA**

Los datos de las variables biológicas (carga viral y el conteo de linfocitos T CD4<sup>+</sup>) de los pacientes se analizaron con estadísticas univariadas (medidas de tendencia central y de dispersión). Se buscaron efectos significativos de la presencia de alelos HLA específicos en la magnitud de la carga viral y los conteos de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de los pacientes. Estas correlaciones se analizaron mediante pruebas exactas de Fisher corregidas para múltiples comparaciones con valores q de Storey<sup>115</sup>. El valor q es definido como el análogo de la tasa de descubrimiento de asociaciones falsas del valor p. El valor q de una hipótesis individual es la tasa de descubrimiento de asociaciones falsas mínima en la cual la prueba puede ser llamada significativa. Una aproximación es estimar directamente el valor q en lugar de decidir un punto de corte para el valor de la tasa de descubrimiento de valores falsos. El control de la tasa de descubrimiento de valores falsos es un método estadístico utilizado para pruebas múltiples de hipótesis para corregir en múltiples comparaciones. El control de este parámetro estadístico predice la proporción esperada de hipótesis nulas rechazadas (errores tipo I). Para este estudio, valores q<0.2 fueron tomados como significativos, lo cual significa que dentro del total de asociaciones observadas como significativas se espera que un 20% sean asociaciones espurias.

Los procedimientos de análisis estadístico se realizaron en StatView versión 4.57 y el software R<sup>116</sup> (versión 2.6.2). Para el análisis se eliminaron los alelos con n menores a 2 para disminuir el número de comparaciones y para obtener asociaciones más consistentes. Los alelos eliminados del análisis fueron: HLA-A\*25, 23 y 34; HLA-B\*13, 37 y 27; y HLA-Cw\*18 y 14, todos con una n de 1.

### **Comparaciones de frecuencias alélicas HLA de VIH positivos contra otras poblaciones VIH negativas**

Se realizaron comparaciones entre las frecuencias alélicas de VIH positivos encontradas en este estudio y las frecuencias alélicas HLA reportadas para mestizos mexicanos del centro del país (Gorodezky et al<sup>104</sup>), caucásicos e hispanos viviendo en los Estados Unidos (Cao et al<sup>105</sup>). Estas comparaciones se llevaron a cabo mediante pruebas exactas de Fisher corregidas para múltiples comparaciones con valores  $q$  de Storey, utilizando el software R (versión 2.6.2).

### **Búsqueda de Epítomos de CTLs restringidos por los alelos HLA más frecuentes**

La búsqueda de epítomos de CTLs restringida por los alelos HLA más frecuentes en la cohorte se realizó en la base de datos de VIH de los Alamos. La base de datos de VIH de Los Alamos<sup>117</sup> contiene secuencias genómicas de VIH, epítomos inmunológicos, mutaciones asociadas a resistencia a fármacos y ensayos de vacunas. Esta base de datos fue fundada por la división del SIDA del *National Institute of Allergy and Infectious Diseases* (NIAID), como parte de los Institutos Nacionales de Salud (NIH) de Estados Unidos. La Base de Datos de Los Alamos<sup>117</sup> también cuenta con un gran número de herramientas que se pueden utilizar para analizar estos datos.

La base de datos recopila la información de todos los epítomos de CTLs reportados para el VIH. En la búsqueda de epítomos reportados se pueden restringir varios parámetros como: gen del VIH, por subtipo de VIH, inmunógeno utilizado, en que especie se buscó, alelo restrictor, país de publicación, autor y palabra clave.

El perfil de búsqueda de epítomos de CTLs para este trabajo fue el siguiente: a) se buscaron epítomos definidos reportados para todas las proteínas del virus; b) se escogieron los epítomos reportados para el subtipo B del VIH (predominante en México<sup>118-120</sup>); c) se buscaron los epítomos para cuya definición se utilizaron todos los inmunógenos (VIH más otras infecciones); d) se restringió la búsqueda a genes HLA (humanos); e) y se seleccionaron los epítomos restringidos por los grupos alélicos más frecuentes (frecuencia mayor a 0.1) en la cohorte de pacientes VIH+ mexicanos estudiada. En las tablas 19, 20 y 21 se observan los epítomos reportados para los loci A, B y C, respectivamente.

## RESULTADOS

### Frecuencias Alélicas HLA

En este estudio se realizó la tipificación de los grupos alélicos HLA en los loci HLA-A, B y C en 120 pacientes VIH positivos no relacionados en etapa crónica de la enfermedad y sin tratamiento antirretroviral previo, provenientes de 4 estados del centro del país (Distrito Federal, Estado de México, Puebla e Hidalgo). La cohorte de pacientes VIH positivos estaba conformada por 96 hombres (80%) y 24 mujeres (20%). Al estratificar por número de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, la cohorte cuenta con 70 pacientes en etapa intermedia de la enfermedad (>200 células/μl) y 50 en etapa tardía de la enfermedad (<200 células/μl). En la tabla 5 se pueden observar las características generales de la cohorte de VIH positivos así como las estadísticas univariadas de parámetros clínicos (carga viral y conteo de linfocitos T CD4<sup>+</sup>) de los 120 pacientes.

**Tabla 5. Características de la cohorte de VIH+ del centro de México**

Parámetros Clínicos	Promedio	D. Estándar	Mediana
Conteo linfocitos T CD4 <sup>+</sup> (células/μl de sangre)	264.94	206.73	251.5
Carga Viral (copias RNA de VIH/ml de plasma)	199,697.2	266,398.34	93,350
Log Carga Viral	4.818	0.781	4.969
<b>Estratificación por conteo de linfocitos T CD4<sup>+</sup></b>			
Etapa Intermedia de la enfermedad (>200 CD4)	70 pacientes		
Etapa tardía de la enfermedad (<200 CD4)	50 pacientes		
<b>Género</b>			
Masculino	96 (80%)		
Femenino	24 (20%)		

La resolución de la tipificación HLA de los pacientes fue homologada a dos dígitos (que define el grupo alélico HLA) para estandarizar la resolución de todas las tipificaciones, debido a que el kit de tipificación HLA es de mediana a baja resolución y no puede resolver alelos específicos para cada grupo alélico. En la tabla 6 se muestran los haplotipos HLA y los valores clínicos de los 120 pacientes VIH positivos.

**Tabla 6. Haplotipos HLA de pacientes VIH+ y parámetros clínicos.**

PACIENTE	Haplotipo HLA						Parámetros Clínicos		
	Gen HLA-A		Gen HLA-B		Gen HLA-C		Linfocitos CD4 <sup>+</sup> (células/μl de sangre)	Carga Viral (copias RNA de VIH/ml)	Log Carga Viral
001-ESN	A29	A68	B39	B48	Cw07	Cw15	23	997000	5.999
002-LAHR	A02	A02	B39	B51	Cw12	Cw15	3	15800	4.199
003-PAS	A02	A03	B35	B35	Cw04	Cw15	14	1000000	6.000
004-JCJB	A02	A03	B39	B51	Cw07	Cw12	7	1000000	6.000
005-EVG	A02	A24	B51	B39	Cw07	Cw08	282	25400	4.405
006-EJCRA	A11	A24	B07	B48	Cw07	Cw08	58	217000	5.336
007-MCFRC	A02	A24	B39	B55	Cw04	Cw07	133	192000	5.283
008-JJC	A02	A33	B14	B15	Cw01	Cw08	7	65300	4.815
009-RGS	A02	A24	B40	B40	Cw03	Cw03	56	151000	5.179
010-CVCV	A02	A68	B35	B35	Cw04	Cw04	6	170000	5.230
011-OERC	A02	A24	B35	B39	Cw04	Cw12	198	913000	5.960
012-MAVD	A02	A02	B15	B49	Cw01	Cw07	20	750000	5.875
013-VRA	A68	A68	B49	B50	Cw07	Cw07	33	308000	5.489
014-JJPC	A31	A36	B35	B44	Cw04	Cw04	19	338000	5.529

015-ISG	A02	A24	B35	B35	Cw04	Cw07	51	352000	5.547
016-AME	A02	A31	B15	B39	Cw01	Cw07	335	242000	5.384
017-AER	A02	A24	B39	B44	Cw07	Cw16	13	245000	5.389
018-AIGG	A02	A02	B40	B51	Cw03	Cw16	38	451000	5.654
019-CSS	A02	A31	B35	B40	Cw03	Cw04	265	22700	4.356
020-HMA	A01	A30	B44	B55	Cw03	Cw16	157	240000	5.380
021-JCRM	A02	A30	B18	B44	Cw05	Cw16	282	100000	5.000
022-UCR	A29	A31	B40	B44	Cw03	Cw05	251	278000	5.444
023-RGG	A02	A31	B39	B48	Cw07	Cw08	274	4180	3.621
024-RMO	A24	A30	B13	B40	Cw06	Cw08	218	62900	4.799
025-MAOA	A29	A29	B39	B55	Cw07	Cw16	79	54300	4.735
026-FJRC	A33	A68	B38	B39	Cw07	Cw18	461	11900	4.076
027-RCAM	A24	A29	B39	B44	Cw07	Cw16	167	143000	5.155
028-CSC	A01	A29	B35	B55	Cw07	Cw07	145	354000	5.549
029-FJLC	A02	A02	B39	B51	Cw07	Cw08	195	99500	4.998
030-JAPB	A11	A24	B18	B18	Cw05	Cw12	315	436000	5.639
031-GMR	A02	A02	B39	B51	Cw07	Cw15	308	90600	4.957
032-APS	A68	A68	B44	B44	Cw05	Cw16	152	789000	5.897
033-JMGC	A01	A24	B15	B18	Cw07	Cw12	190	335000	5.525
034-JGAM	A02	A11	B08	B35	Cw04	Cw07	646	7280	3.862
035-ATI	A02	A02	B35	B49	Cw04	Cw07	352	12900	4.111
036-GOR	A02	A02	B39	B58	Cw03	Cw07	236	7290	3.863
037-OMH	A02	A02	B39	B51	Cw01	Cw07	168	53300	4.727
038-JRCA	A33	A24	B35	B39	Cw04	Cw08	502	63300	4.801
039-LELE	A02	A26	B14	B49	Cw07	Cw08	391	126000	5.100
040-JCMG	A31	A31	B35	B39	Cw07	Cw15	343	1670	3.223
041-JRS	A02	A68	B40	B55	Cw03	Cw15	305	25100	4.400
042-VIHV	A02	A33	B14	B35	Cw04	Cw08	475	10800	4.033
043-ESV	A02	A26	B44	B48	Cw08	Cw16	23	126000	5.100
044-GOG	A02	A11	B08	B41	Cw07	Cw17	203	53300	4.727
045-CBM	A02	A68	B35	B39	Cw04	Cw07	26	405000	5.607
046-AZP	A01	A24	B07	B08	Cw07	Cw07	262	237000	5.375
047-ACC	A02	A03	B07	B40	Cw03	Cw15	49	95900	4.982
048-SHCO	A02	A02	B39	B55	Cw07	Cw07	346	31600	4.500
049-FCJ	A03	A68	B07	B35	Cw04	Cw07	81	153000	5.185
050-AVH	A24	A68	B15	B52	Cw03	Cw03	8	100000	5.000
051-CSM	A02	A02	B15	B48	Cw01	Cw08	379	32000	4.505
052-NCV	A02	A24	B39	B58	Cw07	Cw07	87	50800	4.706
053-PJOV	A02	A11	B40	B52	Cw03	Cw12	340	96700	4.985
054-OFCC	A24	A30	B18	B40	Cw05	Cw15	231	25200	4.401
055-JHMC	A02	A30	B15	B37	Cw02	Cw06	364	25200	4.401
056-JLAA	A02	A68	B35	B35	Cw01	Cw04	163	7460	3.873
057-JTO	A02	A68	B39	B52	Cw03	Cw07	401	90800	4.958
058-ALP	A02	A26	B07	B39	Cw07	Cw15	685	5550	3.744
059-FBF	A01	A03	B07	B57	Cw07	Cw07	440	654	2.816
060-JBAG	A02	A02	B15	B52	Cw01	Cw07	244	173000	5.238
061-JJS	A02	A02	B35	B51	Cw04	Cw07	193	18600	4.270
062-JLASA	A30	A68	B07	B38	Cw07	Cw12	585	21000	4.322
063-VMO	A02	A11	B51	B52	Cw12	Cw15	14	1000000	6.000
064-JGAG	A03	A24	B07	B35	Cw03	Cw07	596	11300	4.053
065-VMH	A24	A31	B15	B39	Cw01	Cw07	616	5260	3.721
066-GEP	A02	A02	B40	B44	Cw05	Cw08	132	1000000	6.000
067-GMR	A02	A68	B07	B39	Cw07	Cw07	403	715000	5.854
068-JVLC	A25	A31	B39	B44	Cw02	Cw07	478	96300	4.984

069-VHRC	A01	A31	B35	B57	Cw04	Cw07	361	2990	3.476
070-KVG	A02	A68	B15	B39	Cw01	Cw07	301	46100	4.664
071-RPN	A01	A26	B08	B45	Cw07	Cw16	133	354000	5.549
072-RMC	A02	A30	B14	B44	Cw05	Cw08	571	469000	5.671
073-JAMO	A29	A68	B39	B45	Cw06	Cw07	8	1000000	6.000
074-LACR	A24	A68	B15	B40	Cw02	Cw03	84	144000	5.158
075-EJSM	A02	A02	B27	B44	Cw01	Cw16	292	3500	3.544
076-NGMR	A02	A26	B07	B39	Cw07	Cw07	635	1100	3.041
077-GPV	A02	A23	B35	B44	Cw04	Cw04	339	404000	5.606
078-OBV	A24	A24	B40	B44	Cw08	Cw08	248	19900	4.299
079-MPMH	A24	A24	B39	B55	Cw07	Cw07	548	12000	4.079
080-VMAH	A02	A24	B38	B50	Cw06	Cw12	295	29900	4.476
30-EARV	A36	A36	B53	B44	Cw04	Cw05	649	19000	4.279
31_MAR	A02	A68	B48	B58	Cw07	Cw04	559	2160	3.334
32-DMGN	A26	A24	B14	B18	Cw07	Cw08	513	49600	4.695
34-DBS	A02	A02	B35	B35	Cw04	Cw04	407	85100	4.930
8-RCG	A26	A68	B07	B35	Cw04	Cw07	63	220000	5.342
29-DGC	A24	A24	B35	B53	Cw01	Cw15	700	12200	4.086
41-RMV	A02	A68	B35	B39	Cw07	Cw07	74	192000	5.283
5-DVM	A30	A31	B15	B51	Cw01	Cw16	439	31600	4.500
40-MOM	A02	A24	B35	B39	Cw04	Cw07	26	307000	5.487
12-EMC	A02	A68	B35	B39	Cw04	Cw07	301	98300	4.993
17-MRGS	A02	A68	B39	B55	Cw07	Cw07	11	244000	5.387
51-DGG	A02	A32	B15	B15	Cw02	Cw12	44	418000	5.621
52-JVA	A02	A30	B18	B51	Cw05	Cw15	226	193000	5.286
53-RSDA	A02	A29	B44	B45	Cw05	Cw16	410	90000	4.954
54-AJH	A02	A31	B35	B52	Cw03	Cw04	485	31700	4.501
56-ACC	A02	A32	B35	B41	Cw04	Cw17	395	7640	3.883
57-JEAF	A02	A31	B35	B48	Cw04	Cw08	290	185000	5.267
58-EAM	A02	A02	B35	B40	Cw03	Cw04	252	663000	5.822
60-MGHC	A02	A33	B14	B48	Cw08	Cw08	181	733000	5.865
61-JLC	A24	A24	B35	B39	Cw04	Cw07	166	387000	5.588
62-ALPG	A02	A68	B35	B39	Cw04	Cw07	155	159000	5.201
63-ESG	A02	A02	B39	B52	Cw04	Cw07	11	296000	5.471
64-JMVC	A02	A24	B15	B35	Cw01	Cw04	20	136000	5.134
67-ALP	A02	A32	B48	B58	Cw07	Cw08	569	1980	3.297
68-JAHM	A01	A68	B14	B35	Cw04	Cw04	301	35600	4.551
69-FEG	A02	A68	B15	B15	Cw01	Cw01	286	49600	4.695
70-DHR	A29	A34	B40	B49	Cw06	Cw07	189	23800	4.377
71-ECS	A24	A31	B14	B35	Cw02	Cw04	291	10100	4.004
72-ARRM	A02	A29	B35	B35	Cw04	Cw04	12	639000	5.806
73-AMR	A31	A31	B35	B48	Cw04	Cw08	286	82900	4.919
74-ORSR	A24	A68	B35	B51	Cw04	Cw14	360	132000	5.121
76-EAR	A24	A30	B14	B49	Cw07	Cw08	509	500	2.699
77-IAG	A03	A33	B14	B35	Cw04	Cw08	1188	13900	4.143
78-RPA	A02	A24	B39	B52	Cw03	Cw07	315	14700	4.167
79-RDRG	A02	A02	B35	B39	Cw04	Cw07	25	408000	5.611
80-JRJ	A03	A24	B15	B38	Cw12	Cw12	436	2720	3.435
81-ASP	A01	A68	B35	B57	Cw04	Cw06	103	104000	5.017
82-SBG	A29	A33	B14	B44	Cw08	Cw16	462	6630	3.822
83-FOM	A02	A33	B14	B15	Cw01	Cw08	250	50300	4.702
86-ARGG	A02	A26	B35	B44	Cw04	Cw04	497	3300	3.519

La resolución de la tipificación HLA de los pacientes fue homologada a dos dígitos (que define el grupo alélico HLA) para estandarizar la resolución de todas las tipificaciones.

