



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“Caracterización de sitios de interacción entre
presión selectiva inmune y por fármacos
antirretrovirales en la porción terminal Gag de
VIH-1.”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

TANIA JIMENA ESCAMILLA GÓMEZ.



MÉXICO, D.F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: FRANCISCO JAVIER PLASENCIA DE LA PARRA _____

VOCAL: TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA _____

SECRETARIO: SANTIAGO ÁVILA RÍOS _____

1er. SUPLENTE: ROCIO GABRIELA TIRADO MENDOZA _____

2° SUPLENTE: LORENZO ISLAS VÁZQUEZ _____

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS (CIENI),
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS (INER).**

DR. SANTIAGO ÁVILA RÍOS.
ASESOR DEL TEMA.

TANIA JIMENA ESCAMILLA GÓMEZ.
SUSTENTANTE.

*"Singing don't worry about a thing...
cause every Little thing it 's gonna be all right"
Bob Marley.*

A mis padres Aurora y Víctor por tratar todos los días de hacer el camino lo más fácil, por ser proveedores excepcionales y jamás recibir un no, por respuesta. Por todas sus enseñanzas y ejemplo de carácter que tuvieron como consecuencia a dos hijos profesionales, llenos de vida y metas. Felicidades por su trabajo. Los amo mucho! Y esto es para ustedes.....

A mi hermano Alex, porque tu enorme fortaleza y compromiso no dejan de sorprenderme todos los días, por ser un líder y meta en mi camino académico y mi diván en mis frustraciones y confesiones profundas. Por asomarte en mi ventana y asustarme todos los días para sacarme una sonrisa a pesar del cansancio, por las noches de pelis y tele en tu sillón. Gracias por tus enseñanzas de vida para seguir adelante, te amo!

A mi abue Lucha por tener esas palabras que me conmueven en lo más profundo, por tu abrazo y tus palabras ese 31 dic 2012 que me hicieron tener esta nueva certeza en mi vida. Te amo y gracias por no rendirte para estar con nosotros. A mi abuelo Rafa por ser un ejemplo de fortaleza y mostrarme que siempre en la vida se puede hacer lo que uno mas quiere y luchar por esa individualidad. Son un ejemplo formidable de vida.

A toda la familia Gómez Lara que con altas y bajas, siempre escucharon mis ñoñerías y me alentaron para llegar al final del camino, gracias Bere por pasearme y escucharme y compartirme tus gustos y creatividad, gracias Tía por tu asilo en las jornadas de trabajo, gracias Tío Rafa, Rodolfo e Ivan por interesarse, presumirme y alentarme para tener metas grandes, y a ti Sebastián por tu amor y sonrisas incondicionales.

Gracias a todas las amistades que han tomado otro camino pero que dejaron su pedacito en mí, a los que siguen formando parte de mi vida: Jorge y Vivis gracias!. A todos los que forman parte de mi vida mi amor y mi disciplina, Vero, Jessi, Angie, Karen, Mireya, Brenda, Saammil!, Memo!, David, Matias, Carmen, Carlos, Alfredo, Richard, Gerardo, Mario y muchos mas!...son una motivación que defiende mi parte egoísta con la ñoñes.

A mis amigos entrañables de la facultad, Pollo, Itzelita y Eli, que hicieron el inicio, mitad y final de la carrera experiencias inolvidables, por las horas de NO estudiar antes de los depas, por las ñoñerías y ñoñerías con humor! Y por la borrachera de la quema que nos acercó a otro nivel jajaja. Gracias Itzel porque jamás tuve una compañera de laboratorio como tu!, Pollo gracias por tu confianza por entender mi crush con Garza jajaja ser un ejemplo de nerd que rompe las reglas, a eli porque las clases no compartidas que jamás fueron impedimento para fomentar una amistad muy bonita! Gracias por hacerme parte de tu vida y conocernos cada vez más. En esta etapa todas las frustraciones y tareas interminables resultaron exitosas por los conocimientos y horas de estudio compartidas con ustedes Los quiero tanto!. A Euni que aunque nos conocimos un poquito después, te has convertido en una personita muy especial que a pesar de las diferencias personales hicimos un click que a muchos les sorprende jaja te quiero muchísimoooo! Gracias por tu amistad!! Y a seguirle! A mi corazono David por su eterna amistad que sigue creciendo, gracias por nunca dudar de mis capacidades y darme

zapes para re-confiar en lo que soy!!!! Te quiero y amo a pesar de tus preguntas intensas jaja!!!. A Eri por tener un sistema de estudio tan cercano al mío que nos llevo al éxito rotundo! jaja gracias por todo y que nuestra amistad siga creciendo!! Waus y Hector por recordarme mi sonrisa jeje y ser parte de mi simpatía, Roy, Cris y Vince que confiaron en mi "open mind" Anita, Sandy, Aguayo, Jess, Felipe, Jessica, Fer, Aurora, David, etc, etc. a todos que a pesar de lo trillado, cada palabra es verdad y llena de sentimiento: Los llevo en mi corazón!

Mis maestros que llevaron a un nivel diferente la relación, gracias Naye por siempre recibirme con una sonrisa, ser una excelente maestra e interesarte tan padre en mi éxito profesional, a Normita por todo su interés y enseñanzas. A la doctora Perla por hacernos sentir VIP. A los inigualables profesores: Jose Luz, Vanessa, Saturnino, Alicia, Garza!, Pastelín, Normita, Pedro, Charly, Texta, Marisol, Gisela, mi profesora de Q.G. II, Sullivan, Tzvetanka.

A todos los estudiantes del CIENI por acogerme de esta manera y apodarme como "la pequeña niña feliz", son ahora parte de mi familia que me hace crecer todos los días y en todos aspectos, gracias Lety, Gonzalo, Dani, Beto, Clau, Vero, Maggie, Dani, Marissa, Selma, Paloma. A Mari y Thaly que sabemos que nadie podría aguantar el nivel de frustración por un año jajaja el fitness team perfecto! Gracias por escucharme y apoyarme cuando personalmente las cosas se pusieron difíciles, las adoro y quiero en lo más profundo!! Gracias al Doctor Santiago por siempre mostrar el lado bonito de la investigación, ha sido un excelente tutor y ejemplo para la realización de este proyecto, gracias por la paciencia y empeño en mi trabajo. Gracias al doctor Gustavo y a la fundación por el apoyo económico en este proyecto mil gracias!.