Se encontraron 16, 24 y 14 grupos alélicos diferentes en los genes HLA-A, HLA-B y HLA-C, respectivamente. Las frecuencias genotípicas observadas en los loci HLA-A, B y C se encontraron en equilibrio Hardy-Weinberg (Tabla 7). El principio de Hardy-Weinberg establece que tras una generación de apareamiento al azar, las frecuencias de los genotipos de un locus individual se fijarán en un valor de equilibrio particular, siendo estas frecuencias al equilibrio una función sencilla de las frecuencias alélicas de ese locus. Para analizar si las frecuencias alélicas y genotípicas de los genes HLA-A, B y C en la cohorte de pacientes VIH positivos mexicanos se encontraban en equilibrio al transmitirse los diferentes alelos de generación en generación, se realizó un análisis de desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg. Se buscó si la cohorte analizada presentaba este tipo de desviaciones comparando las frecuencias genotípicas reales de la población y las frecuencias genotípicas esperadas en caso de existir equilibrio de Hardy-Weinberg, utilizando pruebas exactas de Fisher. No se observaron desviaciones significativas del equilibrio de Hardy-Weinberg para ninguno de los loci HLA (Tabla 7). Esto puede entenderse al no observarse diferencias ( $p < 0.05$ ) entre las frecuencias fenotípicas reales y las esperadas según este principio para cada locus.

**Tabla 7. Equilibrio Hardy-Weinberg en los loci HLA-A, B y C**

Locus	# de Genotipos	Frecuencia Heterocigotos Observados	Frecuencia Heterocigotos Esperados	Valor p
A	120	0.75833	0.80847	0.36793
B	120	0.90833	0.90865	0.0756
C	120	0.8	0.84341	0.20003

Analizado en Arlequin versión 3.11 realizando una prueba Hardy-Weinberg para cada locus. No se obtuvo ningún valor p significativo ( $p < 0.05$ ) por lo que las frecuencias genotípicas de los tres genes se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg.

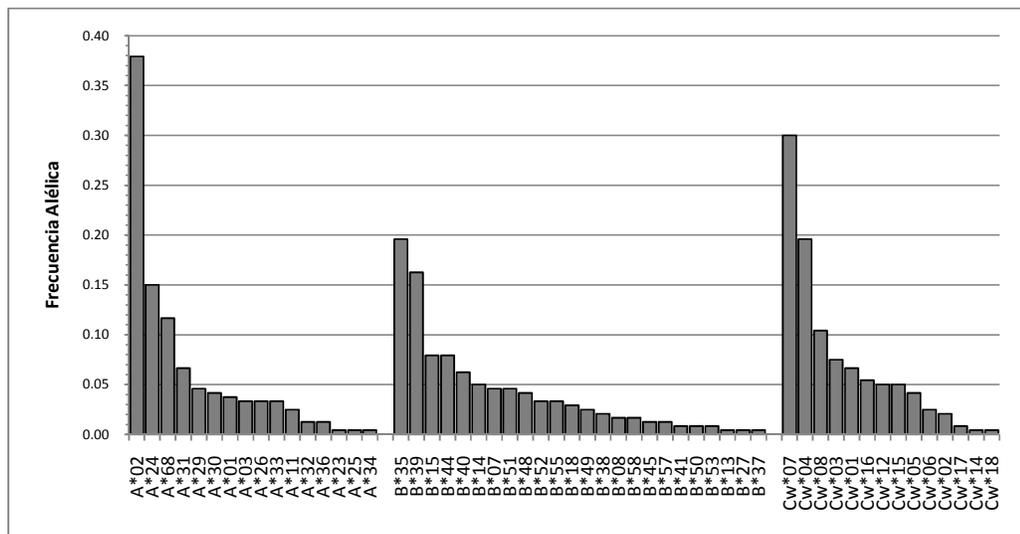
Para describir inmunogenéticamente a la cohorte de VIH positivos de este estudio, se calcularon las frecuencias alélicas HLA por conteo directo, tomando como base el número total de alelos para cada loci HLA en la cohorte. El número total de alelos para cada loci fue de 240 alelos (2 alelos por cada paciente). Los alelos más frecuentes del locus HLA-A fueron: A\*02 (frecuencia alélica=0.37), A\*24 (0.15), A\*68 (0.11) y A\*31 (0.06), seguidos por A\*29, A\*30, A\*01, A\*03, A\*26, A\*33 y A\*11 con una frecuencia mayor al 0.2 (Tabla 8; Figura 16). Los alelos más frecuentes para el locus HLA-B fueron: B\*35 (frecuencia alélica=0.19), B\*39 (0.16), B15 (0.07), B44 (0.07), B40 (0.06) y B14 (0.05), seguidos por B\*51, B\*07, B\*48, B\*52, B\*55, B\*18 y B\*49 con una frecuencia mayor a 0.2 (Tabla 8; Figura 16). En cuanto al locus HLA-C, los alelos más frecuentes fueron: Cw\*07 (frecuencia alélica=0.3), Cw\*04 (0.19), Cw\*08 (0.10), Cw\*03 (0.07) y Cw\*01 (0.06), seguidos por Cw\*16, Cw\*12, Cw\*15, Cw\*05, Cw\*06 y Cw\*02 con una frecuencia mayor a 0.2 (Tabla 8; Figura 16). Característicamente, el 52% de los alelos encontrados en la cohorte eran A\*02 o A\*24 del gen A, más del 35% de los alelos eran B\*35 o B\*39 y casi el 50% de los alelos eran Cw\*07 o Cw\*04.

**Tabla 8. Distribución de Frecuencias Alélicas HLA (genes A, B y C)**

Locus HLA-A			Locus HLA-B			Locus HLA-C		
Alelo	# de alelos (N)	F. Alélica	Alelo	# de alelos (N)	F. Alélica	Alelo	# de alelos (N)	F. Alélica
A*01	9	0.0375	B*07	11	0.0458	Cw*01	16	0.0667
A*02	91	0.3792	B*08	4	0.0167	Cw*02	5	0.0208
A*03	8	0.0333	B*13	1	0.0042	Cw*03	18	0.0750

A*11	6	0.0250	B*14	12	0.0500	Cw*04	47	0.1958
A*23	1	0.0042	B*15	19	0.0792	Cw*05	10	0.0417
A*24	36	0.1500	B*18	7	0.0292	Cw*06	6	0.0250
A*25	1	0.0042	B*27	1	0.0042	Cw*07	72	0.3000
A*26	8	0.0333	B*35	47	0.1958	Cw*08	25	0.1042
A*29	11	0.0458	B*37	1	0.0042	Cw*12	12	0.0500
A*30	10	0.0417	B*38	5	0.0208	Cw*14	1	0.0042
A*31	16	0.0667	B*39	39	0.1625	Cw*15	12	0.0500
A*32	3	0.0125	B*40	15	0.0625	Cw*16	13	0.0542
A*33	8	0.0333	B*41	2	0.0083	Cw*17	2	0.0083
A*34	1	0.0042	B*44	19	0.0792	Cw*18	1	0.0042
A*36	3	0.0125	B*45	3	0.0125	Total	240	1.0000
A*68	28	0.1167	B*48	10	0.0417			
Total	240	1.0000	B*49	6	0.0250			
			B*50	2	0.0083			
			B*51	11	0.0458			
			B*52	8	0.0333			
			B*53	2	0.0083			
			B*55	8	0.0333			
			B*57	3	0.0125			
			B*58	4	0.0167			
			Total	240	1.0000			

Las frecuencias alélicas se determinaron por conteo directo de los haplotipos. El número total de alelos para cada locus fue de 240 (120 pacientes). Los grupos alélicos se encuentran ordenados alfabéticamente.



**Figura 16. Distribución Alélica HLA (genes A, B y C).** La resolución de la tipificación HLA de los pacientes fue homologada a dos dígitos (grupo alélico) para estandarizar la resolución de todas las tipificaciones. Las frecuencias alélicas se determinaron por conteo directo de los haplotipos. El número total de alelos para cada locus fue de 240 (2 por cada paciente). Los alelos se encuentran ordenados de manera decreciente por su frecuencia.

Para observar los alelos que se encuentran juntos con mayor frecuencia y para describir de mejor manera a los grupos alélicos HLA se obtuvieron las frecuencias haplotípicas HLA, las cuales fueron calculadas mediante Arlequin v. 3.11. Dado que la cohorte de VIH positivos de este estudio estaba compuesta por individuos no relacionados y sin antecedentes genéticos o genealógicos, se realizó una estimación de la fase gamética para cada individuo, es decir, se obtuvieron los haplotipos más probables heredados del padre y de la madre de cada individuo.

A partir de estos haplotipos se estimaron las frecuencias haplotípicas HLA de 2 y 3 loci de la cohorte de pacientes VIH positivos de este estudio.

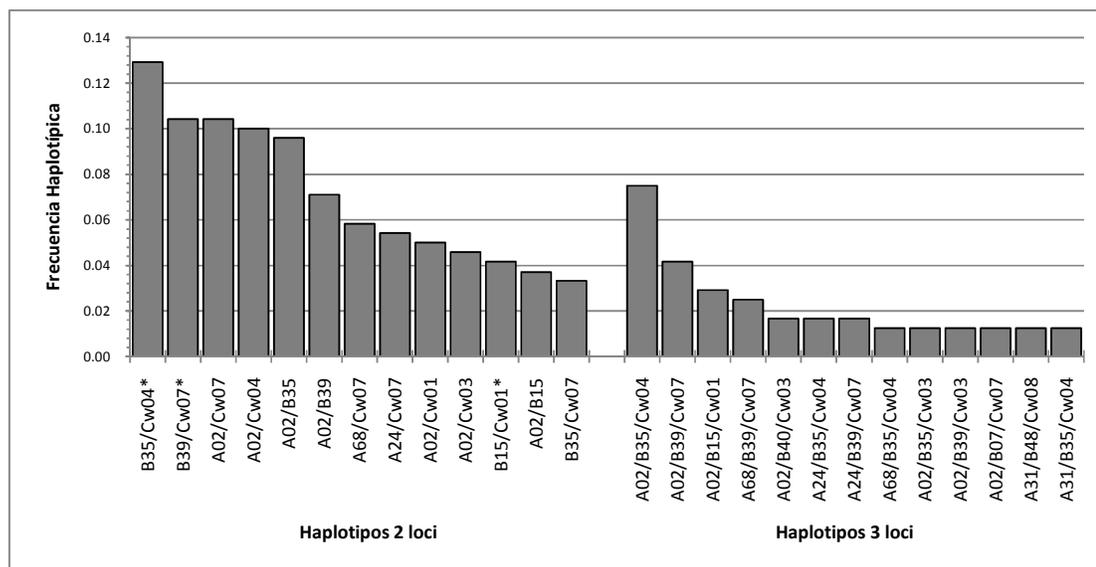
Se obtuvieron 276 haplotipos diferentes de 2 loci y 161 haplotipos diferentes de 3 loci. En la tabla 9 se muestran los haplotipos más frecuentes de 2 loci con frecuencias mayores a 0.01, los cuales representan el 23.5% (65 de 276) de los haplotipos diferentes encontrados. Los haplotipos de dos loci más comunes fueron: B\*35-Cw\*04 (frecuencia haplotípica = 0.1292), B\*39-Cw\*07 (0.1042), A\*02-Cw\*07 (0.1042), A\*02-Cw\*04 (0.1), A\*02-B\*35 (0.096), A\*02-B\*39 (0.0710), A\*68-Cw\*07 (0.0583), A\*24-Cw\*07 (0.0542), y A\*02-Cw\*01 (0.05). Los demás haplotipos y sus frecuencias se encuentran en la tabla 9 y figura 17.

En la tabla 9 se observan los haplotipos de 3 loci más frecuentes con frecuencias mayores a 0.01, las cuales representan el 8.07% (13 de 161) de los haplotipos diferentes estimados. Los haplotipos de 3 loci más comunes son: A\*02-B\*35-Cw\*04 (frecuencia haplotípica=0.07), A\*02-B\*39-Cw\*07 (0.04), A\*02-B\*15-Cw\*01 (0.02) y A\*68-B\*39-Cw\*07 (0.02) mostradas en la tabla 9 y figura 17.

**Tabla 9. Frecuencias haplotípicas más frecuentes (2 y 3 loci)**

Haplotipos 2 loci				Haplotipos 3 loci			
Haplotipo	Frecuencia	Haplotipo	Frecuencia	Haplotipo	Frecuencia	Haplotipo	Frecuencia
B35/Cw04*	0.1292	A33/Cw08*	0.0250	A02/B48	0.0130	A02/B35/Cw04	0.075000
B39/Cw07*	0.1042	A68/B35	0.0210	A31/B39	0.0130	A02/B39/Cw07	0.041667
A02/Cw07	0.1042	A24/B39	0.0210	A31/B48	0.0130	A02/B15/Cw01	0.029167
A02/Cw04	0.1000	B55/Cw07	0.0208	A24/B14	0.0130	A68/B39/Cw07	0.025000
A02/B35	0.0960	A01/Cw07	0.0208	A24/B15	0.0130	A02/B40/Cw03	0.016667
A02/B39	0.0710	A24/Cw12	0.0208	A29/B39	0.0130	A24/B35/Cw04	0.016667
A68/Cw07	0.0583	A31/Cw07	0.0208	B14/Cw04	0.0125	A24/B39/Cw07	0.016667
A24/Cw07	0.0542	A02/Cw08	0.0208	B14/Cw07	0.0125	A68/B35/Cw04	0.012500
A02/Cw01	0.0500	A02/Cw05	0.0208	B35/Cw03	0.0125	A02/B35/Cw03	0.012500
A02/Cw03	0.0458	A24/Cw08	0.0208	B39/Cw03	0.0125	A02/B39/Cw03	0.012500
B15/Cw01*	0.0417	A31/Cw04	0.0208	B08/Cw07	0.0125	A02/B07/Cw07	0.012500
A02/B15	0.0370	A24/B18	0.0170	B15/Cw02	0.0125	A31/B48/Cw08	0.012500
B35/Cw07	0.0333	A02/B44	0.0170	B51/Cw15	0.0125	A31/B35/Cw04	0.012500
B07/Cw07	0.0292	A02/B07	0.0170	B58/Cw07	0.0125		
B40/Cw03*	0.0292	A31/B35	0.0170	B44/Cw05*	0.0125		
A02/B51	0.0290	B44/Cw04	0.0167	A29/Cw07	0.0125		
A24/B35	0.0290	B52/Cw07	0.0167	A01/Cw04	0.0125		
A68/B39	0.0290	B44/Cw08	0.0167	A68/Cw04	0.0125		
A02/B40	0.0250	B49/Cw07	0.0167	A29/Cw16	0.0125		
A02/B14	0.0250	B18/Cw05	0.0167	A30/Cw08	0.0125		
B48/Cw08*	0.0250	A24/Cw04	0.0167	A31/Cw08	0.0125		
B44/Cw16*	0.0250	A01/B35	0.0130				

Las frecuencias haplotípicas fueron estimadas mediante el algoritmo de máxima verosimilitud empleando Arlequin, versión 3.11. Para los haplotipos de dos loci se encontraron 276 haplotipos diferentes y para los haplotipos de 3 loci se encontraron 161 haplotipos diferentes. En la tabla se observan las frecuencias haplotípicas >0.01 ordenadas de mayor a menor.\*Haplotipos que se encuentran en desequilibrio de ligamiento calculado por la herramienta *HLA Linkage Disequilibrium* (Los Alamos HIV Database).



**Figura 17. Distribución Haplótipica HLA (2 y 3 loci).** Las frecuencias haplotípicas fueron estimadas mediante el algoritmo de máxima verosimilitud empleando Arlequin, versión 3.11. En la gráfica se observan los haplotipos más frecuentes (frecuencias >0.03 para haplotipos de 2 loci y frecuencias >0.01 para los haplotipos de 3 loci) ordenados de mayor a menor.\*Haplotipos que se encuentran en desequilibrio de ligamiento calculado por la herramienta *HLA Linkage Disequilibrium* (Los Alamos HIV Database).

## Desequilibrio de Ligamiento

El fenómeno de desequilibrio de ligamiento es importante para la definición de haplotipos HLA en una población determinada, así como para el análisis de asociaciones entre la presencia de cierto alelo HLA y valores altos o bajos de carga viral o conteo de linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Se buscó la existencia de desequilibrio de ligamiento entre los alelos HLA encontrados mediante la herramienta *HLA Linkage Disequilibrium* de la base de datos de VIH de Los Alamos ([www.hiv.lanl.gov](http://www.hiv.lanl.gov)). Este software en línea toma las frecuencias alélicas de los haplotipos HLA de los pacientes y busca la existencia de desequilibrio de ligamiento mediante pruebas exactas de Fisher. Esta prueba toma en cuenta la cantidad de alelos HLA distintos para cada locus. En la tabla 10 se encuentran la cantidad de alelos distintos encontrados y la n de alelos encontrados, necesarios para calcular los niveles de confianza que necesita la prueba estadística realizada en esta sección.

**Tabla 10. Diferentes alelos HLA encontrados**

Locus HLA	Alelos distintos	Alelos Totales	Población (pacientes)
HLA-A	16	240	120
HLA-B	24	240	120
HLA-Cw	14	240	120

Los valores p para un nivel de confianza de 95% se calcularon con base al número de comparaciones de dos vías que se realizaron. Para establecer el valor máximo significativo de los valores p para las comparaciones de dos vías se utilizó la siguiente fórmula:

Valor p para comparaciones de dos vías para un nivel de confianza del 95% = 0.05/(número de pruebas de 2 vías realizadas)

$$\begin{aligned} \text{Número de pruebas de 2 vías realizadas} &= (A*B)+(A*C)+(C*A) \\ &= (16*24)+ (16*14)+ (24*14) = 384+224+336 = 944 \end{aligned}$$

Valor p máximo = 0.05/número de pruebas realizadas

$$= 0.05/944 = 5.297 \times 10^{-5} \text{ (95\% de confianza)}$$

En la tabla 11 se encuentran las 10 asociaciones de alelos con p significativas menores a  $5.297 \times 10^{-5}$  obtenidas mediante comparaciones de dos vías por pruebas exactas de Fisher. La frecuencia esperada de la presencia de dos alelos es el producto de sus frecuencias.

**Tabla 11. Desequilibrio de Ligamiento**

HLA1	HLA 2	Valor p	Ambos <sup>(1)</sup>	Sólo HLA1 <sup>(2)</sup>	Sólo HLA2 <sup>(3)</sup>	Ninguno de los alelos <sup>(4)</sup>	F(HLA1) <sup>(5)</sup>	F(HLA2) <sup>(6)</sup>	F(HLA1 y HLA2) <sup>(7)</sup>	E(F(HLA1 y HLA2)) <sup>(8)</sup>
B35	Cw04	9.90E-21	36	5	4	75	0.3417	0.3333	0.3	0.1139
B39	Cw07	6.19E-11	36	3	25	56	0.325	0.5083	0.3	0.1652
B15	Cw01	1.18E-08	11	6	4	99	0.1417	0.125	0.0917	0.0177
B14	Cw08	5.18E-07	10	2	13	95	0.1	0.1917	0.0833	0.0192
B40	Cw03	1.63E-06	9	5	7	99	0.1167	0.1333	0.075	0.0156
B44	Cw16	2.45E-06	9	9	4	98	0.15	0.1083	0.075	0.0163
A33	B14	6.46E-06	6	2	6	106	0.0667	0.1	0.05	0.0067
B48	Cw08	2.04E-05	8	2	15	95	0.0833	0.1917	0.0667	0.016
A33	Cw08	2.89E-05	7	1	16	96	0.0667	0.1917	0.0583	0.0128
B44	Cw05	4.91E-05	7	11	3	99	0.15	0.0833	0.0583	0.0125

HLA1 y HLA2 son los alelos en donde se encontraron asociaciones significativas; <sup>(1)</sup> número de individuos que expresan ambos alelos (HLA1 y HLA2); <sup>(2)</sup> número de individuos que expresan HLA1, pero no HLA2; <sup>(3)</sup> número de individuos que expresan HLA2, pero no HLA1; <sup>(4)</sup> número de individuos que no expresan HLA1 ni HLA2; <sup>(5)</sup> frecuencia observada de individuos con HLA1 en la población; <sup>(6)</sup> frecuencia observada de individuos con HLA2 en la población; <sup>(7)</sup> frecuencia observada de individuos con HLA1 y HLA2 en la población; <sup>(8)</sup> frecuencia esperada de F(HLA1 y HLA2) si las frecuencias de HLA1 y HLA2 son independientes.  $E(F(HLA1 \& HLA2)) = F(HLA1) * F(HLA2)$ . Valor p: calculado por prueba exacta de Fisher de dos colas. Este valor es un estimado de la probabilidad de que F(HLA1) y F(HLA2) son independientes, dado los datos observados. Un valor p pequeño indica que la ocurrencia de HLA1 y HLA2 están vinculados en la población. La matriz de contingencia es [[ambos, sólo HLA1], [sólo HLA2], [ninguno]].

De igual manera se realizó el cálculo para buscar desequilibrio de ligamiento de tres alelos. Para cada uno de los pares de HLA estadísticamente significativos descubiertos (Tabla 11) se realizó una prueba de Fisher contra un tercer alelo. Se utilizaron las siguientes fórmulas:

$$\text{Número de pruebas Fisher de tres vías posibles} = 3 * A * B * C = 16,128$$

Valor p para comparaciones de tres vías =  $0.05/(3 * A * B * C) = 3.10 \times 10^{-6}$  para un nivel de confianza del 95%. Para esta prueba no se encontró ninguna asociación significativa entre las asociaciones anteriores (Tabla 11) y un tercer alelo.

### **Asociaciones entre la presencia de grupos alélicos HLA y los valores de los parámetros clínicos (carga viral y conteo de linfocitos T CD4+)**

Con el objetivo de buscar factores de riesgo o protección hacia el avance de la enfermedad por VIH en la cohorte mexicana de VIH positivos se buscaron efectos significativos de la presencia de grupos alélicos HLA específicos en la magnitud de la carga viral o el conteo de linfocitos T CD4+ de los pacientes. Estas correlaciones se analizaron mediante pruebas exactas de Fisher corregidas para múltiples comparaciones con método de razón de descubrimiento de valores falsos (valor q de Storey<sup>115</sup>). Se tomaron como asociaciones significativas aquéllas que tuvieran valores  $p < 0.05$  y  $q < 0.2$ .

Aún cuando la mayoría de los pacientes de la cohorte de VIH positivos se encontraban en etapas intermedias o tardías de la enfermedad (véase Tabla 5 de esta sección) se pudieron observar algunas

asociaciones que podrían representar características particulares de susceptibilidad en la cohorte de VIH positivos mexicanos de este estudio. En la tabla 12 se observan los valores p y q para las asociaciones entre los alelos HLA y el parámetro de linfocitos T CD4<sup>+</sup>.

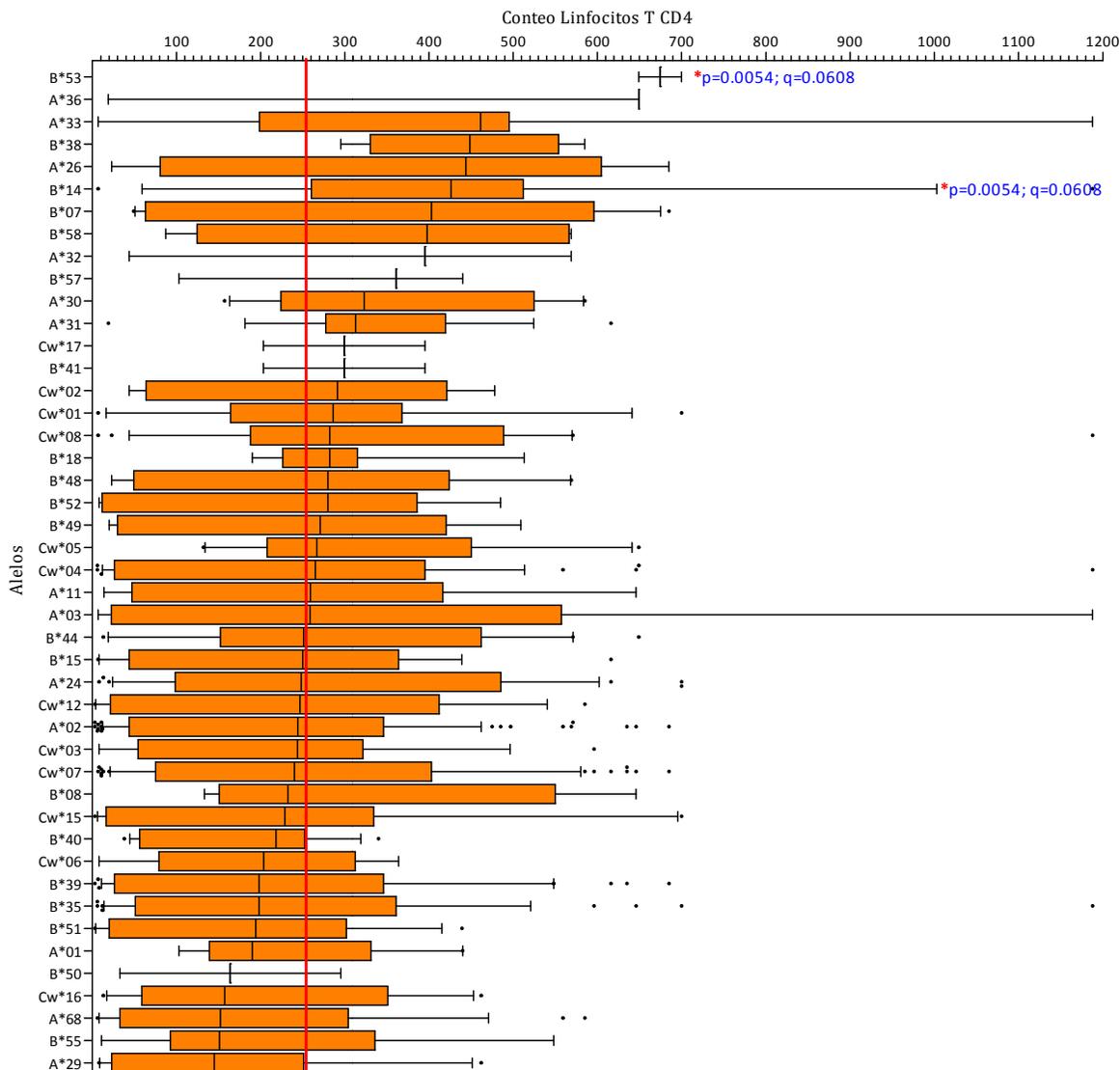
Los alelos B\*53 y B\*14 se asociaron positivamente a valores altos de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (Tabla 12; Figura 18 y 19) con valores p significativos (p=0.0054, q=0.06 y p=0.0067, q=0.06, respectivamente), estos grupos alélicos no se han reportado antes como factores de protección a la enfermedad o se asocian inconsistentemente con la protección a la enfermedad a lo largo de las cohortes estudiadas.

En la tabla 13 se muestran los valores p y q para las asociaciones entre los alelos HLA y la carga viral. Los alelos B\*58 y B\*57 se asociaron positivamente con valores bajos de carga viral (Tabla 13; Figura 20 y 21) con valores p y q significativos (p=0.0097, q=0.0273 y p=0.0215, q=0.0303, respectivamente). Los alelos B\*57 y B\*58 se han asociado consistentemente en varias cohortes de VIH positivos con composiciones étnicas diferentes con una lenta progresión a la enfermedad<sup>64;123;124</sup>.

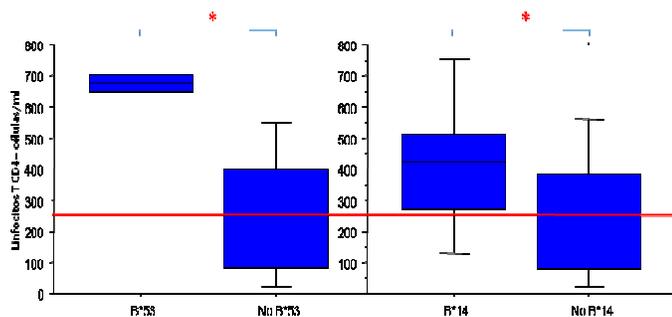
**Tabla 12. Asociaciones de alelos HLA y número de linfocitos T CD4<sup>+</sup>**

Gen A			Gen B			Gen C		
Alelo	Valor p	Valor q	Alelo	Valor p	Valor q	Alelo	Valor p	Valor q
A33	0.0175	0.2275	B53**	0.0054	0.06086336	Cw08	0.0526	0.6312
A68	0.0810	0.3747714	B14**	0.0067	0.06086336	Cw16	0.2435	0.9423
A29	0.1438	0.3747714	B38	0.0917	0.5254234	Cw06	0.3857	0.9423
A02	0.1573	0.3747714	B40	0.1248	0.5254234	Cw05	0.4085	0.9423
A30	0.1676	0.3747714	B51	0.1446	0.5254234	Cw12	0.4306	0.9423
A26	0.1751	0.3747714	B07	0.1924	0.5825925	Cw03	0.5634	0.9423
A31	0.2018	0.3747714	B39	0.2986	0.7227902	Cw07	0.7887	0.9423
A03	0.2571	0.4177875	B58	0.3732	0.7227902	Cw01	0.809	0.9423
A32	0.5776	0.77051	B55	0.4409	0.7227902	Cw17	0.8367	0.9423
A01	0.5927	0.77051	B45	0.4631	0.7227902	Cw02	0.8568	0.9423
A36	0.6599	0.7798818	B50	0.464	0.7227902	Cw15	0.9174	0.9423
A24	0.9161	0.9399	B15	0.4774	0.7227902	Cw04	0.9423	0.9423
A11	0.9399	0.9399	B52	0.5435	0.7595691			
			B08	0.6984	0.8071712			
			B44	0.7292	0.8071712			
			B49	0.7919	0.8071712			
			B18	0.7951	0.8071712			
			B57	0.7997	0.8071712			
			B41	0.8487	0.8115433			
			B48	0.9146	0.8308302			
			B35	0.9621	0.8323615			

Los alelos con n menor a 2 fueron eliminados para ajustar el número de comparaciones y para obtener asociaciones más consistentes. \*\*Asociaciones significativas corregidas con valor q significativo. Se tomaron como asociaciones significativas aquellas que tuvieron valores de p<0.05 y q<0.2.



**Figura 18. Box plots de los conteos de linfocitos T CD4+ entre los diferentes grupos alélicos HLA.** Box Plot de los valores de conteo de linfocitos T CD4 comparando todos los alelos HLA. Las cajas naranjas representan el 50% de los datos (percentil 25-75), la caja naranja más las barras lineales representan el 80% de los datos (percentil 10-90) y los datos fuera de esos percentiles están representados en puntos negros. La línea central de las cajas es la mediana de cada una de las categorías y la línea roja es la mediana de todos los datos (mediana: 251.5 linfocitos TCD4). Los valores p y q asociados a los alelos B\*53 y B\*14 observados en esta gráfica fueron obtenidos al comparar los valores de linfocitos T CD4 de los pacientes positivos para el alelo específico contra los valores (T CD4) de todos los pacientes negativos para ese alelo específico.



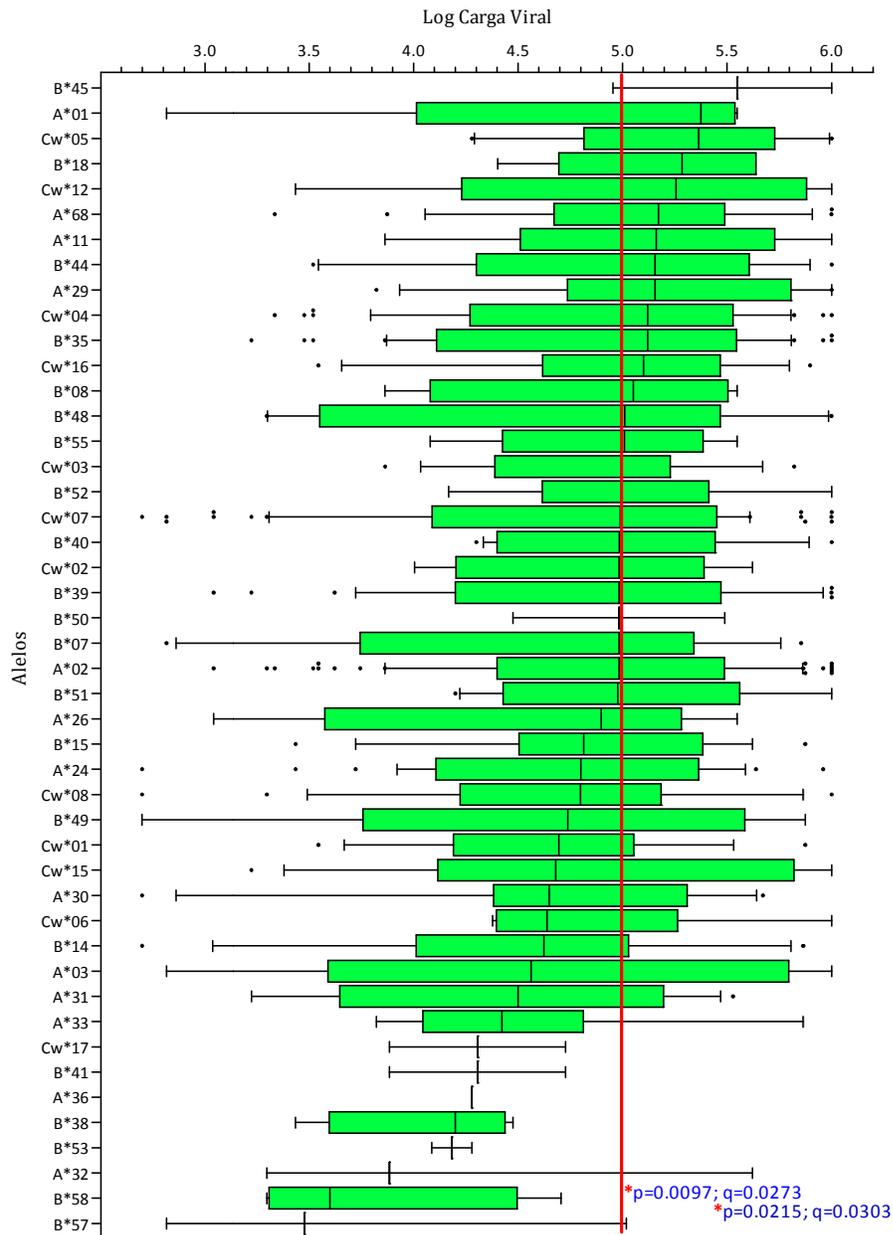
**Figura 19. Box plot del conteo de linfocitos CD4<sup>+</sup> de pacientes B\*53 positivos vs. B\*53 negativos y B\*14 positivos vs. B\*14 negativos.** Box Plot de los valores de Log CV comparando los pacientes B\*58 positivos y pacientes B\*58 negativos. Las cajas azules representan el 50% de los datos (percentil 25-75), la caja azul más las barras lineales representan el 80% de los datos (percentil 10-90) y los datos fuera de esos percentiles están representados en puntos azules. La línea central de las cajas es la mediana de cada una de las categorías y la línea roja es la mediana de todos los datos (mediana: 251 CD4<sup>+</sup>). Mediana de

valores de linfocitos CD4<sup>+</sup> de pacientes B\*53 positivos y B\*14 positivos: 674.5 y 426.5, respectivamente.