Luis y Yisus que son parte de familia, de mi corazón, de mi vida, saben que los quiero como hermanos y que son parte fundamental, y que esto que hemos construido por tantos años durará mientras respire. Los amo!. Diana que se nos fue en el camino, gracias por tu sinceridad el tiempo que duro, tus pasos en mi vida estarán vigentes por siempre.

A ti Ivan, porque eres mucho de la base y corazón de lo que ahora soy como persona. Gracias por tu apoyo incondicional, por esperarme los viernes de departamentales y compartir unas pocas horas juntos, por entender mi estrés y sueño en las mañanas de metro, gracias por compartir el gusto por la música y los incontables conciertos con Omar, Ivancin, Armando, Furby, y los que llegaron y se fueron....por compartirme todo tus gustos, alegrías y tristezas como sólo tú y yo entenderemos. Gracias por ser pilar fundamental en este camino y por tu amor. Porque sabes que siempre recordare mi pensamiento inherente cuando compartíamos todo: "el mundo se ve mejor tomando tu mano". Gracias por hacer que la vida me sorprendiera y hacerlo parte de mis "principios" siempre con la sonrisa que me caracteriza. Sé que vienen cosas mejores en la vida de los dos y tengo un profundo agradecimiento contigo que estas líneas jamás podrán expresar.

Gracias a todas esas personitas nuevas que van apareciendo en mi vida y fortalecen mi esencia: Vivir y volar con una sonrisa, luchando y buscando lo que más te hace feliz para sentirte ligero aún cuando la vida te muestre su lado más complicado.

Y claro que por supuesto, gracias a mi Universidad la mejor casa de estudio que pudiera tener!
Universitaria siempre de corazón!

ÍNDICE.

RESUMEN.....	vii
LISTADO DE ABREVIATURAS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Aparición de una nueva enfermedad.....	1
1.2. Epidemiología del VIH/SIDA.	2
1.2.1. VIH En el Mundo.....	2
1.2.2. VIH en México.....	3
1.3. Generalidades del VIH.....	6
1.3.1. Origen del VIH.	6
1.3.2. Clasificación del VIH.....	6
1.3.3. Estructura del virión	8
1.3.4. Organización del genoma viral.....	9
1.3.5. Proteínas reguladoras.....	11
1.3.6. Proteínas accesorias.....	12
1.3.7. Proteínas estructurales.....	15
1.4. Ciclo de replicación.....	16
1.5. Historia Natural de la enfermedad por VIH.....	19
1.6. Tratamiento antirretroviral	23
1.6.1. El tratamiento antirretroviral en México	25
1.6.2. Resistencia al tratamiento antirretroviral.	26
1.6.3. Patrones de resistencia a Inhibidores de Proteasa.	28
1.7. Respuesta inmune contra el VIH.....	32
1.7.1. Presión selectiva por moléculas HLA.....	34
1.7.2. Múltiple presión selectiva sobre el VIH.....	36
CAPÍTULO II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	38
1. Planteamiento del problema.	38
CAPÍTULO III. HIPÓTESIS.....	41
1. Hipótesis.....	41
CAPÍTULO IV. OBJETIVOS.....	42
1.1. Objetivos Generales.	42
1.2. Particulares.....	42

CAPÍTULO V. METODOLOGÍA.	44
1. Selección de pacientes.	44
2. Extracción de RNA.....	44
3. Amplificación del gen <i>gag-pro</i> . PCR anidada.	44
4. Verificación de los productos amplificados por electroforesis en gel de agarosa al 1%..	46
5. Purificación de los productos de amplificación.	46
6. Cuantificación de los productos de amplificación.	47
7. Secuenciación del gen <i>gag-pro</i>	47
8. Análisis se las secuencias <i>gag-pro</i>	49
8.1. Alineamiento de las secuencias.	49
8.2. Análisis filogenéticos.....	49
9. Análisis evolutivo de las secuencias incluidas en el estudio.....	49
10. Análisis de comparación de variabilidad	50
11. Impacto de presión selectiva ejercida por HLA.	51
CAPÍTULO VI. RESULTADOS	53
6.1. Características de la cohorte.....	53
6.2. Análisis filogenético de las secuencias en estudio.	54
6.3. Comparación de variabilidad por entropía de Shannon.....	63
6.4. Descripción de la variabilidad de los motivos de corte del gen <i>gag</i> en la cohorte de estudio.	65
6.5. Análisis de mutaciones de resistencia en <i>pol</i> y de mutaciones previamente asociadas al uso de Inhibidores de Proteasa en <i>gag</i> en los virus de la cohorte en estudio	67
6.5.1 Mutaciones mayores de resistencia a inhibidores de proteasa en el gen <i>pol</i> ...	68
6.5.2 Frecuencia de aparición de mutaciones asociadas a la exposición a IPs en el gen <i>gag</i>	69
6.6. Sitios bajo presión selectiva en el gen <i>gag</i> . Análisis por modelos de razón de sustituciones sinónimas y no sinónimas.....	74
6.7. Análisis conjunto: análisis de presión selectiva positiva y mutaciones asociadas al uso de IPs en el gen <i>gag</i> y su posible confluencia con la presión selectiva por HLA.	80
6.8. Análisis de las posiciones con evidencia de presión selectiva exclusivas de la cohorte de pacientes con resistencia a IPs y de mutaciones asociadas al uso de IPs.....	85
6.9. Presión selectiva en la porción de traslape del gen <i>gag</i> con el gen <i>pol</i>	89
CAPÍTULO VII. DISCUSIÓN.	92
CAPÍTULO VIII. CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS	111
1. Conclusión.....	111
2. Perspectivas.	111
CAPÍTULO IX. BIBLIOGRAFÍA.	113

RESUMEN.