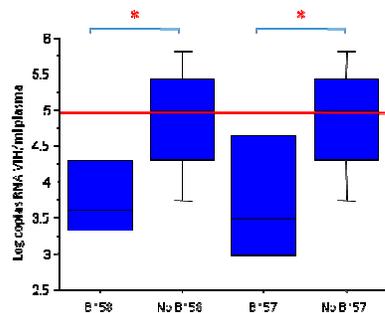
**Tabla 13. Asociaciones de alelos HLA y Carga Viral**

Alelo	Gen A		Alelo	Gen B		Alelo	Gen C	
	Valor p	Valor q		Valor p	Valor q		Valor p	Valor q
<b>A31</b>	0.1149	0.4812358	<b>B58**</b>	0.0097	0.02738661	<b>Cw05</b>	0.0598	0.7176
<b>A29</b>	0.1237	0.4812358	<b>B57**</b>	0.0215	0.03035114	<b>Cw12</b>	0.1929	0.7557
<b>A68</b>	0.1401	0.4812358	<b>B38</b>	0.063	0.0592906	<b>Cw08</b>	0.2758	0.7557
<b>A32</b>	0.2233	0.4946321	<b>B45</b>	0.1141	0.08053639	<b>Cw01</b>	0.3424	0.7557
<b>A26</b>	0.2666	0.4946321	<b>B14</b>	0.192	0.0810522	<b>Cw17</b>	0.3477	0.7557
<b>A33</b>	0.3007	0.4946321	<b>B44</b>	0.224	0.0810522	<b>Cw16</b>	0.4298	0.7557
<b>A11</b>	0.3759	0.4946321	<b>B40</b>	0.2378	0.0810522	<b>Cw07</b>	0.4853	0.7557
<b>A03</b>	0.384	0.4946321	<b>B53</b>	0.2656	0.0810522	<b>Cw15</b>	0.5038	0.7557
<b>A02</b>	0.4478	0.5046278	<b>B07</b>	0.2872	0.0810522	<b>Cw04</b>	0.6226	0.8301333
<b>A30</b>	0.4897	0.5046278	<b>B51</b>	0.3273	0.0810522	<b>Cw03</b>	0.7596	0.91152
<b>A24</b>	0.7488	0.7014783	<b>B18</b>	0.3459	0.0810522	<b>Cw06</b>	0.9162	0.9497
<b>A36</b>	0.8689	0.746156	<b>B52</b>	0.3654	0.0810522	<b>Cw02</b>	0.9497	0.9497
<b>A01</b>	0.9729	0.771198	<b>B41</b>	0.3732	0.0810522			
			<b>B39</b>	0.5239	0.1043326			
			<b>B49</b>	0.5543	0.1043326			
			<b>B55</b>	0.6596	0.1101676			
			<b>B35</b>	0.6752	0.1101676			
			<b>B50</b>	0.7332	0.1101676			
			<b>B48</b>	0.7716	0.1101676			
			<b>B15</b>	0.7804	0.1101676			
			<b>B08</b>	0.8293	0.1114959			

Los alelos con n menor a 2 fueron eliminados para ajustar el número de comparaciones y para obtener asociaciones más consistentes. \*\*Asociaciones significativas. Se tomaron como asociaciones significativas aquellas que tuvieran valores de  $p < 0.05$  y  $q < 0.2$ .



**Figura 20. Box plots de los valores de carga viral entre los diferentes grupos alélicos HLA.** Box Plot de los valores de Log CV comparando todos los alelos HLA. Las cajas verdes representan el 50% de los datos (percentil 25-75), la caja verde más las barras lineales representan el 80% de los datos (percentil 10-90) y los datos fuera de esos percentiles están representados en puntos negros. La línea central de las cajas es la mediana de cada una de las categorías y la línea roja es la mediana de todos los datos (mediana: 4.960 log CV). Los valores p y q asociados a los alelos B\*58 y B\*57 observados en esta gráfica fueron obtenidos al comparar los valores de carga viral de los pacientes positivos para el alelos específico contra los valores (carga viral) de todos los pacientes negativos para ese alelo específico.



**Figura 21. Box Plot de los valores de Carga Viral de pacientes B\*58 positivos vs. B\*58 negativos y B\*57 positivos vs. B\*57negativos.** Box Plot de los valores de Log CV comparando los pacientes B\*58 positivos y pacientes B\*58 negativos. Las

cajas azules representan el 50% de los datos (percentil 25-75), la caja azul más las barras lineares representan el 80% de los datos (percentil 10-90) y los datos fuera de esos percentiles están representados en puntos azules. La línea central de las cajas es la mediana de cada una de las categorías y la línea roja es la mediana de todos los datos (mediana todos los datos: 4.969). Mediana de valores de Log de carga viral de pacientes B\*58 positivos y B\*57 positivos: 3.5985 y 3.476, respectivamente.

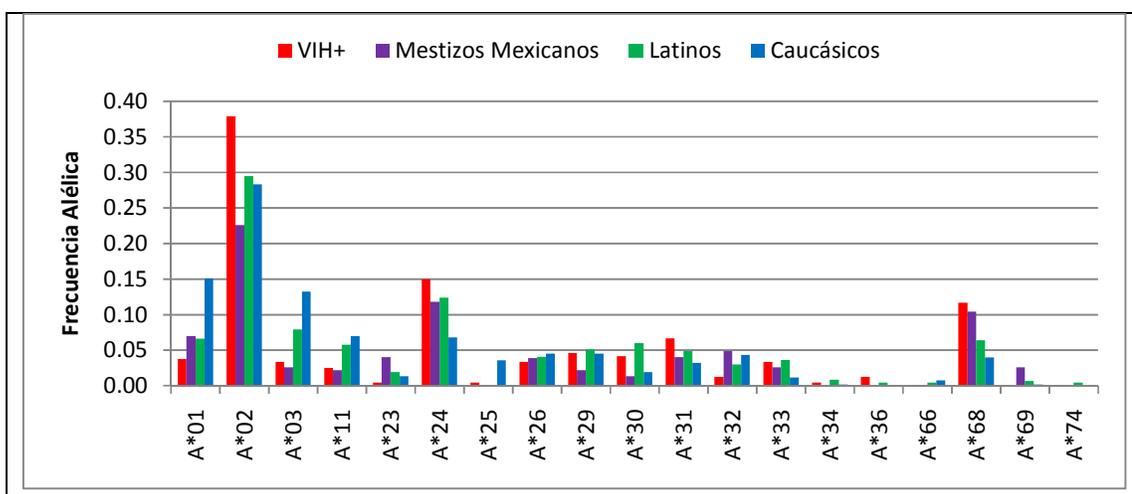
## Comparación de las frecuencias HLA de pacientes VIH positivos con poblaciones no infectadas

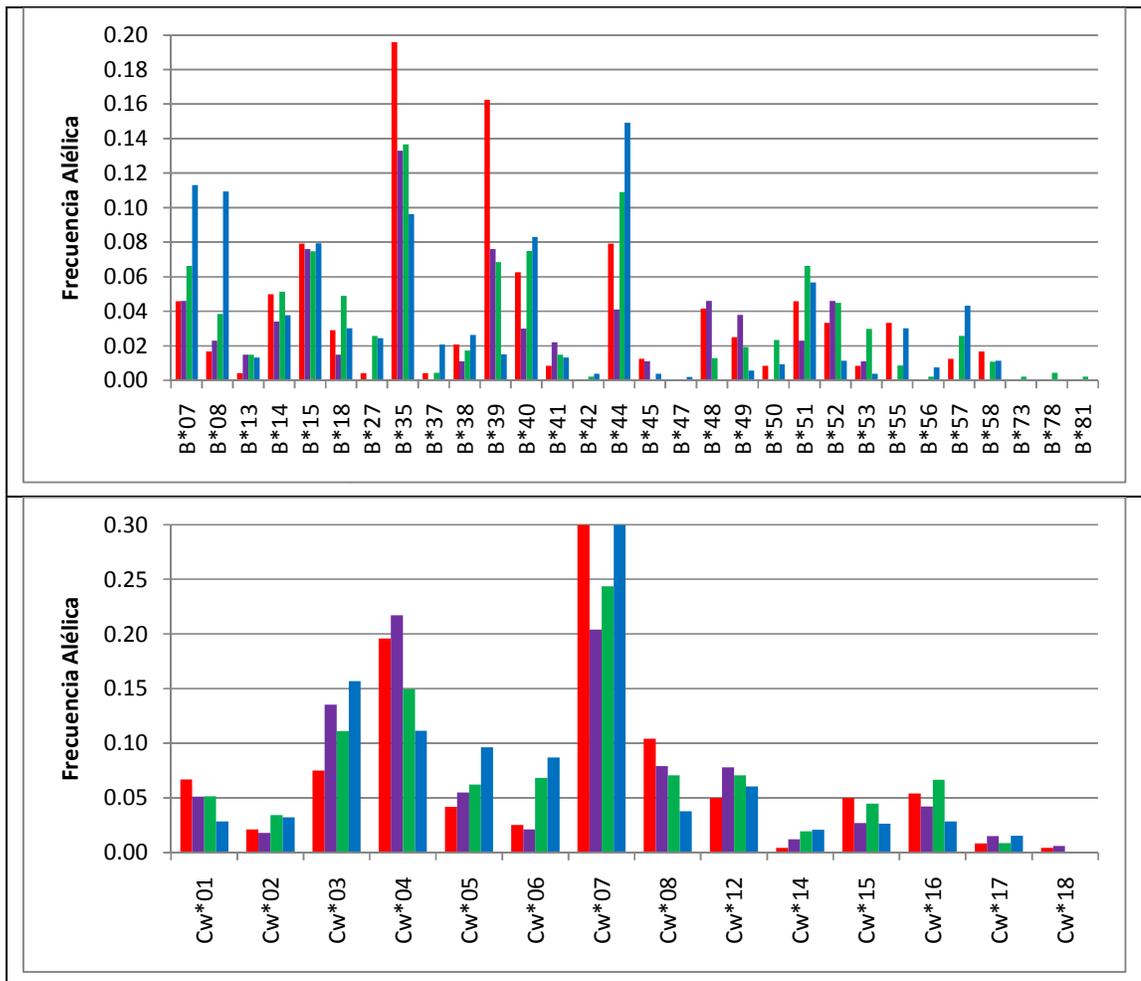
Con el objetivo de buscar posibles diferencias en las frecuencias HLA de individuos VIH positivos con respecto a la población mexicana en general y de otras poblaciones (caucásicas y latinos sanos), se realizaron comparaciones entre las frecuencias alélicas de VIH positivos encontradas en este estudio y las frecuencias alélicas HLA reportadas para otras poblaciones VIH negativas. Las cohortes con las que se compararon las frecuencias HLA fueron las reportadas para mestizos mexicanos del centro del país (Gorodezky et al<sup>104</sup>), caucásicos e hispanos viviendo en los Estados Unidos (Cao et al<sup>105</sup>).

La significancia estadística de la diferencia entre las frecuencias alélicas HLA se determinó mediante pruebas exactas de Fisher corregidas para múltiples comparaciones con valores q de Storey. Se encontraron diferencias significativas en las frecuencias alélicas en múltiples alelos de pacientes VIH+ y mestizos mexicanos, latinos y caucásicos sanos.

Los grupos alélicos HLA cuyas frecuencias fueron significativamente diferentes entre VIH+ y mestizos mexicanos fueron: A\*02, A\*23 y A\*69; B\*39 y B\*55; y Cw\*07 y Cw08 (Figura 23). La frecuencia del grupo alélico B\*39 fue significativamente diferente entre VIH+ y latinos viviendo en Estados Unidos (Figura 24). Al comparar las frecuencias de los grupos alélicos HLA entre VIH+ y caucásicos se encontraron significativamente diferente: A\*01, A\*03, A\*24, A\*25, A\*02, A\*11, A\*32, A\*36, A\*31 y A\*33; B\*39, B\*08, B\*35, B\*07, B\*44, B\*57, B\*52; y Cw\*08, Cw\*06, Cw\*03, Cw\*04, Cw\*05 y Cw\*01 (Figura 25).

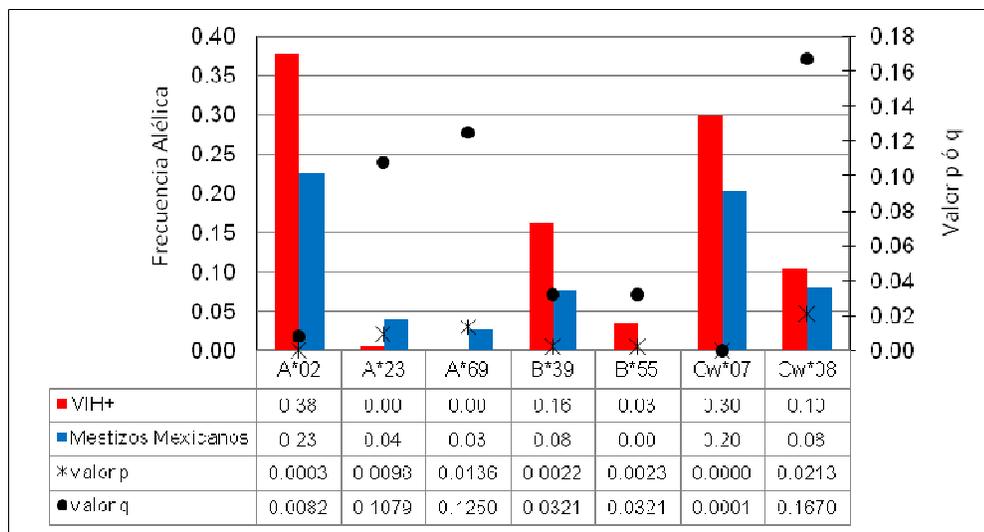
Figura 22. Distribuciones HLA de VIH positivos y poblaciones VIH negativas





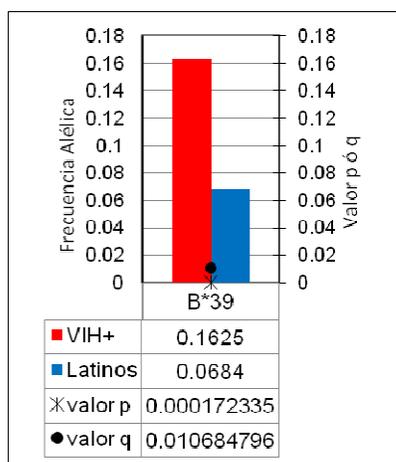
Distribución alélica HLA de VIH positivos (obtenidas en este estudio) y frecuencias alélicas HLA en poblaciones sanas. Las poblaciones sanas son: mestizos mexicanos del centro del país<sup>104</sup>, latinos y caucásicos que viven en Estados Unidos<sup>105</sup>.

**Figura 23. Frecuencias HLA significativamente diferentes entre VIH<sup>+</sup> y mestizos mexicanos sanos**



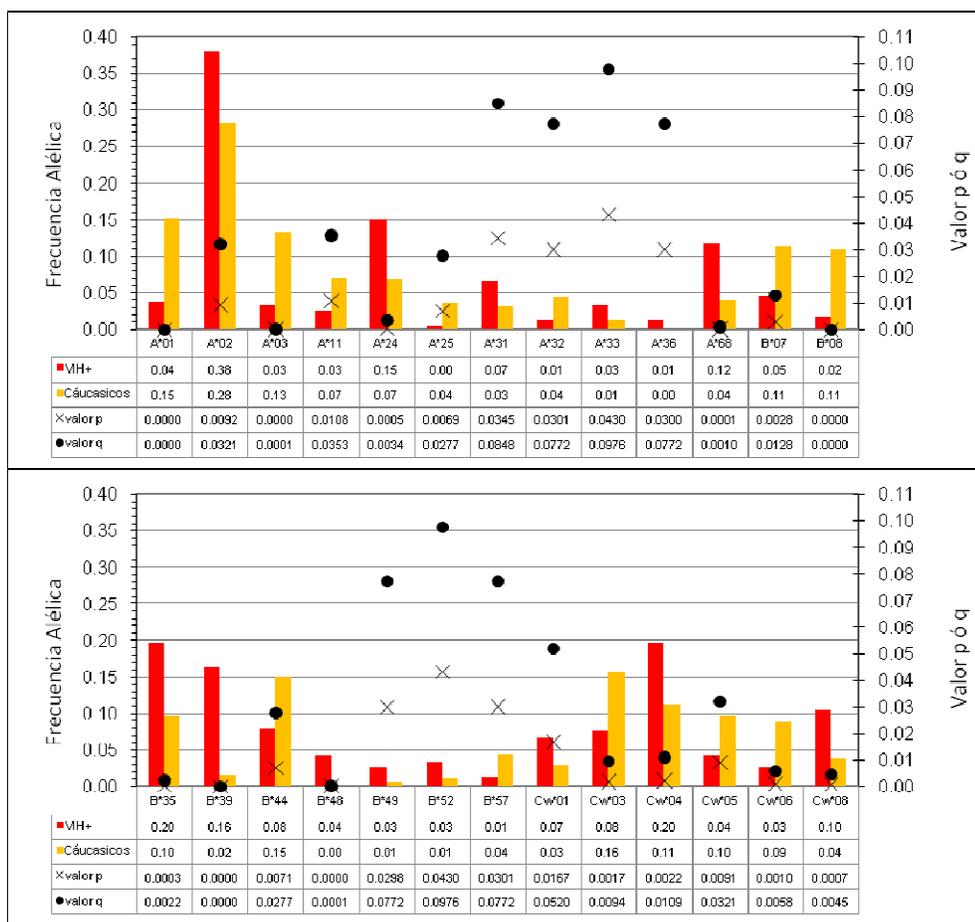
En la gráfica se muestran los alelos HLA cuyas frecuencias fueron significativamente diferentes entre VIH<sup>+</sup> y mestizos mexicanos sanos con sus respectivos valores p y q. Se tomaron como diferencias significativas aquéllas que tuvieron valores de  $p < 0.05$  y  $q < 0.2$ . VIH<sup>+</sup>, pacientes participantes en este estudio; mestizos mexicanos, publicados por Gorodezky et al<sup>104</sup>.

Figura 24. Frecuencias HLA significativamente diferentes entre VIH+ y latinos sanos



En la gráfica se muestran los alelos HLA cuyas frecuencias fueron significativamente diferentes entre VIH+ y latinos sanos con sus respectivos valores p y q. Se tomaron como diferencias significativas aquellas que tuvieran valores de  $p < 0.05$  y  $q < 0.2$ . VIH+, pacientes participantes en este estudio; latinos sanos viviendo en Estados Unidos publicados por Cao et al<sup>105</sup>.

Figura 25. Frecuencias HLA significativamente diferentes entre VIH+ y caucásicos sanos



En la gráfica se muestran los alelos HLA cuyas frecuencias fueron significativamente diferentes entre VIH+ y caucásicos sanos con sus respectivos valores p y q. Se tomaron como diferencias significativas aquellas que tuvieran valores de  $p < 0.05$  y  $q < 0.2$ . VIH+, pacientes participantes en este estudio; caucásicos sanos viviendo en Estados Unidos publicados por Cao et al<sup>105</sup>.

## Búsqueda de Epítomos de VIH

La búsqueda de epítomos de CTLs restringida por los alelos HLA más frecuentes en la cohorte estudiada se realizó en la base de datos de los Alamos. La base de datos de VIH de los Alamos compila epítomos de CTLs comprobados de manera experimental en la secuencia del VIH, así como motivos de unión a

péptidos identificados para alelos HLA específicos.