ANTECEDENTES. Una vez iniciado un esquema de tratamiento antirretroviral, el VIH está sujeto a una fuerza selectora que conlleva a cambios en el genoma viral manifestados en mutaciones mayores y menores de resistencia, que cuando se habla de IPs, se seleccionan dentro de proteasa. Dado que la enzima es esencial para la maduración, al procesar polipéptidos como Pr55^{gag} se han identificado mutaciones compensatorias y/o de resistencia en este sustrato, modificando así, el grado de polimorfismo en *gag*. Por otro lado, la respuesta citotóxica mediada por CTLs y restringida por alelos HLA-I, ejerce una fuerza selectora adicional muy fuerte que conlleva a la selección de mutaciones de escape, y donde se han demostrado asociaciones entre estos cambios y alelos HLA-I específicos. Dado este panorama de múltiple presión selectiva, el presente estudio pretende identificar y caracterizar interacciones entre estas presiones selectivas, en una cohorte de pacientes que presentan resistencia a IPs, evaluando la respuesta adaptativa en *gag*, así como la identificación de mutaciones que surgen exclusivamente por el uso de IPs en *gag*. Los resultados de este estudio, contribuirán al entendimiento de esta múltiple presión selectiva que permitirá optimizar la elección de antirretrovirales en el contexto inmunogenético mexicano.

METODOLOGÍA. 74 muestras de plasma del banco de pacientes del Laboratorio de Diagnóstico Viroológico del CIENI infectados por VIH-1 B con resistencia a IPs. Se extrajo RNA y se amplificó la región *gag-pro* por PCR anidada con transcripción inversa. Se visualizaron en gel de agarosa al 1%, se purificaron y cuantificaron. Se hizo la reacción de secuencia por método de Sanger (reactivo Big Dye v.3.1) y se purificó. Utilizando Mega 5.05 se obtuvo el alineamiento y el árbol filogenético con el método de Máxima Versosimilitud, el modelo GTR y 1000 réplicas de bootstrap, secuencias HXB2 y subtipo B incluidas. Se comparó la variabilidad de *gag* y de los motivos de corte, contra pacientes vírgenes a tratamiento. Se obtuvo la frecuencia de mutaciones de resistencia en *pol* hacia IPs y de mutaciones asociadas en *gag* y se comparó con pacientes vírgenes a tratamiento evaluando las diferencias por exactas de Fisher. Se obtuvieron las posiciones con evidencia de selección positiva por razón de dN/dS para el marco de lectura de *gag* y el marco de lectura de *pol*, las cuales fueron comparadas con las encontradas en vírgenes a tratamiento. Se buscaron asociaciones de estas posiciones con alelos HLA-I específicos utilizando los resultados del análisis de PDN y las asociaciones reportadas por la base de datos de los Álamos.

RESULTADOS. Se tuvo una cohorte mayoritaria de la zona centro de México con enriquecida en etapas crónicas de la infección. El árbol filogenético permitió la identificación de pares del mismo paciente y mostró a una población homogéneamente distribuida sin evidencia de agrupaciones. La comparación de variabilidad en *gag* medida en entropía de Shannon, mostró una mayor variabilidad en los pacientes con resistencia a IPs especialmente hacia p2p7p1p6, respecto a vírgenes a tratamiento. Se obtuvo mayor grado de polimorfismo en posiciones específicas dentro de los motivos de corte en los pacientes con resistencia a IPs especialmente hacia p2p7p1p6 en comparación con pacientes vírgenes a tratamiento. La mutación de resistencia a IPs en *pol* de mayor frecuencia fue L90M seguida de M46I/L, V82A/S, I54V patrón que pudo asociarse a LPV/r (utilizado en el CIENI). Se encontraron mutaciones en *gag* asociadas al uso de IPs, una de ellas con diferencia significativa en pacientes vírgenes a tratamiento sugiriendo eventos fundadores previos o TDR. Cuatro mutaciones con la mayor diferencia en la cohorte de estudio (V128/T, P453A/L/T, I437V, A431V). Se encontraron 28 posiciones con evidencia de selección positiva la mayoría situadas en la porción final p2p7p1p6. Se compararon con las posiciones en pacientes vírgenes a tratamiento encontrándose coincidencia en 24. Las 4 posiciones restantes sugieren ser efecto de la presión exclusiva ejercida por IPs (A431V, R58K/Q, F463I/L, Q476P/R/K). Se buscó la asociación con las mutaciones asociadas a IPs y con algún alelo HLA-I por el análisis de PDN y la base de datos de los Álamos. Se encontraron siete asociaciones: H219 en pacientes vírgenes a tratamiento, A431 en pacientes con resistencia a IPs y E12, T81, S373, I389 y V390 como posiciones con evidencia de la confluencia entre presiones selectivas múltiples. T81 y V390 resultaron posiciones que muestran posibles efectos de doble ventaja o acorralamiento viral.

LISTADO DE ABREVIATURAS.

a.a.	Aminoácido.
APC	Célula Presentadora de Antígeno, en inglés.
CRF	Formas Recombinantes Circulantes, en inglés.
CTLs	Linfocitos T Citotóxicos, en inglés.
dN	Sustituciones No Sinónimas, en inglés.
DNA	Ácido Desoxirribonucleico, en inglés.
dS	Sustituciones Sinónimas, en inglés.
HLA	Antígeno Leucocitario Humano, en inglés.
HSH	Hombres que tienen sexo con hombres.
IPs	Inhibidores de Proteasa.
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad, en inglés.
OMS	Organización Mundial de la Salud.
ORF	Fragmentos de Lectura Abierta, en inglés.
PDN	Redes de Dependencia Filogenética, en inglés.
RNA	Ácido Ribonucleico, en inglés.
RT	Transcriptasa Inversa, en inglés.
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida.
TAR	Tratamiento antirretroviral.
TCR	Receptor de células T.
TDR	Resistencia transmitida a antirretrovirales, en inglés.
UDI	Usuarios de drogas inyectables.
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana.