El perfil de búsqueda de epítomos de CTLs para este trabajo fue el siguiente: a) se buscaron epítomos definidos reportados para todas las proteínas del virus; b) se escogieron los epítomos reportados para el subtipo B del VIH; c) se buscaron los epítomos para cuya definición se utilizaron todos los inmunógenos (VIH más otras infecciones); d) se restringió la búsqueda a genes HLA (humanos); e) y se seleccionaron los epítomos restringidos por los grupos alélicos más frecuentes (frecuencia mayor a 0.1) en la cohorte de pacientes VIH+ mexicanos estudiada. En la tablas 14, 15 y 16 se observan los epítomos reportados para los loci A, B y C, respectivamente.

**Tabla 14. Epítomos de VIH reportados y restringidos por los alelos del locus HLA-A**

HLA	Nombre	Localización HXB2	Epítomo	Alelo Selector
A*02	SL9	p17 (77-85)	SLYNTVATL	A*0201
		p24 (19-27)	TLNAWVKVV	A*02
		p24(164-172)	YVDRFYKTL	A*0207
		p24-p2p7p1p6(230-7)	VLAEAMSQV	A*02
		p2p7p1p6(70-77)	FLGKIWPS	A*02
		Proteasa(45-54)	KMIGGIGGFI	A*02
		Proteasa(75-84)	VLVGPTPVNI	A*0201
		RT(3-12)	SPIETVPVKL	A*02
		RT(33-41)	ALVEICTEM	A*02
		RT(108-118)	VLDVGDAYFSV	A*02
	TI8	RT(128-135)	TAFTIPSI	A*0201
	VL9	RT(179-187)	VIIQYMDDL	A*02
		RT(180-189)	IYQYMDDLIV	A*0201
		RT(209-220)	LLRWGLTTPDKK	A*02
		RT(308-317)	EILKEPVGHV	A*0201
		Vpr(59-67)	AIIRILQQL	A*0201
		gp160(33-42)	KLWVTVYGV	A*0201
		gp160(108-116)	IISLWDQSL	A*0201
		gp160(121-129)	KLTPLCVTL	A*02
		gp160(192-200)	RLISCNTSV	A*02
	TL9	gp160(341-349)	TLSQIVTKL	A*0201
		gp160(678-686)	WLWYIKIFI	A*0201
		gp160(685-693)	FIMIVGGLV	A*0201
		gp160(799-807)	LLQYWSQEL	A*0201
		gp160(813-822)	SLLNATAIAV	A*02
		gp160(828-836)	RVIEVLQRA	A*0201
		gp160(846-854)	RIRQGLERA	A*0205
	AL9	Nef(83-91)	AAVDLSHFL	A*02
		Nef(136-145)	PLTFGWCYKL	A*0201
	VL10	Nef(180-189)	VLEWRFD SRL	A*02
	Nef(190-198)	AFHHVAREL	A*0201, A*0202	
A*24		p17(28-36)	KYCLKHIVW	A*2402
	EIL9	p24(128-136)	EIYKRWII	A*2402
	DT9	p24(163-171)	DYVDRFYKT	A*2402
		gp160(52-61)	LFCASDAKAY	A*2402
	FF9	gp160(383-391)	FYCNTTQLF	A*2402

	RL9	gp160(585-593)	RYLKDQQLL	A*2402
		Nef(134-141)	RYPLTFGW	A*2402
<b>A*68</b>		Proteasa(3-11)	ITLWQRPLV	A*6802
		Proteasa(30-38)	DTVLEEMNL	A*6802
		RT(434-447)	IVGAETFYVDGAAS	A*6802
		Tat(39-49)	ITKGLGISYGR	A*6801
		gp160(777-785)	IVTRIVELL	A*6802
	<b>A*31</b>	IW9	p24(15-23)	ISPRTLNAW
KF11		p24(30-40)	KAFSPEVIPMF	A*310102
TW10		p24(108-117)	TSTLQEIQGW	A*310102
		gp160(770-780)	RLRDLLIVTR	A*3101
<b>A*29</b>		Tat(24-32)	NCYCKKCCY	A*2902
		gp160(209-217)	SFEPIPIHY	A*2902
<b>A*30</b>		p17(76-86)	RSLYNTVATLY	A*30
		RT(173-181)	KQNPDIYIY	A*3002
		RT(263-271)	KLNWASQIY	A*3002
	RV10	RT(356-365)	RMRGAHTNDV	A*3002
	KY9	Integrasa(219-227)	KIQNFRVYY	A*3002
	HY9	gp160(310-318)	HIGPGRAFY	A*3002
		gp160(704-712)	IVNRNRQGY	A*3002
	LAI	gp160(794-802)	KYCWNLLQY	A*3002
<b>A*01</b>	GY9	p17(71-79)	GSEELRSLY	A*01
		Rev(55-63)	ISERILSTY	A*0101
	AY8	Nef(195-202)	ARELHPEY	A*01
<b>A*03</b>		p17(18-26)	KIRLRPGGK	A*0301
	RK9	p17(20-28)	RLRPGGKKK	A*03
		RT(93-101)	GIPHPAGLK	A*0301
		RT(158-166)	AIFQSSMTK	A*0301
		RT(269-277)	QIYPGIKVR	A*0301
	KA9	RT(530-538)	KVYLAWVPA	A*0301
		Vif(17-26)	RIRTWKSLVK	A*0301
		Vif(28-36)	HMYISKKAK	A*0301
		Vif(158-168)	KTKPPLPSVKK	A*0301
		Rev(15-23)	TVRLIKFLY	A*03
		Rev(58-66)	RILSTYLGR	A*0301
		gp160(37-46)	TVYYGVPVWK	A*0301
		gp160(770-780)	RLRDLLIVTR	A*0301
		Nef(73-82)	QVPLRPMTYK	A*0301
		Nef(86-94)	DLSHFLKEK	A*0301
<b>A*26</b>		p24(35-43)	EVIPMFSAL	A*2601
	EY9	RT(449-457)	ETKLGKAGY	A*2601
		RT(492-501)	EVNIVTDSQY	A*2601
		gp160(64-73)	EVHNVWATHA	A*2603
		gp160(466-475)	EVFRPGGGDM	A*2601
<b>A*33</b>		p24(10-18)	MVHQAISPR	A*3303
		p24(163-173)	DYVDRFYKTLR	A*3303
		Proteasa(4-14)	TLWQRPLVTIR	A*3303
		RT(440-448)	FYVDGAANR	A*3303

		Integrasa(219-228)	KIQNFRVYYR	A*3303
		Vpu(29-37)	EYRKILRQR	A*3303
		gp160(698-707)	VFAVLSIVNR	A*3303
		gp160(831-838)	EVAQRAYR	A*3303
		Nef(188-196)	KLAFHHMAR	A*3303
<b>A*11</b>		p17(84-91)	TLYCVHQR	A*1101
	AK11	p24(217-227)	ACQGVGGPGHK	A*11
		RT(158-166)	AIFQSSMTK	A*1101
		RT(269-277)	QIYAGIKVK	A*1101
		RT(341-350)	IYQEPFKNLK	A*1101
		RT(520-528)	QIIEQLIKK	A*1101
		Integrasa(179-188)	AVFIHNFKRK	A*1101
		gp160(199-207)	SVITQACPK	A*1101
		Nef(73-82)	QVPLRPMTYK	A*1101
	AK10	Nef(83-92)	AAVDLSHFLK	A*11
<b>A*32</b>		RT(392-401)	PIQKETWETW	A*3201
		gp160(419-427)	RIKQIINMW	A*3201

La búsqueda de epítomos se realizó en la base de datos de los Alamos ([www.hiv.lanl.gov](http://www.hiv.lanl.gov); julio 2008), los epítomos están ordenados según su alelo selector comenzando por el grupo alélico más frecuente en la cohorte estudiada y en orden decreciente. Sólo se muestran los epítomos restringidos por los alelos HLA con una frecuencia mayor a 0.1 en la cohorte de pacientes VIH+ mexicanos de este estudio. El alelo HLA-A\*36 no tiene epítomos de VIH reportados.

**Tabla 15. Epítomos de VIH reportados y restringidos por alelos del locus HLA-B**

HLA	Nombre	Localización HXB2	Epítomo	Alelo/Grupo Selector
<b>B*35</b>		p17(36-44)	WASRELERF	B*3501
		p17(124-132)	NSSKVSQNY	B*3501
		p24(122-130)	PPIPVGDIY	B*3501
	TY9	RT(107-115)	TVLVDVGDAY	B*3501
		RT(118-127)	VPLDEDFRKY	B*3501
		RT(175-183)	HPDIVIYQY	B*3501
		RT(293-301)	IPLTEEAEL	B*3501
		Vif(61-69)	DAKLIITY	B*3501
		Vif(73-81)	HTGERDWHL	B*35
		gp160(606-614)	TAVPWNASW	B*3501
	FL9	Nef(68-76)	FPVKPQVPL	B*07, B*35
	VY8	Nef(74-81)	VPLRPMTY	B*35
	TL10	Nef(128-137)	TPGPGTRYPL	B*35
		Nef(135-143)	YPLTFGWCF	B*35
<b>B*39</b>		p24(61-69)	GHQAAMQML	B*3901
<b>B*15</b>		p24(24-32)	VKVVEEKAF	B*1503
		p24(137-145)	GLNKIVRMY	B*1501
	B*1501 TF9	Proteasa(91-99)	TQIGCTLNF	B*1501
		RT(173-181)	KQNPDIVY	B*1503
		RT(293-301)	IPLTEEAEL	B*1501, B*3501
		RT(309-318)	ILKEPVHGVY	B*1501
	Pol-VI10	RT(496-505)	VTDSQYALGI	B*1503
		Integrasa(136-143)	KQEFGIPY	B*1503
		Integrasa(185-194)	FKRKGIGGY	B*1503
	Integrasa(218-227)	TKIQNFRVYY	B*1503	

		Integrasa(263-271)	RKAKIIRDY	B*1503
	Tat VI10	Tat(36-45)	VCFMTKGLGI	B*1501
	Tat MY9	Tat(39-47)	MTKGLGISY	B*1501
		gp160(375-383)	SFNCGGEFF	B*1516
		gp160(375-383)	SFNCGGEFF	B*1516
		Nef(117-127)	TQGYFPDWQNY	B*1501
	LL9	Nef(137-145)	LTFGWCFKL	B*1517, B57
	WF9	Nef(179-193)	EVLQWKFDSRLALRH	B*1503
	Nef-WF9	Nef(183-191)	WRFDSRLAF	B*1503
<b>B*44</b>	Gag LL10	p24(43-52)	LSEGATPQDL	B*4403
		p24(162-172)	RDYVDRFYKTL	B*4402
		p24(174-184)	AEQASQDVKNW	B*4402
<b>B*40</b>	Gag-GI9	p17(11-19)	GELDRWEKI	B*4002
	Gag-KA9	p24(70-78)	KETINEEAA	B*4002
		p24(75-83)	EAAEWDREV	B*40
		p24(78-86)	AEWDRVHPV	B*40
	Gag-TL8	p2p7p1p6(64-71)	TERQANFL	B*4002
		p2p7p1p6(118-126)	KELYPLTSL	B*40
		RT(202-210)	IEELRQHLL	B*4001
		Vpr(12-20)	REPHNEWTL	B*4002
		gp160(805-814)	QELKNSAVSL	B*4001
	KL9	Nef(92-100)	KEKGGLEGL	B*40
<b>B*14</b>		p24(51-59)	DLNTMLNTV	B*1402, Cw8
	DA9	p24(166-174)	DRFYKLTRA	B*14
		RT(496-505)	VTDSQYALGI	B*1402, B14
	gp160 EL9	gp160(584-592)	ERYLKDQQL	B*1402
<b>B*51</b>		RT(42-50)	EKEGKISKI	B*5101
	Pol-TI8	RT(128-135)	TAFTIPSI	B*5101
	LI9	Integrasa(28-36)	LPPVVAKEI	B*5101
	EI9	Vpr(29-37)	EAVRHFPRI	B*5101
		gp160(416-424)	LPRIKQII	B*5101
	RL9	gp160(557-565)	RAIEAQHL	B*5101
<b>B*07</b>		Vif(48-57)	HPRVSSEVHI	B*0702
		Vpr(34-42)	FPRIWLHGL	B*0702
		gp160(298-307)	RPNNNTRKSI	B*0702
		gp160(843-851)	IPRRIRQGL	B*0702
	FL9	Nef(68-76)	FPVKQVPL	B*0702
		Nef(71-79)	TPQVPLRPM	B*0702
		Nef(77-85)	RPMTYKGAL	B*0702
		Nef(128-135)	TPGPGVRY	B*0702
		Nef(135-143)	YPLTFGWY	B*0702
<b>B*18</b>		p24(161-170)	FRDYVDRFYK	B*1801
	NY9	RT(136-144)	NNETPGVRY	B*1801
		Vif(102-111)	LADQLHLHY	B*1801
		gp120(31-39 HIV-MN)	AENLWVTVY	B*1801
	YW9	gp160(61-69)	YETEVHNVW	B*1801
		Nef(135-143)	YPLTFGWY	B*1801
		p17(24-32)	GGKKYKYLK	B*0801

<b>B*08</b>	EV9	p17(74-82)	ELRSLYNTV	B*08
	EL9	p17(93-101)	EVKDTKEAL	B*08
		p24(127-136)	GEIYKRWIL	B*0801
		p24(197-205)	DCKTILKAL	B*0801
		RT(18-26)	GPKVKQWPL	B*0801
		gp160(586-593)	YLKDQQLL	B*0801
		Nef(13-20)	WPTVRERM	B*0801
	Nef-FL8	Nef(90-97)	FLKEKGGL	B*08
	EL8	Nef(182-189)	EWRFD SRL	B*08
<b>B*58</b>		p24(15-23)	ISPRTLNAW	B*5701, B*5801
	TW10	p24(108-117)	TSTLQEQIGW	B*57, B*58
		RT(244-252)	IVLPEKDSW	B*5701, B*5801
		RT(375-383)	ITTESIVIW	B*5701, B*5801
		Rev(14-23)	KAVRLIKFLY	B*5801
	KF9	Nef(82-90)	KAADVLSHF	B*57, B*5801
<b>B*45</b>	Pol-AA9	RT(437-445)	AETFYVDGA	B*4501
<b>B*57</b>	IW9	p24(15-23)	ISPRTLNAW	B*57
		p24(30-37)	KAFSPEVI	B*5703
	Gag-KF11	p24(30-40)	KAFSPEVPMF	B*5703
	TW10	p24(108-117)	TSTLQEQIGW	B*570301, B*58
		p24(176-184)	QASQEVKNW	B*5701
		RT(243-252)	PIVLPEKDSW	B*5701
		RT(374-383)	KITTESIVIW	B*5701
		Vif(31-39)	ISKKAKGWF	B*5701
		Vpr(30-38)	AVRHFPRIW	B*5701
		Rev(14-23)	KAVRLIKFLY	B*5701
	KF9	Nef(82-90)	KAADVLSHF	B*57, B*5801
	HQ10	Nef(116-125)	HTQGYFPDWQ	B*57
		Nef(120-128)	YFPDWQNYT	B*5701
		Nef(130-143)	GPGVRYPLTFGW CY	B*57

La búsqueda de epítomos se realizó en la base de datos de los Alamos ([www.hiv.lanl.gov](http://www.hiv.lanl.gov); julio 2008), los epítomos están ordenados según su alelo selector comenzando por el grupo alélico más frecuente en la cohorte estudiada y en orden decreciente. Sólo se muestran los epítomos restringidos por los alelos HLA con una frecuencia mayor a 0.1 en la cohorte de pacientes VIH+ mexicanos de este estudio. Los alelos HLA-B\*48, 52, 55, 49 y 38 no tienen epítomos de VIH reportados.

**Tabla 16. Epítomos de VIH reportados y restringidos por los alelos del locus Cw**

HLA	Nombre	Localización HXB2	Epítomo	Alelo/Grupo Selector
<b>Cw*07</b>	KY11	Nef(105-115)	KRQDILDWVY	Cw*07
		p24(48-56)	TPQDLN TML	Cw*0802
<b>Cw*08</b>	Gag RV9	p24(173-181)	RAEQASQEV	Cw*0802
	gp160 CC9	gp160(239-247)	CKNVSTVQC	Cw*0802
		Nef(82-91)	KAADVLSHF L	Cw*0802
		p24(36-43)	VIPMF SAL	Cw*0102
<b>Cw*01</b>	NL8	p6(35-42)	NSPTRREL	Cw*0102
	HL9	Vpu(74-82)	HAPWDVNDL	Cw*0102
	YL10	gp160(217-226)	YCAPAGFAIL	Cw*0102
	YL9	gp160(712-720)	YSPLSLQTL	Cw*0102

Cw*06	Cw*12	CC8	Tat(30-37)	CCFHCQVC	Cw*12
	Cw*05		Rev(67-75)	SAEPVPLQL	Cw*0501
			p24(15-23)	ISPRTLNAW	Cw*0602
			Nef(181-189)	LKWKFDSQL	Cw*0602

La búsqueda de epítomos se realizó en la base de datos de los Alamos ([www.hiv.lanl.gov](http://www.hiv.lanl.gov); julio 2008), los epítomos están ordenados según su alelo selector comenzando por el grupo alélico más frecuente en la cohorte estudiada y en orden decreciente. Sólo se muestran los epítomos restringidos por los alelos HLA con una frecuencia mayor a 0.1 en la cohorte de pacientes VIH+ mexicanos de este estudio. Los alelos HLA-Cw\*04, 03, 16, 15 y 02 no tienen epítomos de VIH reportados.

## DISCUSIÓN

El principal objetivo de este estudio fue obtener las frecuencias alélicas y haplotípicas de los genes HLA de clase I en pacientes VIH positivos del centro de México con la finalidad de caracterizar inmunogenéticamente a la cohorte, así como de evaluar el impacto de este factor genético en la carga viral y el conteo de linfocitos T CD4+. Al tipificar el HLA de clase I de 120 sujetos VIH positivos del centro de México se encontraron 16 grupos alélicos HLA-A, 24 grupos alélicos HLA-B y 14 grupos alélicos HLA-C. Nuestros datos corroboran las características inmunogenéticas únicas de la población mexicana, con una mezcla de grupos alélicos amerindios (B\*39/40) y caucásicos típicos (A\*01/29/26/03 y B\*07/08/44/38).

Las frecuencias genotípicas observadas en los loci HLA-A, -B y -C se encontraron en equilibrio Hardy-Weinberg (Tabla 8). El principio de Hardy-Weinberg establece que tras una generación de apareamiento al azar, las frecuencias de los genotipos de un locus individual se fijarán en un valor de equilibrio particular, siendo estas frecuencias al equilibrio una función sencilla de las frecuencias alélicas de ese locus. Para analizar si las frecuencias alélicas y genotípicas de los genes HLA-A, B y C en la cohorte de pacientes VIH positivos mexicanos se encontraban en equilibrio al transmitirse los diferentes alelos de generación en generación, se realizó un análisis de desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg. Es sabido que eventos de apareamiento no aleatorio (endogamia y emparejamiento selectivo), poblaciones de tamaño pequeño, selección natural, mutaciones y migración, pueden causar cambios en las frecuencias genéticas que se observan a nivel poblacional como desviaciones al equilibrio de Hardy-Weinberg. Se buscó si la cohorte analizada presentaba este tipo de desviaciones comparando las frecuencias genotípicas reales de la población y las frecuencias genotípicas esperadas en caso de existir equilibrio de Hardy-Weinberg, utilizando pruebas exactas de Fisher. No se observaron desviaciones significativas del equilibrio de Hardy-Weinberg para ninguno de los loci HLA (A, B o C). Esto puede entenderse al no observarse diferencias ( $p < 0.05$ ) entre las frecuencias fenotípicas reales y las esperadas según este principio para cada locus.

Para describir inmunogenéticamente a la cohorte de VIH positivos se obtuvieron las frecuencias alélicas, las cuales se determinaron por conteo directo de los haplotipos de los pacientes. El número total de alelos para cada loci fue de 240 alelos (2 por cada paciente). Los alelos más frecuentes del locus HLA-A fueron: A\*02 (frecuencia alélica=0.37), A\*24 (0.15), A\*68 (0.11) y A\*31 (0.06). Los alelos más frecuentes para el locus HLA-B fueron: B\*35 (frecuencia alélica=0.19), B\*39 (0.16), B15 (0.07), B44 (0.07), B40 (0.06) y B14 (0.05). En cuanto al locus HLA-C, los alelos más frecuentes fueron: Cw\*07 (frecuencia alélica=0.3), Cw\*04 (0.19), Cw\*08 (0.10), Cw\*03 (0.07) y Cw\*01 (0.06).

Característicamente, el 52% de los alelos encontrados en la cohorte eran A\*02/24 del locus HLA-A, más del 35% de los alelos eran B\*35/39 del locus HLA-B y casi el 50% de los alelos eran Cw\*07/04 del locus HLA-C.

Dado que la cohorte de VIH positivos de este estudio estaba compuesta por individuos no relacionados y sin antecedentes genéticos o genealógicos, se realizó una estimación de la fase gamética para cada individuo, en donde se obtuvieron el haplotipo paterno y el haplotipo materno para cada individuo, es

decir, se obtuvieron los haplotipos más probables heredados del padre y de la madre de cada individuo. La aplicación del algoritmo utilizado por Arlequin v. 3.11 permitió obtener los haplotipos HLA-A, B y C heredados por los padres de cada individuo. A partir de estos haplotipos se estimaron las frecuencias haplotípicas de 2 y 3 loci de la cohorte de pacientes VIH positivos de este estudio.

Mediante Arlequin se obtuvieron 276 haplotipos diferentes de 2 loci y 161 haplotipos diferentes de 3 loci. En la tabla 9 se muestran los haplotipos más frecuentes de 2 loci con frecuencias mayores a 0.01, los cuales representan el 23.5% (65 de 276) de los haplotipos diferentes encontrados. Los haplotipos de dos loci más comunes fueron: B\*35-Cw\*04 (frecuencia haplotípica = 0.1292), B\*39-Cw\*07 (0.1042), A\*02-Cw\*07 (0.1042), A\*02-Cw\*04 (0.1), A\*02-B\*35 (0.096), A\*02-B\*39 (0.0710), A\*68-Cw\*07 (0.0583), A\*24-Cw\*07 (0.0542), y A\*02-Cw\*01 (0.05).

En la tabla 9 se observan los haplotipos de 3 loci más frecuentes con frecuencias mayores a 0.01, las cuales representan el 8.07% (13 de 161) de los haplotipos diferentes estimados. Los haplotipos de 3 loci más comunes son: A\*02-B\*35-Cw\*04 (frecuencia haplotípica=0.07), A\*02-B\*39-Cw\*07 (0.04), A\*02-B\*15-Cw\*01 (0.02) y A\*68-B\*39-Cw\*07 (0.02) mostradas en la tabla 9 y figura 17.

El fenómeno de desequilibrio de ligamiento es importante para la definición de haplotipos HLA en una población determinada, así como para el análisis de asociaciones entre la presencia de cierto alelo HLA y valores altos o bajos de carga viral o conteo de linfocitos T CD4<sup>+</sup>. En la tabla 11 se encuentran las 10 asociaciones de alelos con p significativas menores a  $5.297 \times 10^{-5}$  obtenidas mediante comparaciones de dos vías por pruebas exactas de Fisher.

Con el objetivo de evaluar el impacto de los grupos alélicos HLA sobre los valores de carga viral y conteo de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, se realizaron análisis de correlación entre la expresión de grupos alélicos HLA y los valores de carga viral y conteo de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de los pacientes VIH positivos mexicanos. Estos análisis tienen la limitación de que la mayoría de los individuos que componen la cohorte del presente estudio se encontraban en etapas intermedias y tardías de la infección (véase Tabla 5 en la sección de resultados), donde los valores de carga viral tienden a elevarse y separarse significativamente del valor de equilibrio (*setpoint* viral) establecido al principio de la etapa crónica de la infección. A pesar de las características de la cohorte se pudieron observar algunas asociaciones que podrían representar características de susceptibilidad o protección únicas de la cohorte de VIH positivos mexicanos.

Se encontró que los grupos alélicos B\*53 y B\*14 se asociaban positivamente con valores altos conteo de linfocitos T CD4<sup>+</sup> ( $p=0.0054$ ,  $q=0.06$  y  $p=0.0067$ ,  $q=0.06$ , respectivamente), estos grupos alélicos no se han reportado antes como factores de protección a la enfermedad o se asocian inconsistentemente con la protección a la enfermedad a lo largo de las cohortes estudiadas. Se deben tomar con reserva estos resultados, en especial con la asociación entre B\*53 dado que la frecuencia de este alelo es muy baja (0.0083, N=2 alelos), habrá que esperar a tener una cohorte mayor para ver si las asociaciones positivas con los conteos de T CD4<sup>+</sup> se mantienen. Al analizar a los 2 pacientes B\*53 positivos se puede observar que ambos son homocigotos para el locus A (homocigotos para los grupos alélicos A\*36 y A\*24) y que cuentan con conteo de linfocitos altos (649 y 700 linfocitos T CD4<sup>+</sup>/μl de sangre) y con valores de carga

viral relativamente bajos (19,000 y 12,200 copias de RNA de VIH/ml), sin embargo no se encontraron asociaciones positivas entre la presencia de estos grupos alélicos y una carga viral baja ( $p=0.2656$ ,  $q=0.081$ ). Con respecto al alelo B\*14, se ha reportado previamente la presencia de este grupo alélico en pacientes no progresores en poblaciones caucásicas de origen europeo<sup>121;122</sup>.

De igual manera, los alelos B\*58 y B\*57 se asociaron positivamente con valores bajos de carga viral ( $p=0.0097$ ,  $q=0.0273$  y  $p=0.0215$ ,  $q=0.0303$ , respectivamente). Las personas positivas para estos alelos mostraron una disminución de más de diez veces (-1.37 y -1.49 logaritmos) en la carga viral en comparación con los pacientes que no presentaron esos alelos específicos (B\*58 y B\*57 negativos). Los alelos B\*57 y B\*58 se han asociado consistentemente en varias cohortes de VIH positivos con composiciones étnicas diferentes con una lenta progresión a la enfermedad<sup>64;123;124</sup>.

Dentro del grupo alélico HLA-B\*35 se conocen algunos alelos específicos los cuales se han asociado consistentemente en muchas cohortes con un riesgo o susceptibilidad a la enfermedad por VIH, sin embargo en nuestra cohorte de VIH positivos mexicanos no encontramos ninguna asociación con valores altos de carga viral, por lo que sería interesante estudiar la diversidad alélica de B\*35 en la cohorte de VIH positivos mexicanos para observar si esos alelos de riesgo se presentan en nuestra cohorte y así confirmar las sospechas de que este grupo alélico representa un riesgo en VIH positivos mexicanos.

Con el objetivo de buscar posibles diferencias en las frecuencias HLA de individuos VIH positivos con respecto a la población mexicana en general y de otras poblaciones (caucásicas y latinos sanos), se realizaron comparaciones entre las frecuencias alélicas de VIH positivos encontradas en este estudio y las frecuencias alélicas HLA reportadas para otras poblaciones VIH negativas. Las cohortes con las que se compararon las frecuencias HLA fueron las reportadas para mestizos mexicanos del centro del país (Gorodezky et al<sup>104</sup>), caucásicos e hispanos viviendo en los Estados Unidos (Cao et al<sup>105</sup>). El origen geográfico de los individuos con tipificación HLA del estudio de Gorodezky varía en comparación con la cohorte de VIH positivos de este estudio, sólo el 49% de los individuos del estudio de Gorodezky proviene del Distrito Federal y del estado de México (entidades federativas incluidas en este estudio). Otro hecho que debe tomarse a consideración es que las tipificaciones HLA obtenidas en los estudios de cohortes VIH negativas fueron obtenidas mediante metodologías diferentes a la de este estudio. Los estudios de Gorodezky y Cao utilizan otra metodología para obtener la tipificación HLA de las cohortes, estos estudios utilizan PCR-SSOP (*sequence specific oligonucleotides probes*) mientras que en este estudio se obtuvieron las tipificaciones HLA mediante PCR-SSP (*sequence specific primers*). Ambas metodologías son tipificaciones HLA moleculares y no son de tipificación HLA serológica. Para los efectos de comparación de las frecuencias alélicas HLA de este estudio, en donde se compararon grupos alélicos y no alelos en específico, hacen a los datos de Gorodezky y Cao sean comparables con los datos de la cohorte de VIH positivos de este estudio.

Los grupos alélicos HLA cuyas frecuencias fueron significativamente diferentes entre VIH+ y mestizos mexicanos fueron: A\*02, A\*23 y A\*69; B\*39 y B\*55; y Cw\*07 y Cw08 (Figura 23). La frecuencia del

grupo alélico B\*39 fue significativamente diferente entre VIH+ y latinos viviendo en Estados Unidos (Figura 24). Y al comparar las frecuencias de los grupos alélicos HLA entre VIH+ y caucásicos se encontraron significativamente diferente: A\*01, A\*03, A\*24, A\*25, A\*02, A\*11, A\*32, A\*36, A\*31 y A\*33; B\*39, B\*08, B\*35, B\*07, B\*44, B\*57, B\*52; y Cw\*08, Cw\*06, Cw\*03, Cw\*04, Cw\*05 y Cw\*01 (Figura 25).

Notoriamente, las frecuencias alélicas HLA de la cohorte de VIH positivos de este estudio son más similares a las frecuencias alélicas HLA de los individuos latinos viviendo en Estados Unidos y no a la cohorte de mestizos mexicanos de Gorodezky et al, cohorte que se esperaba que fuera representativa de las frecuencias alélicas HLA de mestizos mexicanos. La cohorte de mestizos mexicanos de Gorodezky et al está enriquecida en genes caucásicos, eso se puede explicar como un sesgo de muestreo dado que los individuos que fueron tipificados en esta cohorte pertenecen a un programa de donación de médula ósea (programa en la que mayormente participan personas de clase alta, individuos enriquecidos en genes caucásicos). De igual manera, estas diferencias encontradas con la cohorte de mestizos mexicanos se podrían explicar dado algunas inconsistencias encontradas en las sumatorias de las frecuencias alélicas HLA en el estudio de Gorodezky et al (la suma de las frecuencias HLA de cada locus no dan como resultado 1), lo que podría reflejar errores en el cálculo de las frecuencias alélicas HLA.

Es importante destacar que B\*39 es el único grupo alélico significativamente diferente entre la cohorte de VIH positivos de este estudio y las demás cohortes VIH negativas. El grupo alélico B\*39 es de origen amerindio (indios americanos) y se encuentra sobrerrepresentado en grupos étnicos del continente americano, así como en grupos étnicos orientales ([www.allelefrecuencias.net](http://www.allelefrecuencias.net)). Importantemente, la frecuencia del grupo alélico B\*39 en la cohorte de VIH positivos de este estudio fue el doble de mayor a la observada en individuos mestizos mexicanos VIH negativos, de igual manera la frecuencia de este alelo fue 2.37 veces mayor en VIH positivos que en latinos viviendo en Estados Unidos, por último, la frecuencia de B\*39 es ocho veces mayor en VIH que en caucásicos VIH negativos que viven en Estados Unidos. Aún queda por confirmar si esta diferencia en la frecuencia de B\*39 representa un factor de riesgo para la infección por VIH en nuestros pacientes VIH positivos (cabe destacar que este grupo alélico no fue asociado positivamente con mayores valores de carga viral o menores conteos de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, efectos buscados en este presente estudio), o el enriquecimiento de este grupo alélico se deba a factores epidemiológicos de la epidemia de VIH en nuestro país.

La frecuencia de distintos alelos B\*39 en poblaciones nativas latinoamericanas es alta, pudiendo implicar un mayor reclutamiento de personas con ascendencia indígena, muchas veces dentro de los grupos sociales con alto grado de marginación y afectadas por el VIH/SIDA, entre los individuos participantes del presente estudio. Sin embargo, aunque es posible que la alta frecuencia de B\*39 en nuestra cohorte de individuos VIH positivos mexicanos se deba a un sesgo en el reclutamiento, la semejanza en las frecuencias de otros alelos HLA con la población general, pero no en este grupo alélico en específico, sugieren un papel de B\*39 como un factor de riesgo para adquirir la infección. Estudios de caracterización de los alelos B\*39 más frecuentes en la población mestiza mexicana y su

papel en el desarrollo de la infección por VIH están ya siendo realizados por nuestro grupo como seguimiento de los resultados del presente estudio.

Como parte final de este estudio se realizó una búsqueda bibliográfica de los epítomos de CTLs ya reportados para los grupos alélicos más frecuente en la población de VIH positivos con el fin de buscar aquellos epítomos de CTLs que se reconocerían con mayor frecuencia en la cohorte. Notoriamente, sólo existe un epítomo de VIH reportado restringido por un alelo del grupo alélico HLA-B\*39, por lo que sería importante estudiar la diversidad alélica de este grupo alélico, así como caracterizar los epítomos restringidos por este conjunto de alelos altamente representados en VIH positivos mexicanos.

El presente estudio mostró evidencias importantes que pueden guiar nuevas líneas de investigación para determinar factores de protección para la adquisición de la infección por VIH o que determinan una progresión más rápida o lenta que el promedio de la enfermedad por el virus en la población mexicana. La alta frecuencia del grupo alélico B\*39 en la población infectada con respecto a la población mestiza mexicana fue notoria (Figura 23). La influencia de este grupo alélico en el riesgo de adquisición de la infección de la enfermedad tendrá que comprobarse mediante estudios en individuos expuestos al virus en múltiples ocasiones pero que permanecen sin infección aparente y mediante experimento funcionales.

## CONCLUSIONES

1. Los grupos alélicos HLA de clase I más frecuentes en VIH positivos fueron: A\*02, A\*24 y A\*68 del gen A, B\*35, B\*39 y B\*15 del gen B y Cw\*07, Cw\*04 y Cw\*08 del gen C. Los haplotipos más frecuentes de 2 loci fueron: B\*35-Cw\*04, B\*39-Cw\*07, A\*02-Cw\*07 y A\*02-Cw\*04, y para 3 loci fueron: A\*02-B\*35-Cw\*04, A\*02-B\*39-Cw\*07 y A\*02-B\*15-Cw\*01.
2. Nuestros datos corroboran las características inmunogenéticas únicas de la población mexicana, con una mezcla de alelos amerindios (B\*39/40) y caucásicos típicos (A\*01/29/26/03 y B\*07/08/44/38).
3. Se encontraron asociaciones de alelos HLA con CV/CD4 protectoras: los alelos B\*57 y B\*58 (alelos protectores reportados previamente) se asociaron positivamente con una carga viral baja y los alelos B\*53 y B\*14 se asociaron positivamente con conteos mayores de linfocitos T CD4<sup>+</sup>.
4. Se encontraron diferencias significativas en las frecuencias alélicas en múltiples alelos de pacientes VIH+ y mestizos mexicanos no infectados (Cw\*07/08, A\*02/23/69 y B\*39/55), latinos (B\*39) y caucásicos (B\*39/08/35/07/44/57/52, A\*01/03/24/25/02/11/32/36/31/33 y Cw\*08/06/03/04/05/01).
5. Aunque el tamaño de la cohorte de pacientes VIH+ limita las conclusiones de este estudio, nuestros datos sugieren posibles diferencias en las frecuencias de alelos HLA entre la población infectada y la no infectada que podrían representar factores de protección y de riesgo en nuestra población.

## REFERENCIAS

1. Abul K. Abbas, Andrew H. Litchman (2004) *Inmunología Celular y Molecular*. Elsevier Imprint, Madrid, España.
2. Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M., and Sclomchik, M. (2001) *Immunobiology*. Garland Science.
3. Srivasta R., Ram B.P., and Tyle P. (2007) *Immunogenetics of the major histocompatibility complex*. VCH Publishers, New York.
4. Klein, J., Satta, Y., O'Uigin, C., and Takahata, N. (1993) The molecular descent of the major histocompatibility complex. *Annu. Rev. Immunol.*, 11, 269-295.
5. Le Bouteiller, P. (1994) HLA class I chromosomal region, genes, and products: facts and questions. *Crit Rev. Immunol.*, 14, 89-129.
6. Hughes, A.L. (1995) Origin and evolution of HLA class I pseudogenes. *Mol Biol. Evol.*, 12, 247-258.
7. Abul K. Abbas, Andrew H. Litchman (2004) *Inmunología Celular y Molecular*. Elsevier Imprint, Madrid, España.
8. Monaco, J.J. (1993) Structure and function of genes in the MHC class II region. *Curr. Opin. Immunol.*, 5, 17-20.
9. Nomenclature of HLA. Anthony Nolan Research Institute. [www.anthonynolan.org.mx](http://www.anthonynolan.org.mx). 2007.