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Estimado de adultos y niños que viven con VIH en el mundo, reportado por la OMS en 2011.	3
Figura 1.2. Distribución de casos de SIDA para hombres en México. Datos al 30 de septiembre del 2011 según CENSIDA. UDI (usuarios de droga inyectables), HSH (hombres que tienen sexo con hombres).	4
Figura 1.3. Distribución de casos de SIDA para mujeres en México. Datos al 30 de septiembre del 2011 según CENSIDA.....	5
Figura 1.4. Distribución global de subtipos de VIH-I y sus formas recombinantes circulantes (CRF).	8
Figura 1.5. Representación gráfica de una partícula madura del VIH.....	9
Figura 1.6 Organización del genoma del VIH-I.....	10
Figura 1.7. Esquema que muestra la interacción del dominio terminal PTAP presente en p6 con la maquinaria de vesiculación celular.....	16
Figura 1.8. Representación esquemática del ciclo de replicación del VIH.....	19
Figura 1.9 Historia natural de la enfermedad causada por VIH, sin intervención de tratamiento antirretroviral.....	22
Figura 1.10. Elegibilidad para el tratamiento antirretroviral.....	25
Figura 1.11 Acceso al TAR en México	25
Figura 1.12 Surgimiento de mutaciones de resistencia en el VIH a causa del tratamiento subóptimo.....	27
Figura 1.13. Cuadro que muestra la variación natural de los cinco motivos de corte a lo largo de <i>gag</i>	30
Figura 1.14. Variación natural de los motivos de corte en Gag.	31
Figura 1.15. Respuesta tipo Th1 en linfocitos TCD4+ contra el VIH.....	33
Figura 1.16. Efecto de CTL's sobre el VIH.....	34
Figura 5.1. Ejemplo de gel de agarosa al 1%.....	46
Figura 6.1 Árbol filogenético para las 76 secuencias de la región <i>gag-pro</i> de los virus presentes en cada paciente incluidas en el estudio.....	55
Figura 6.2 Árbol filogenético para la región <i>gag-pro</i> de los virus de los pacientes incluidos en el estudio. Cargas virales <10,000 copias/ μ L	60
Figura 6.3 Árbol filogenético para la región <i>gag-pro</i> de los virus de los pacientes incluidos en el estudio. CD4+ >200 células/ μ L y CD4+ <100 células/ μ L.....	61
Figura 6.4 Árbol filogenético para la región <i>gag-pro</i> de los virus de los pacientes incluidos en el estudio de mutaciones de resistencia en <i>pol</i>	62

Figura 6.5. Diferencia de Entropía en el gen <i>gag</i> de virus de pacientes con resistencia a IPs y pacientes vírgenes a tratamiento.....	64
Figura 6.6. Comparación de la variabilidad de los motivos de corte a lo largo de Gag en secuencias de pacientes con resistencia a IPs y pacientes vírgenes a tratamiento antirretroviral	66
Figura 6.7. Frecuencia de aparición de mutaciones mayores de resistencia a Inhibidores de Proteasa en el gen de la proteasa viral de los virus de los pacientes de la cohorte en estudio.....	68
Figura 6.8. Mutaciones seleccionadas en <i>gag</i> por el uso de IPs: Comparación entre pacientes con resistencia a IPs y pacientes vírgenes a tratamiento.	72
Figura 6.9. Posiciones seleccionadas positiva y negativamente a lo largo del gen <i>gag</i> en los pacientes con resistencia a IPs.	75
Figura 6.10. Conjunto de árboles que muestra las secuencias de los pacientes con alguna de las 4 posiciones exclusivas de la cohorte.....	78
Figura 6.11. Diagrama de Venn que muestra todas las posiciones bajo presión selectiva positiva de los pacientes vírgenes a tratamiento y los pacientes con resistencia a IPs.....	80
Figura 6.12. Diagrama de Venn que muestra las posiciones seleccionadas positivamente en ambas cohortes y la identificación de mutaciones asociadas al uso de IPs	81
Figura 6.13. Diagrama de Venn que muestra todas las posiciones seleccionadas positivamente en ambas cohortes, las mutaciones asociadas con el uso de IPs, así como las posiciones asociadas a algún alelo HLA-I.....	83
Figura 6.14. Desglose de pacientes que presentan al menos una de las posiciones exclusivas de los pacientes con resistencia a IPs en correspondencia con el número de mutaciones mayores en <i>pol</i>	88
Figura 6.15. Selección positiva y negativa para la porción de traslape de las secuencias de los pacientes con resistencia a IPs	89
Figura 6.16. Diagrama de selección positiva mostrando los aminoácidos de la proteína de traslape p6* y los aminoácidos correspondientes al marco de lectura de <i>gag</i>	91
Figura 7.1. Mapa del gen <i>gag</i> mostrando posiciones asociadas simultáneamente a selección por IPs y a selección por HLA en la cohorte de pacientes mexicanos con resistencia a IPs.....	107

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1.1. Grupos, subtipos y distribución geográfica del VIH	7
Tabla 1.2. Medicamentos antirretrovirales aprobados para su uso en humanos de acuerdo a la familia a la que pertenecen así como sus características generales.....	23
Tabla 1.3. Mutaciones mayores de resistencia a IPs.....	29
Tabla 6.1. Descripción de los parámetros clínicos de los pacientes de la cohorte de estudio.....	54
Tabla 6.2. Características de los pares de pacientes que surgieron por el análisis filogenético de la cohorte.....	57
Tabla 6.3. Desglose de mutaciones menores y mayores de resistencia a IPs y parámetros clínicos de los 74 pacientes incluidos en el estudio.....	57
Tabla 6.4. Código de colores que indica el tipo de asociación de cada mutación reportada al uso de IPs.....	69
Tabla 6.5. Lista de mutaciones en la región <i>gag-pro</i> que han sido previamente asociadas al uso Inhibidores de Proteasa y su prevalencia en pacientes con resistencia a IPs y vírgenes a tratamiento antirretroviral.....	70
Tabla 6.6. Mutaciones que presentaron frecuencias mayores en los pacientes con resistencia a IPs.....	73
Tabla 6.7. Posiciones bajo presión selectiva positiva por razón de sutituciones sinónimas y no sinónimas (dN/dS) para el gen <i>gag</i> de virus de pacientes con resistencia a IPs.....	75
Tabla 6.8. Posiciones bajo presión selectiva positiva exclusivas de los pacientes con resistencia a IPs.....	77
Tabla 6.9. Asociación con alelos HLA-I de las posiciones seleccionadas positivamente y asociadas al uso de IPs en pacientes con resistencia a IPs y pacientes vírgenes a tratamiento	84
Tabla 6.10. Posiciones exclusivas de los pacientes con resistencia a IPs.....	85
Tabla 6.11. Desglose de pacientes que mostraron al menos una de las 7 posiciones exclusivas en los pacientes con resistencia a IPs.....	86
Tabla 6.12. Posiciones bajo presión selectiva positiva por razón de sutituciones sinónimas y no sinónimas (dN/dS) para la porción de traslape de virus de pacientes con resistencia a IPs.....	90

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.

1.1 Aparición de una nueva enfermedad.

La salud del humano se vio mermada cuando el cuerpo se enfrentaba a un nuevo Síndrome caracterizado por la aparición de enfermedades oportunistas como diarreas recurrentes, neumonía, meningitis, o afecciones como linfadenopatías y una variedad de cánceres poco usuales como sarcoma de Kaposi o linfomas No-Hodgkin [1, 2]. Los casos se reportaban como insólitos porque los sujetos afectados parecían no tener un riesgo de inmunosupresión severa evidente, ya que se trataba de un sector de población poco susceptible: personas jóvenes principalmente de sexo masculino. Cuando se realizaban estudios de laboratorio a las personas afectadas, se observó un patrón de resultados caracterizados por la depleción de linfocitos CD4+ en sangre periférica [1].

Conforme se ampliaba el conocimiento de esta nueva enfermedad se observaron severas inmuno-deficiencias en grupos sociales característicos como homosexuales y drogadictos; en ellos, era claro su deterioro inmunológico dada su pobre respuesta a diversos patógenos y antígenos. Con el tiempo el síndrome afectó a otros grupos como pacientes con transfusiones sanguíneas, inmigrantes, e incluso hemofílicos, pero sin dejar de lado el aumento de incidencia en parejas homosexuales y en los hijos de todos aquellos grupos de riesgo [1, 3]. Las primeras especulaciones de transmisión fueron vía sanguínea o bien posterior a un contacto sexual con algún afectado, sin embargo, el agente causal seguía sin descubrirse. La preocupación era evidente porque al parecer, según los reportes del sector salud, esta enfermedad crecía de manera exponencial y se constituía como una epidemia en la que el ámbito social jugaba un papel crucial.

Corría el año de 1986 cuando el Dr. Luc Montagnier y colaboradores en el instituto Pasteur de Francia, reportaron el aislamiento de un nuevo agente a partir de nódulos linfáticos, una vez que los cultivaban, observaron que los viriones poseían ciertas características:

- Actividad de Transcriptasa reversa magnesio dependiente (RT, reverse transcriptase) característico de otros retrovirus reportados [2].
- El tropismo del virus se estableció hacia células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) y más específicamente hacia linfocitos T CD4+ [2].

Con ello se logró una primera denominación: LAV (por las iniciales en inglés de Lymphadenopathy Associated Virus). Este era un acercamiento muy importante para describir y descubrir a este agente que causaba invariablemente la muerte de los afectados [2].

Posteriormente se dieron lugar diversas aportaciones, entre las que destacan las del Dr. Robert Gallo en el National Cancer Institute en Estados Unidos, quien también aisló y demostró que el este virus era el agente causal de las afecciones reportadas [2, 4]. Finalmente y tras una intensa lucha en la que no sólo se involucró el sector salud, sino el sector político y social, se designó a la enfermedad como Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), cuyo agente causal es el ahora llamado, Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH).

1.2 Epidemiología del VIH/SIDA.

1.2.1 VIH En el mundo.

Una vez establecido que el crecimiento de afectados era exponencial, la tarea de desarrollar un esquema de tratamiento antirretroviral se volvió una prioridad. Y más aún, si las investigaciones acerca del tema dieron a conocer que la enfermedad ocasionada por este retrovirus podía cursar asintomática incluso por más de una década.

La demanda de información en diversos sectores de la población se volvió una necesidad, y era necesario incluir campañas de concientización, mejoramiento de la infraestructura y atención hospitalaria, ampliación en la cobertura y optimización del Tratamiento Antirretroviral (TAR) [3, 5]. Todas estas medidas permitieron que el número de decesos por causas relacionadas con el sida, tuviera una marcada disminución de un máximo de 2,3 millones [2,1 millones-2,5 millones] en 2004 a unos 1,7 millones [1,6 millones-2,0 millones] en 2011 [6, 7]. El impacto de estas medidas y en especial del tratamiento resultó más

evidente en África subsahariana, donde se estima que en 2011 fallecieron por causas relacionadas con el sida 550.000 (o un 31%) personas menos que en 2005, año en el que esta enfermedad se cobró más vidas [5, 8, 9].

Las nuevas estimaciones de ONUSIDA indican que para finales del año 2011 existían en el mundo cerca de 34,2 millones [31,8 millones-35,9 millones] de personas que vivían con VIH, de las cuales cerca del 68% vivían en el África Subsahariana, (aproximadamente 23 millones de personas) constituyéndose como la región más afectada. En segundo lugar se posiciona la región de Asia oriental y sudoriental, con un número estimado de 4,0 millones [3.6–4.5 millones] personas que vivían con VIH. Por otra parte, América Latina, Europa oriental y Asia central se encuentran en tercer lugar con alrededor de 1,5 millones de personas afectadas[9-11].

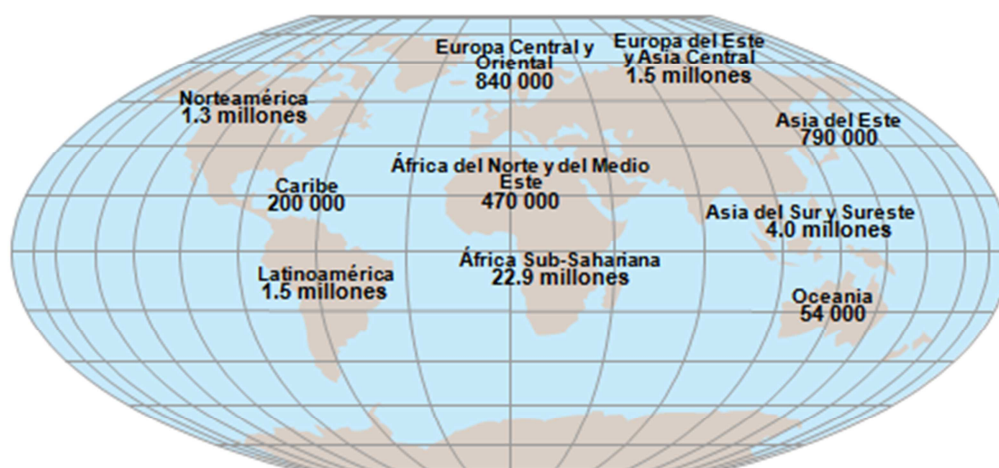


Figura 1.1. Estimado de adultos y niños que viven con VIH en el mundo, reportado por la OMS en 2011 [Modificado de [8]].