Ref Type: Internet Communication

10. Mungall, A.J., Palmer, S.A., Sims, S.K., Edwards, C.A., Ashurst, J.L., Wilming, L., Jones, M.C., Horton, R., Hunt, S.E., Scott, C.E., Gilbert, J.G., Clamp, M.E., Bethel, G., Milne, S., Ainscough, R., Almeida, J.P., Ambrose, K.D., Andrews, T.D., Ashwell, R.I., Babbage, A.K., Bagguley, C.L., Bailey, J., Banerjee, R., Barker, D.J., Barlow, K.F., Bates, K., Beare, D.M., Beasley, H., Beasley, O., Bird, C.P., Blakey, S., Bray-Allen, S., Brook, J., Brown, A.J., Brown, J.Y., Burford, D.C., Burrill, W., Burton, J., Carder, C., Carter, N.P., Chapman, J.C., Clark, S.Y., Clark, G., Clee, C.M., Clegg, S., Cobley, V., Collier, R.E., Collins, J.E., Colman, L.K., Corby, N.R., Coville, G.J., Culley, K.M., Dhani, P., Davies, J., Dunn, M., Earthrowl, M.E., Ellington, A.E., Evans, K.A., Faulkner, L., Francis, M.D., Frankish, A., Frankland, J., French, L., Garner, P., Garnett, J., Ghori, M.J., Gilby, L.M., Gillson, C.J., Glithero, R.J., Grafham, D.V., Grant, M., Gribble, S., Griffiths, C., Griffiths, M., Hall, R., Halls, K.S., Hammond, S., Harley, J.L., Hart, E.A., Heath, P.D., Heathcote, R., Holmes, S.J., Howden, P.J., Howe, K.L., Howell, G.R., Huckle, E., Humphray, S.J., Humphries, M.D., Hunt, A.R., Johnson, C.M., Joy, A.A., Kay, M., Keenan, S.J., Kimberley, A.M., King, A., Laird, G.K., Langford, C., Lawlor, S., Leongamornlert, D.A., Leversha, M., Lloyd, C.R., Lloyd, D.M., Loveland, J.E., Lovell, J., Martin, S., Mashreghi-Mohammadi, M., Maslen, G.L., Matthews, L., McCann, O.T., McLaren, S.J., McLay, K., McMurray, A., Moore, M.J., Mullikin, J.C., Niblett, D., Nickerson, T., Novik, K.L., Oliver, K., Overton-Larty, E.K., Parker, A., Patel, R., Pearce, A.V., Peck, A.I., Phillimore, B., Phillips, S., Plumb, R.W., Porter, K.M., Ramsey, Y., Ranby, S.A., Rice, C.M., Ross, M.T., Searle, S.M., Sehra, H.K., Sheridan, E., Skuce, C.D., Smith, S., Smith, M., Spraggon, L., Squares, S.L., Steward, C.A., Sycamore, N., Tamlyn-Hall, G., Tester, J., Theaker, A.J., Thomas, D.W., Thorpe, A., Tracey, A., Tromans, A., Tubby, B., Wall, M., Wallis, J.M., West, A.P., White, S.S., Whitehead, S.L., Whittaker, H.,

Wild,A., Willey,D.J., Wilmer,T.E., Wood,J.M., Wray,P.W., Wyatt,J.C., Young,L., Younger,R.M., Bentley,D.R., Coulson,A., Durbin,R., Hubbard,T., Sulston,J.E., Dunham,I., Rogers,J., and Beck,S. (2003) The DNA sequence and analysis of human chromosome 6. *Nature*, 425,805-811.

11. IMGT/HLA Database. <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla>. 2007.

Ref Type: Internet Communication

12. Barre-Sinoussi,F., Chermann,J.C., Rey,F., Nugeyre,M.T., Chamaret,S., Gruest,J., Dautet,C., Axler-Blin,C., Vezinet-Brun,F., Rouzioux,C., Rozenbaum,W., and Montagnier,L. (1983) Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, 220,868-871.
13. Gallo,R.C., Sarin,P.S., Gelmann,E.P., Robert-Guroff,M., Richardson,E., Kalyanaraman,V.S., Mann,D., Sidhu,G.D., Stahl,R.E., Zolla-Pazner,S., Leibowitch,J., and Popovic,M. (1983) Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, 220,865-867.
14. Levy,J.A., Hoffman,A.D., Kramer,S.M., Landis,J.A., Shimabukuro,J.M., and Oshiro,L.S. (1984) Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science*, 225,840-842.
15. Regenmortel MH, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, and Wickner RB. *Virus Taxonomy: The Classification and Nomenclature of Viruses. The Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Virus Taxonomy, VIIth Report of the ICTV.* 2000. San Diego, Academic Press.

Ref Type: Report

16. Fauci,A.S., Pantaleo,G., Stanley,S., and Weissman,D. (1996) Immunopathogenic mechanisms of HIV infection. *Ann.Intern.Med.*, 124,654-663.
17. Saah,A.J., Hoover,D.R., Weng,S., Carrington,M., Mellors,J., Rinaldo,C.R., Jr., Mann,D., Apple,R., Phair,J.P., Detels,R., O'Brien,S., Enger,C., Johnson,P., and Kaslow,R.A. (1998) Association of HLA profiles with early plasma viral load, CD4+ cell count and rate of progression to AIDS following acute HIV-1 infection. Multicenter AIDS Cohort Study. *AIDS*, 12,2107-2113.
18. Tindall,B., Cooper,D.A. (1991) Primary HIV infection: host responses and intervention strategies. *AIDS*, 5,1-14.
19. Horsburgh,C.R., Jr., Ou,C.Y., Jason,J., Holmberg,S.D., Longini,I.M., Jr., Schable,C., Mayer,K.H., Lifson,A.R., Schochetman,G., Ward,J.W., and . (1989) Duration of human immunodeficiency virus infection before detection of antibody. *Lancet*, 2,637-640.
20. Fauquete. *Virus Tanonomy VIII, Eight report of the Internatinal Committee on Taxonomy Viruses.* 2005. Elsevier Academic Press.

Ref Type: Generic

21. Coffin,J.M., Hughes,S.H., and Varmus,H.E. (1997) *Retroviruses.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview (NY).
22. B.Matija Peterlin, Didier Trono (2003) Hide,shield and strike back: how HIV-infected cells avoid immune eradication. *Nature Reviews*, 3,97-107.
23. Greene,W.C., Peterlin,B.M. (2002) Charting HIV's remarkable voyage through the cell:

Basic science as a passport to future therapy. *Nat.Med.*, 8,673-680.

24. Kwong,P.D., Wyatt,R., Robinson,J., Sweet,R.W., Sodroski,J., and Hendrickson,W.A. (1998) Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature*, 393,648-659.
25. Doms,R.W., Trono,D. (2000) The plasma membrane as a combat zone in the HIV battlefield. *Genes Dev.*, 14,2677-2688.
26. Scarlatti,G., Tresoldi,E., Bjorndal,A., Fredriksson,R., Colognesi,C., Deng,H.K., Malnati,M.S., Plebani,A., Siccardi,A.G., Littman,D.R., Fenyo,E.M., and Lusso,P. (1997) In vivo evolution of HIV-1 co-receptor usage and sensitivity to chemokine-mediated suppression. *Nat.Med.*, 3,1259-1265.
27. Cartier,C., Sivard,P., Tranchat,C., Decimo,D., Desgranges,C., and Boyer,V. (1999) Identification of three major phosphorylation sites within HIV-1 capsid. Role of phosphorylation during the early steps of infection. *J Biol.Chem.*, 274,19434-19440.
28. Franke,E.K., Yuan,H.E., and Luban,J. (1994) Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions. *Nature*, 372,359-362.
29. Ohagen,A., Gabuzda,D. (2000) Role of Vif in stability of the human immunodeficiency virus type 1 core. *J Virol.*, 74,11055-11066.
30. Schaeffer,E., Geleziunas,R., and Greene,W.C. (2001) Human immunodeficiency virus type 1 Nef functions at the level of virus entry by enhancing cytoplasmic delivery of virions. *J Virol.*, 75,2993-3000.
31. Wu,Y., Marsh,J.W. (2001) Selective transcription and modulation of resting T cell activity by preintegrated HIV DNA. *Science*, 293,1503-1506.
32. Barboric,M., Nissen,R.M., Kanazawa,S., Jabrane-Ferrat,N., and Peterlin,B.M. (2001) NF-kappaB binds P-TEFb to stimulate transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell*, 8,327-337.
33. Wei,P., Garber,M.E., Fang,S.M., Fischer,W.H., and Jones,K.A. (1998) A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. *Cell*, 92,451-462.
34. Price,D.H. (2000) P-TEFb, a cyclin-dependent kinase controlling elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol.*, 20,2629-2634.
35. Simmons,A., Aluvihare,V., and McMichael,A. (2001) Nef triggers a transcriptional program in T cells imitating single-signal T cell activation and inducing HIV virulence mediators. *Immunity.*, 14,763-777.
36. Khan,I.H., Sawai,E.T., Antonio,E., Weber,C.J., Mandell,C.P., Montbriand,P., and Luciw,P.A. (1998) Role of the SH3-ligand domain of simian immunodeficiency virus Nef in interaction with Nef-associated kinase and simian AIDS in rhesus macaques. *J Virol.*, 72,5820-5830.
37. Lama,J., Mangasarian,A., and Trono,D. (1999) Cell-surface expression of CD4 reduces HIV-1 infectivity by blocking Env incorporation in a Nef- and Vpu-inhibitable manner. *Curr.Biol.*, 9,622-631.
38. Zheng,Y.H., Plemenitas,A., Linnemann,T., Fackler,O.T., and Peterlin,B.M. (2001) Nef

increases infectivity of HIV via lipid rafts. *Curr.Biol.*, 11,875-879.

39. Greenway,A.L., McPhee,D.A., Allen,K., Johnstone,R., Holloway,G., Mills,J., Azad,A., Sankovich,S., and Lambert,P. (2002) Human immunodeficiency virus type 1 Nef binds to tumor suppressor p53 and protects cells against p53-mediated apoptosis. *J Virol.*, 76,2692-2702.
40. Le Gall,S., Erdtmann,L., Benichou,S., Berlioz-Torrent,C., Liu,L., Benarous,R., Heard,J.M., and Schwartz,O. (1998) Nef interacts with the mu subunit of clathrin adaptor complexes and reveals a cryptic sorting signal in MHC I molecules. *Immunity.*, 8,483-495.
41. Jowett,J.B., Planelles,V., Poon,B., Shah,N.P., Chen,M.L., and Chen,I.S. (1995) The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene arrests infected T cells in the G2 + M phase of the cell cycle. *J Virol.*, 69,6304-6313.
42. Goh,W.C., Rogel,M.E., Kinsey,C.M., Michael,S.F., Fultz,P.N., Nowak,M.A., Hahn,B.H., and Emerman,M. (1998) HIV-1 Vpr increases viral expression by manipulation of the cell cycle: a mechanism for selection of Vpr in vivo. *Nat.Med.*, 4,65-71.
43. Freed,E.O. (1998) HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. *Virology*, 251,1-15.
44. Wilk,T., Gross,I., Gowen,B.E., Rutten,T., de Haas,F., Welker,R., Krausslich,H.G., Boulanger,P., and Fuller,S.D. (2001) Organization of immature human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.*, 75,759-771.
45. Zimmerman,C., Klein,K.C., Kiser,P.K., Singh,A.R., Firestein,B.L., Riba,S.C., and Lingappa,J.R. (2002) Identification of a host protein essential for assembly of immature HIV-1 capsids. *Nature*, 415,88-92.
46. Reyes-Teran,G., Alcocer,V.J. (1994) [Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection]. *Rev.Invest Clin.*, 46,113-147.
47. Tindall,B., Cooper,D.A. (1991) Primary HIV infection: host responses and intervention strategies. *AIDS*, 5,1-14.
48. Pantaleo,G., Fauci,A.S. (1994) Tracking HIV during disease progression. *Curr.Opin.Immunol.*, 6,600-604.
49. Kahn,J.O., Walker,B.D. (1998) Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *N.Engl.J Med.*, 339,33-39.
50. Schacker,T.W., Hughes,J.P., Shea,T., Coombs,R.W., and Corey,L. (1998) Biological and virologic characteristics of primary HIV infection. *Ann.Intern.Med.*, 128,613-620.
51. Mellors,J.W., Rinaldo,C.R., Jr., Gupta,P., White,R.M., Todd,J.A., and Kingsley,L.A. (1996) Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science*, 272,1167-1170.
52. Haynes,B.F., Pantaleo,G., and Fauci,A.S. (1996) Toward an understanding of the correlates of protective immunity to HIV infection. *Science*, 271,324-328.
53. Cao,Y., Qin,L., Zhang,L., Safrit,J., and Ho,D.D. (1995) Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N.Engl.J Med.*, 332,201-208.

54. Martin,M.P., Carrington,M. (2005) Immunogenetics of viral infections. *Curr.Opin.Immunol.*, 17,510-516.
55. Gao,F., Bailes,E., Robertson,D.L., Chen,Y., Rodenburg,C.M., Michael,S.F., Cummins,L.B., Arthur,L.O., Peeters,M., Shaw,G.M., Sharp,P.M., and Hahn,B.H. (1999) Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes*. *Nature*, 397,436-441.
56. Leitner,T., Albert,J. (1999) The molecular clock of HIV-1 unveiled through analysis of a known transmission history. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 96,10752-10757.
57. O'Brien,S.J., Nelson,G.W. (2004) Human genes that limit AIDS. *Nat.Genet.*, 36,565-574.
58. Carrington,M., Nelson,G.W., Martin,M.P., Kissner,T., Vlahov,D., Goedert,J.J., Kaslow,R., Buchbinder,S., Hoots,K., and O'Brien,S.J. (1999) HLA and HIV-1: heterozygote advantage and B\*35-Cw\*04 disadvantage. *Science*, 283,1748-1752.
59. Tang,J., Costello,C., Keet,I.P., Rivers,C., Leblanc,S., Karita,E., Allen,S., and Kaslow,R.A. (1999) HLA class I homozygosity accelerates disease progression in human immunodeficiency virus type 1 infection. *AIDS Res.Hum.Retroviruses*, 15,317-324.
60. Scherer,A., Frater,J., Oxenius,A., Agudelo,J., Price,D.A., Gunthard,H.F., Barnardo,M., Perrin,L., Hirschel,B., Phillips,R.E., and McLean,A.R. (2004) Quantifiable cytotoxic T lymphocyte responses and HLA-related risk of progression to AIDS. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 101,12266-12270.
61. Trachtenberg,E., Korber,B., Sollars,C., Kepler,T.B., Hraber,P.T., Hayes,E., Funkhouser,R., Fugate,M., Theiler,J., Hsu,Y.S., Kunstman,K., Wu,S., Phair,J., Erlich,H., and Wolinsky,S. (2003) Advantage of rare HLA supertype in HIV disease progression. *Nat.Med.*, 9,928-935.
62. Moore,C.B., John,M., James,I.R., Christiansen,F.T., Witt,C.S., and Mallal,S.A. (2002) Evidence of HIV-1 adaptation to HLA-restricted immune responses at a population level. *Science*, 296,1439-1443.
63. Kiepiela,P., Leslie,A.J., Honeyborne,I., Ramduth,D., Thobakgale,C., Chetty,S., Rathnavalu,P., Moore,C., Pfafferott,K.J., Hilton,L., Zimbwa,P., Moore,S., Allen,T., Brander,C., Addo,M.M., Altfeld,M., James,I., Mallal,S., Bunce,M., Barber,L.D., Szinger,J., Day,C., Klenerman,P., Mullins,J., Korber,B., Coovadia,H.M., Walker,B.D., and Goulder,P.J. (2004) Dominant influence of HLA-B in mediating the potential co-evolution of HIV and HLA. *Nature*, 432,769-775.
64. Kaslow,R.A., Carrington,M., Apple,R., Park,L., Munoz,A., Saah,A.J., Goedert,J.J., Winkler,C., O'Brien,S.J., Rinaldo,C., Detels,R., Blattner,W., Phair,J., Erlich,H., and Mann,D.L. (1996) Influence of combinations of human major histocompatibility complex genes on the course of HIV-1 infection. *Nat.Med.*, 2,405-411.
65. Gao,X., Nelson,G.W., Karacki,P., Martin,M.P., Phair,J., Kaslow,R., Goedert,J.J., Buchbinder,S., Hoots,K., Vlahov,D., O'Brien,S.J., and Carrington,M. (2001) Effect of a single amino acid change in MHC class I molecules on the rate of progression to AIDS. *N.Engl.J Med.*, 344,1668-1675.
66. Itescu,S., Mathur-Wagh,U., Skovron,M.L., Brancato,L.J., Marmor,M., Zeleniuch-Jacquotte,A., and Winchester,R. (1992) HLA-B35 is associated with accelerated progression to AIDS. *J Acquir.Immune.Defic.Syindr.*, 5,37-45.
67. Lyles,R.H., Munoz,A., Yamashita,T.E., Bazmi,H., Detels,R., Rinaldo,C.R.,