1.2.2 VIH en México

A partir de 1985, la epidemia en México tuvo un desarrollo exponencial, con una pronta diseminación a mujeres y niños, presentando una fase de crecimiento acelerado que alcanzó su máximo en 1999. Entre 2000 y 2003 se mantuvo estable y empezó a descender en 2004 a raíz del sin número de investigaciones, aportaciones y empeño del sector Salud. La situación se vio agravada por los casos de migración que iniciaron con la fase de ruralización de la epidemia por VIH en México [3, 5]. En el año de 1986 México adicionó el SIDA a la lista de enfermedades sujetas a notificación inmediata de casos, en

este mismo año se creó el primer Comité Nacional para Coordinar los Esfuerzos en VIH/SIDA, al cual le siguió la formación del Consejo Nacional para la Prevención y Control del VIH/SIDA (CONASIDA) y del Centro Nacional para la Prevención y Control del VIH/SIDA (CENSIDA) [3, 10].

Se estima una prevalencia de VIH en adultos (15 a 49 años) de 0.3%, valor por debajo del porcentaje en América latina (0.6%) y en el mundo (0.8%), con un total de muertes que ascienden a 4,192 (datos hasta 2011). El número total de personas notificadas que viven con VIH en nuestro país hasta junio de 2012 es de 179,478 [6, 12].

Conforme al reporte de Vigilancia Epidemiológica de casos de VIH/SIDA en México con fecha de actualización de junio de 2012, la epidemiología en México sigue afectando en mayor porcentaje a personas de sexo masculino con un 82.1% que a personas de sexo femenino con un 17.9%, existiendo una razón hombre/mujer de 4.6 hombres con SIDA por una mujer con SIDA actualmente. Hasta junio de 2012 se habían diagnosticado y reportado 157,529 casos de SIDA acumulados, con 1,996 casos nuevos en 2012. Los estados en donde se concentra el mayor número de personas con SIDA son, en orden descendiente: Distrito Federal: 24,661, México: 17,091, Veracruz: 14,516, Jalisco: 12,105, Puebla: 7,150 personas afectadas [6, 12].

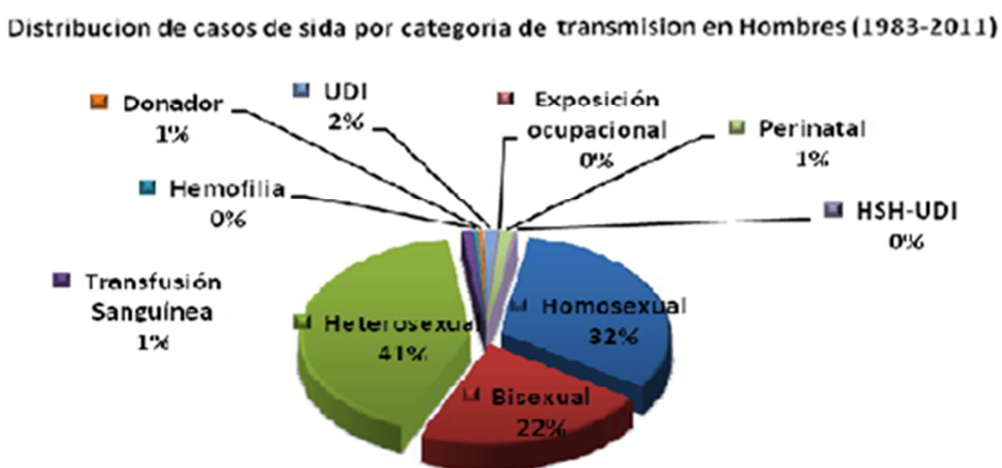


Figura 1.2. Distribución de casos de SIDA para hombres en México. Datos al 30 de septiembre del 2011 según CENSIDA. UDI (usuarios de droga inyectables), HSH (hombres que tienen sexo con hombres). Obtenido de [13].

Distribucion de casos de SIDA por categoria de transmision en mujeres (1983-2011)

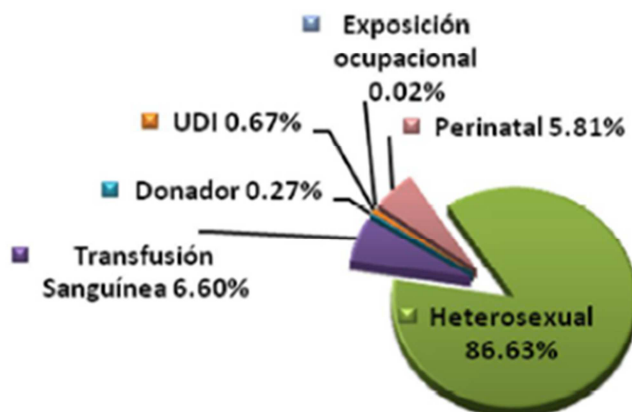


Figura 1.3. Distribución de casos de SIDA para mujeres en México. Datos al 30 de septiembre del 2011 según CENSIDA. [13].

La lucha contra el VIH/SIDA en México tiene que enfrentarse en base a la educación sexual, políticas de prevención, y la constante búsqueda al acceso universal de antirretrovirales. Siendo la transmisión sexual, la principal vía principal de transmisión en México, la educación sexual es un punto fundamental que incluye desde métodos básicos de prevención y anticoncepción, hasta la práctica de la no discriminación y estigmatización de personas en riesgo de contagio.

En nuestro país uno de los problemas a los que se enfrenta el sector salud es la falta de una detección temprana para dar inicio a un esquema de tratamiento antirretroviral y con ello disminuir potencialmente el riesgo de contagio y las muertes ocasionadas por el SIDA. Actualmente existe un alto número de personas infectadas que no han acudido a algún centro de salud para el diagnóstico oportuno teniendo un alto porcentaje de personas en etapas tardías de la infección que sin conocimiento de causa favorecen la diseminación del virus. Igualmente el alto porcentaje del subregistro de casos, da muestra de las acciones que deben considerarse como prioritarias para lograr un mejor control en la calidad de vida de los pacientes así como la disminución de nuevas infecciones.

1.3 Generalidades del VIH.

1.3.1 Origen del VIH.

La pandemia causada por el VIH-1 es el resultado de un salto entre especies de retrovirus entre monos y humanos. Tras años de investigación, ahora se conoce que el VIH-1 se originó a partir de un lentivirus de chimpancés, el virus de inmunodeficiencia simiana (SIV_{cpz}) [2, 14]. Utilizando herramientas como el reloj molecular, a partir de la longitud de ramas descendientes y el ritmo de mutación del virus, se pudo “caminar” a través del árbol filogenético del VIH para estimar cuando ocurrió el salto de especie y hubo una divergencia a partir de un ancestro común. Se ha estimado que el salto tuvo lugar hacia principios del siglo XX con más de una introducción a la población humana posiblemente ocasionados por la caza de chimpancés destinados a su consumo [14]. Para 1986 se recuperó un retrovirus de personas que vivían en países de África Oriental, el cual estaba relacionado con el VIH-1 pero las afecciones inmunológicas eran distintas. Este virus fue llamado VIH-2. El origen evolutivo de este virus es distinto al del VIH-1, ya que surgió del SIV del mono mangabey ahumado. El VIH-2 presenta una progresión a la enfermedad más lenta, periodos asintomáticos más largos y una tasa de mortalidad menor [2].

1.3.2 Clasificación del VIH.

El VIH-1 posee una clasificación compleja debido a su rápida evolución y enorme variabilidad genética, esta variabilidad se debe en gran parte por las siguientes características:

- El alto grado de errores en la replicación del genoma viral por la transcriptasa inversa. Ocurren cerca 3×10^5 mutaciones/por ciclo de replicación [1-3].
- La alta tasa de recombinación genética [1, 2].
- La alta capacidad replicativa del virus *in vivo*. Se sabe que se producen cerca de 10^9 partículas virales en un día, con un rango de 150 a 300 ciclos de replicación [1, 2].
- El gran número de personas afectada a lo largo del mundo [1, 2].

Dada la gran variabilidad genética del VIH, es posible encontrar más de un tipo de virus en un solo individuo ligeramente diferentes entre sí. A estas variantes virales se les denomina cuasi especies [2].

A nivel poblacional la clasificación requirió de análisis filogenéticos profundos que llevaron a la clasificación del VIH en cuatro grupos genéticos: M (“major”), O (“outier”) y N (“non-M, non-O”), y el recientemente agregado grupo P [2, 5, 15]. De los cuatro grupos descritos, el grupo M es el que se encuentra mayormente esparcido en el mundo y presenta además 9 sub-tipos: A, B, C, D, F, G, H, J, K. Aunque son filogenéticamente equidistantes, cada uno de los subtipos presenta diferencias a nivel genético y distribución geográfica [15]. (Figura 1.4). El VIH-1 subtipo C es el predominante en el mundo, especialmente en África Subsahariana y en la India. El VIH-1 subtipo B es el predominante en América del Norte incluyendo México[16] [15-18]

Tabla 1.1. Grupos, subtipos y distribución geográfica del VIH [19].

TIPO	GRUPO	SUBTIPOS	DISTRIBUCIÓN
	M	A - K	UNIVERSAL y endémicos en Africa
HIV-1	O	-	CAMERUN GABON CONGO GUINEA-ECUATORIAL
	N	-	CAMERUN
HIV-2		A - F	Todos endémicos en Africa

Con el análisis de diferentes regiones del genoma del VIH, se conocen ahora variantes virales circulantes en distintas partes del mundo que presentan eventos de recombinación genética inter-subtipo a lo largo del genoma. Estas variantes se conocen como formas recombinantes circulantes (CFR), y surgen por la transmisión de virus de individuos con múltiples infecciones. La recombinación en el VIH es factible gracias a que la transcriptasa inversa puede cambiar el templado que utiliza durante su actividad, y debido a la presencia de 2 copias de RNA genómico en cada virión. En los últimos años se han asociado 51 CRFs a distintas regiones del mundo [17]. Incluso en algunas regiones del mundo, las CRF se han vuelto predominantes. Tal es el caso del sureste de Asia donde predomina la CRF01 AE [19].

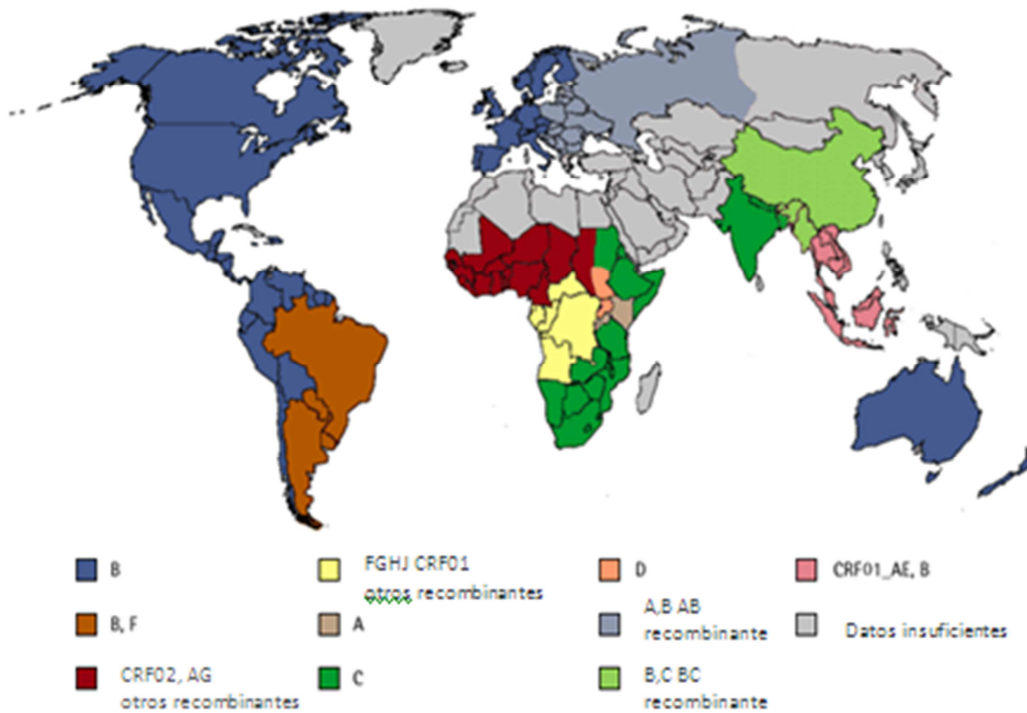


Figura 1.4. Distribución global de subtipos de VIH-I y sus formas recombinantes circulantes (CRF). Se observa que el subtipo C es el predominante a nivel mundial presente en países como África sub-Sahariana e India. Por otro lado, en América el subtipo predominante es el B [Obtenida de [20]].