- Margolick,J.B., Phair,J.P., and Mellors,J.W. (2000) Natural history of human immunodeficiency virus type 1 viremia after seroconversion and proximal to AIDS in a large cohort of homosexual men. Multicenter AIDS Cohort Study. *J Infect.Dis.*, 181,872-880.
68. Jin,X., Bauer,D.E., Tuttleton,S.E., Lewin,S., Gettie,A., Blanchard,J., Irwin,C.E., Safrit,J.T., Mittler,J., Weinberger,L., Kostrikis,L.G., Zhang,L., Perelson,A.S., and Ho,D.D. (1999) Dramatic rise in plasma viremia after CD8(+) T cell depletion in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *J Exp.Med.*, 189,991-998.
  69. Matano,T., Shibata,R., Siemon,C., Connors,M., Lane,H.C., and Martin,M.A. (1998) Administration of an anti-CD8 monoclonal antibody interferes with the clearance of chimeric simian/human immunodeficiency virus during primary infections of rhesus macaques. *J Virol.*, 72,164-169.
  70. Schmitz,J.E., Kuroda,M.J., Santra,S., Sasseville,V.G., Simon,M.A., Lifton,M.A., Racz,P., Tenner-Racz,K., Dalesandro,M., Scallon,B.J., Ghayeb,J., Forman,M.A., Montefiori,D.C., Rieber,E.P., Letvin,N.L., and Reimann,K.A. (1999) Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes. *Science*, 283,857-860.
  71. Friedrich,T.C., Valentine,L.E., Yant,L.J., Rakasz,E.G., Piaskowski,S.M., Furlott,J.R., Weisgrau,K.L., Burwitz,B., May,G.E., Leon,E.J., Soma,T., Napoe,G., Capuano,S.V., III, Wilson,N.A., and Watkins,D.I. (2007) Subdominant CD8+ T-cell responses are involved in durable control of AIDS virus replication. *J Virol.*, 81,3465-3476.
  72. Tsukamoto,T., Yuasa,M., Yamamoto,H., Kawada,M., Takeda,A., Igarashi,H., and Matano,T. (2007) Induction of CD8+ cells able to suppress CCR5-tropic simian immunodeficiency virus SIVmac239 replication by controlled infection of CXCR4-tropic simian-human immunodeficiency virus in vaccinated rhesus macaques. *J Virol.*, 81,11640-11649.
  73. Carrington,M., Nelson,G.W., Martin,M.P., Kissner,T., Vlahov,D., Goedert,J.J., Kaslow,R., Buchbinder,S., Hoots,K., and O'Brien,S.J. (1999) HLA and HIV-1: heterozygote advantage and B\*35-Cw\*04 disadvantage. *Science*, 283,1748-1752.
  74. Draenert,R., Verrill,C.L., Tang,Y., Allen,T.M., Wurcel,A.G., Boczanowski,M., Lechner,A., Kim,A.Y., Suscovich,T., Brown,N.V., Addo,M.M., and Walker,B.D. (2004) Persistent recognition of autologous virus by high-avidity CD8 T cells in chronic, progressive human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol.*, 78,630-641.
  75. Hay,C.M., Ruhl,D.J., Basgoz,N.O., Wilson,C.C., Billingsley,J.M., DePasquale,M.P., D'Aquila,R.T., Wolinsky,S.M., Crawford,J.M., Montefiori,D.C., and Walker,B.D. (1999) Lack of viral escape and defective in vivo activation of human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T lymphocytes in rapidly progressive infection. *J Virol.*, 73,5509-5519.
  76. Kiepiela,P., Ngumbela,K., Thobakgale,C., Ramduth,D., Honeyborne,I., Moodley,E., Reddy,S., de Pierres,C., Mncube,Z., Mkhwanazi,N., Bishop,K., van der,S.M., Nair,K., Khan,N., Crawford,H., Payne,R., Leslie,A., Prado,J., Prendergast,A., Frater,J., McCarthy,N., Brander,C., Learn,G.H., Nickle,D., Rousseau,C., Coovadia,H., Mullins,J.I., Heckerman,D., Walker,B.D., and Goulder,P. (2007) CD8+ T-cell responses to different HIV proteins have discordant associations with viral load. *Nat.Med.*, 13,46-53.
  77. Marsh,S.G.E., Parham,P., and Barber ,L.D. (2000) *The HLA Facts Book*.London.

78. Hill,A.V., Elvin,J., Willis,A.C., Aidoo,M., Allsopp,C.E., Gotch,F.M., Gao,X.M., Takiguchi,M., Greenwood,B.M., Townsend,A.R., and . (1992) Molecular analysis of the association of HLA-B53 and resistance to severe malaria. *Nature*, 360,434-439.
79. Steinle,A., Falk,K., Rotzschke,O., Gnau,V., Stevanovic,S., Jung,G., Schendel,D.J., and Rammensee,H.G. (1996) Motif of HLA-B\*3503 peptide ligands. *Immunogenetics*, 43,105-107.
80. Leslie,A., Price,D.A., Mkhize,P., Bishop,K., Rathod,A., Day,C., Crawford,H., Honeyborne,I., Asher,T.E., Luzzi,G., Edwards,A., Rousseau,C.M., Mullins,J.I., Tudor-Williams,G., Novelli,V., Brander,C., Douek,D.C., Kiepiela,P., Walker,B.D., and Goulder,P.J. (2006) Differential selection pressure exerted on HIV by CTL targeting identical epitopes but restricted by distinct HLA alleles from the same HLA supertype. *J Immunol.*, 177,4699-4708.
81. Ho,D.D., Neumann,A.U., Perelson,A.S., Chen,W., Leonard,J.M., and Markowitz,M. (1995) Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature*, 373,123-126.
82. Wei,X., Ghosh,S.K., Taylor,M.E., Johnson,V.A., Emini,E.A., Deutsch,P., Lifson,J.D., Bonhoeffer,S., Nowak,M.A., Hahn,B.H., and . (1995) Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature*, 373,117-122.
83. Preston,B.D., Poiesz,B.J., and Loeb,L.A. (1988) Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. *Science*, 242,1168-1171.
84. Coffin,J.M. (1979) Structure, replication, and recombination of retrovirus genomes: some unifying hypotheses. *J Gen.Virol.*, 42,1-26.
85. Coffin,J.M. (1992) Genetic diversity and evolution of retroviruses. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.*, 176,143-164.
86. Quiñones-Mateu,M.E., Arts,E.J. (1999) Recombination in HIV-1: update and implications. *AIDS Rev.*, 1,89-100.
87. Borrow,P., Lewicki,H., Hahn,B.H., Shaw,G.M., and Oldstone,M.B. (1994) Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol.*, 68,6103-6110.
88. Koup,R.A., Safrit,J.T., Cao,Y., Andrews,C.A., McLeod,G., Borkowsky,W., Farthing,C., and Ho,D.D. (1994) Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol.*, 68,4650-4655.
89. Lyles,R.H., Munoz,A., Yamashita,T.E., Bazmi,H., Detels,R., Rinaldo,C.R., Margolick,J.B., Phair,J.P., and Mellors,J.W. (2000) Natural history of human immunodeficiency virus type 1 viremia after seroconversion and proximal to AIDS in a large cohort of homosexual men. Multicenter AIDS Cohort Study. *J Infect.Dis.*, 181,872-880.
90. Ogg,G.S., Jin,X., Bonhoeffer,S., Dunbar,P.R., Nowak,M.A., Monard,S., Segal,J.P., Cao,Y., Rowland-Jones,S.L., Cerundolo,V., Hurley,A., Markowitz,M., Ho,D.D., Nixon,D.F., and McMichael,A.J. (1998) Quantitation of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA. *Science*, 279,2103-2106.
91. Frahm,N., Korber,B.T., Adams,C.M., Szinger,J.J., Draenert,R., Addo,M.M.,

- Feeney, M.E., Yusim, K., Sango, K., Brown, N.V., SenGupta, D., Piechocka-Trocha, A., Simonis, T., Marincola, F.M., Wurcel, A.G., Stone, D.R., Russell, C.J., Adolf, P., Cohen, D., Roach, T., StJohn, A., Khatri, A., Davis, K., Mullins, J., Goulder, P.J., Walker, B.D., and Brander, C. (2004) Consistent cytotoxic-T-lymphocyte targeting of immunodominant regions in human immunodeficiency virus across multiple ethnicities. *J Virol.*, 78, 2187-2200.
92. Goulder, P.J., Watkins, D.I. (2004) HIV and SIV CTL escape: implications for vaccine design. *Nat.Rev.Immunol.*, 4, 630-640.
  93. Geels, M.J., Cornelissen, M., Schuitemaker, H., Anderson, K., Kwa, D., Maas, J., Dekker, J.T., Baan, E., Zorgdrager, F., van den, B.R., van Beelen, M., Lukashov, V.V., Fu, T.M., Paxton, W.A., van der, H.L., Dubey, S.A., Shiver, J.W., and Goudsmit, J. (2003) Identification of sequential viral escape mutants associated with altered T-cell responses in a human immunodeficiency virus type 1-infected individual. *J Virol.*, 77, 12430-12440.
  94. Jamieson, B.D., Yang, O.O., Hultin, L., Hausner, M.A., Hultin, P., Matud, J., Kunstman, K., Killian, S., Altman, J., Kommander, K., Korber, B., Giorgi, J., and Wolinsky, S. (2003) Epitope escape mutation and decay of human immunodeficiency virus type 1-specific CTL responses. *J Immunol.*, 171, 5372-5379.
  95. Brander, C., Hartman, K.E., Trocha, A.K., Jones, N.G., Johnson, R.P., Korber, B., Wentworth, P., Buchbinder, S.P., Wolinsky, S., Walker, B.D., and Kalams, S.A. (1998) Lack of strong immune selection pressure by the immunodominant, HLA-A\*0201-restricted cytotoxic T lymphocyte response in chronic human immunodeficiency virus-1 infection. *J Clin.Invest.*, 101, 2559-2566.
  96. Altfeld, M., Rosenberg, E.S., Shankarappa, R., Mukherjee, J.S., Hecht, F.M., Eldridge, R.L., Addo, M.M., Poon, S.H., Phillips, M.N., Robbins, G.K., Sax, P.E., Boswell, S., Kahn, J.O., Brander, C., Goulder, P.J., Levy, J.A., Mullins, J.I., and Walker, B.D. (2001) Cellular immune responses and viral diversity in individuals treated during acute and early HIV-1 infection. *J Exp.Med.*, 193, 169-180.
  97. Klenerman, P., Wu, Y., and Phillips, R. (2002) HIV: current opinion in escapology. *Curr.Opin.Microbiol.*, 5, 408-413.
  98. Kelleher, A.D., Long, C., Holmes, E.C., Allen, R.L., Wilson, J., Conlon, C., Workman, C., Shaunak, S., Olson, K., Goulder, P., Brander, C., Ogg, G., Sullivan, J.S., Dyer, W., Jones, I., McMichael, A.J., Rowland-Jones, S., and Phillips, R.E. (2001) Clustered mutations in HIV-1 gag are consistently required for escape from HLA-B27-restricted cytotoxic T lymphocyte responses. *J Exp.Med.*, 193, 375-386.
  99. Yusim, K., Kesmir, C., Gaschen, B., Addo, M.M., Altfeld, M., Brunak, S., Chigaev, A., Detours, V., and Korber, B.T. (2002) Clustering patterns of cytotoxic T-lymphocyte epitopes in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) proteins reveal imprints of immune evasion on HIV-1 global variation. *J Virol.*, 76, 8757-8768.
  100. Borrow, P., Lewicki, H., Hahn, B.H., Shaw, G.M., and Oldstone, M.B. (1994) Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol.*, 68, 6103-6110.
  101. Koup, R.A., Safrit, J.T., Cao, Y., Andrews, C.A., McLeod, G., Borkowsky, W., Farthing, C., and Ho, D.D. (1994) Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol.*, 68, 4650-4655.

102. Lyles,R.H., Munoz,A., Yamashita,T.E., Bazmi,H., Detels,R., Rinaldo,C.R., Margolick,J.B., Phair,J.P., and Mellors,J.W. (2000) Natural history of human immunodeficiency virus type 1 viremia after seroconversion and proximal to AIDS in a large cohort of homosexual men. Multicenter AIDS Cohort Study. *J Infect.Dis.*, 181,872-880.
103. Ogg,G.S., Jin,X., Bonhoeffer,S., Dunbar,P.R., Nowak,M.A., Monard,S., Segal,J.P., Cao,Y., Rowland-Jones,S.L., Cerundolo,V., Hurley,A., Markowitz,M., Ho,D.D., Nixon,D.F., and McMichael,A.J. (1998) Quantitation of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA. *Science*, 279,2103-2106.
104. Gorodezky,C., Alaez,C., Vazquez-Garcia,M.N., de la,R.G., Infante,E., Balladares,S., Toribio,R., Perez-Luque,E., and Munoz,L. (2001) The genetic structure of Mexican Mestizos of different locations: tracking back their origins through MHC genes, blood group systems, and microsatellites. *Hum.Immunol.*, 62,979-991.
105. Cao,K., Hollenbach,J., Shi,X., Shi,W., Chopek,M., and Fernandez-Vina,M.A. (2001) Analysis of the frequencies of HLA-A, B, and C alleles and haplotypes in the five major ethnic groups of the United States reveals high levels of diversity in these loci and contrasting distribution patterns in these populations. *Hum.Immunol.*, 62,1009-1030.
106. Mueller,S.M., Schaetz,B., Eismann,K., Bergmann,S., Bauerle,M., Schmitt-Haendle,M., Walter,H., Schmidt,B., Korn,K., Sticht,H., Spriewald,B., Harrer,E.G., and Harrer,T. (2007) Dual selection pressure by drugs and HLA class I-restricted immune responses on human immunodeficiency virus type 1 protease. *J Virol.*, 81,2887-2898.
107. Turnbull,E.L., Lopes,A.R., Jones,N.A., Cornforth,D., Newton,P., Aldam,D., Pellegrino,P., Turner,J., Williams,I., Wilson,C.M., Goepfert,P.A., Maini,M.K., and Borrow,P. (2006) HIV-1 epitope-specific CD8+ T cell responses strongly associated with delayed disease progression cross-recognize epitope variants efficiently. *J Immunol.*, 176,6130-6146.
108. Carpenter,C.C., Fischl,M.A., Hammer,S.M., Hirsch,M.S., Jacobsen,D.M., Katzenstein,D.A., Montaner,J.S., Richman,D.D., Saag,M.S., Schooley,R.T., Thompson,M.A., Vella,S., Yeni,P.G., and Volberding,P.A. (1997) Antiretroviral therapy for HIV infection in 1997. Updated recommendations of the International AIDS Society-USA panel. *JAMA*, 277,1962-1969.
109. Mellors,J.W., Rinaldo,C.R., Jr., Gupta,P., White,R.M., Todd,J.A., and Kingsley,L.A. (1996) Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science*, 272,1167-1170.
110. Mellors,J.W., Munoz,A., Giorgi,J.V., Margolick,J.B., Tassoni,C.J., Gupta,P., Kingsley,L.A., Todd,J.A., Saah,A.J., Detels,R., Phair,J.P., and Rinaldo,C.R., Jr. (1997) Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection. *Ann.Intern.Med.*, 126,946-954.
111. Saag,M.S., Holodniy,M., Kuritzkes,D.R., O'Brien,W.A., Coombs,R., Poscher,M.E., Jacobsen,D.M., Shaw,G.M., Richman,D.D., and Volberding,P.A. (1996) HIV viral load markers in clinical practice. *Nat.Med.*, 2,625-629.
112. Nicholson,J.K. (1989) Use of flow cytometry in the evaluation and diagnosis of primary and secondary immunodeficiency diseases. *Arch.Pathol.Lab Med.*, 113,598-605.
113. Schneider S., Roessli D., and Excoffier L. ARLEQUIN a software package for population genetics data analysis version 3.11. 2007. Evolutionary Bioinformatics

Online.

Ref Type: Computer Program

114. Guo,S.W., Thompson,E.A. (1992) Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*, 48,361-372.
115. Storey,J.D., Tibshirani,R. (2003) Statistical significance for genomewide studies. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 100,9440-9445.
116. R Development Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. (2.6.2). 2008. R Foundation for Statistical Computing.

Ref Type: Computer Program

117. Los Alamos HIV Databases [www.hiv.lanl.gov](http://www.hiv.lanl.gov). 2008.

Ref Type: Internet Communication

118. Rivera-Morales,L.G., Novitsky,V.A., Trujillo,J.R., Lavallo-Montalvo,C., Cano-Dominguez,C., Ramos-Jimenez,J., Jimenez-Rios,E., Flores-Flores,L., Lopez-Guillen,P., Gilbert,P., Vannberg,F., Tamez-Guerra,R., Rodriguez-Padilla,C., and Essex,M. (2001) The molecular epidemiology of HIV type 1 of men in Mexico. *AIDS Res.Hum.Retroviruses*, 17,87-92.
119. D.Garrido et al. Characteristic features of HIV molecular epidemiology in central Mexico. *Keystone 2007*. 25-3-2007. 25-3-2007.

Ref Type: Personal Communication

120. Eyzaguirre,L., Brouwer,K.C., Nadai,Y., Patterson,T.L., Ramos,R., Firestone,C.M., Orozovich,P., Strathdee,S.A., and Carr,J.K. (2007) 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*, 23,331-334.
121. Hendel,H., Caillat-Zucman,S., Lebuane,H., Carrington,M., O'Brien,S., Andrieu,J.M., Schachter,F., Zagury,D., Rappaport,J., Winkler,C., Nelson,G.W., and Zagury,J.F. (1999) New class I and II HLA alleles strongly associated with opposite patterns of progression to AIDS. *J Immunol.*, 162,6942-6946.
122. Magierowska,M., Theodorou,I., Debre,P., Sanson,F., Autran,B., Riviere,Y., Charron,D., and Costagliola,D. (1999) Combined genotypes of CCR5, CCR2, SDF1, and HLA genes can predict the long-term nonprogressor status in human immunodeficiency virus-1-infected individuals. *Blood*, 93,936-941.
123. Goulder,P.J., Bunce,M., Krausa,P., McIntyre,K., Crowley,S., Morgan,B., Edwards,A., Giangrande,P., Phillips,R.E., and McMichael,A.J. (1996) Novel, cross-restricted, conserved, and immunodominant cytotoxic T lymphocyte epitopes in slow progressors in HIV type 1 infection. *AIDS Res.Hum.Retroviruses*, 12,1691-1698.
124. Leslie,A.J., Pfafferott,K.J., Chetty,P., Draenert,R., Addo,M.M., Feeney,M., Tang,Y., Holmes,E.C., Allen,T., Prado,J.G., Altfeld,M., Brander,C., Dixon,C., Ramduth,D., Jeena,P., Thomas,S.A., St John,A., Roach,T.A., Kupfer,B., Luzzi,G., Edwards,A., Taylor,G., Lyall,H., Tudor-Williams,G., Novelli,V., Martinez-Picado,J., Kiepiela,P., Walker,B.D., and Goulder,P.J. (2004) HIV evolution: CTL escape mutation and reversion after transmission. *Nat.Med.*, 10,282-289.