1.3.3 Estructura del virión.

El VIH se ubica taxonómicamente en el género de los lentivirus, dentro de la familia de los retrovirus. Así como otros retrovirus típicos, su genoma está compuesto de RNA, en este caso 2 copias de aproximadamente 9.3Kb, y hechan mano de la retro-transcripción para la conversión de su genoma a DNA (provirus). El proceso se lleva cabo por la enzima transcriptasa inversa (RT) [1-3, 15].

El VIH, como otros miembros de la familia, es un virus envuelto de morfología variable, con un diámetro de entre 80 y 120 nm. Figura 1.5. La envoltura se constituye como una membrana lipídica que contienen principalmente las glicoproteínas virales y que se adquiere por gemación una vez que el virus sale de la célula hospedera. Durante esta salida de viriones, el virus puede adquirir una serie de componentes de membrana del hospedero como moléculas HLA de clase I o II, o proteínas de adhesión como ICAM-1, que pueden facilitar la

infección subsecuente de otras células blanco. Las glicoproteínas virales se encuentran dispuestas en complejos proteicos que contienen trímeros de la proteína externa gp120 y la proteína transmembranal gp141, que conforman las espículas virales. Cada partícula viral expresa alrededor de 72 espículas en total [2].

La envoltura rodea a la proteína de Matriz (p17) y la Cápside (p24), que contiene las dos copias del genoma de RNA viral. El genoma del VIH es parte de un complejo proteína-ácido nucleico que está acompañado de la proteína p7 o Nucleocápside y la Transcriptasa inversa o p66. El virión contiene entre 10 y 50 copias de RT, integrasa (p32), proteasa (p11) y dos copias de RNA de transferencia celulares, que le sirven como cebadores para la RT. La morfología de la cápside viral semeja a un cono truncado [2, 4].

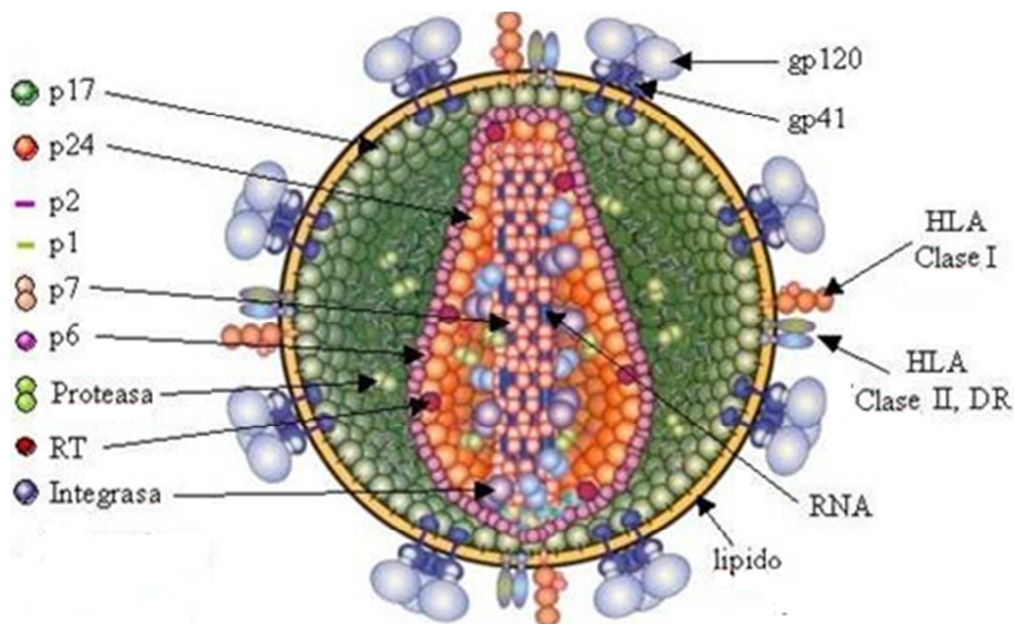


Figura 1.5. Representación gráfica de una partícula madura del VIH. Se indica la localización aproximada del genoma, enzimas y proteínas estructurales, así como algunas proteínas del hospedero que adquiere durante la salida de los viriones. [Obtenido de [21]].

1.3.4 Organización del genoma viral.

De manera general, es conocido que el genoma de los retrovirus está constituido por tres genes estructurales principales: *gag* (gen antígeno grupo-específico) que se traduce como un producto poliprotéico que contiene a las proteínas de Matriz, Cápside, Nucleocápside y la proteína p6, *pol* (polimerasa)

cuyo producto polipeptídico origina a la proteasa, la transcriptasa inversa e integrasa y *env* (envoltura) para las proteínas de superficie gp120 y gp41. En particular, el genoma del VIH, también contiene marcos abiertos de lectura (ORF) que se encuentran traslapados y codifican para proteínas reguladoras y/o accesorias: Vif, Vpu, Vpr, Tat, Rev y Nef, estas proteínas, ahora se sabe que cumplen un papel fundamental durante el ciclo de replicación *in vivo* [2].

El genoma del VIH se encuentra flanqueado por secuencias largas de repetición terminal o LTR's. Las funciones de estas secuencias son primordiales e intervienen en diferentes etapas del ciclo de replicación viral. Dentro de las funciones principales están: formar estructuras híbridas ARN-ADN que permiten a la RT continuar su actividad y generar hebras completas de ADN, contienen también una secuencia necesaria para el empaquetamiento del ARN genómico viral en los nuevos viriones, favorecen la integración del ADN viral al guiar su inserción en cromosomas de la célula hospedera y una vez integrado, funcionan como regulador de la síntesis de ARNm [ref]. De manera clásica se tiene entonces un esquema clásico del genoma de un retrovirus: 5'LTR-gag-pol-env-LTR 3' Figura 1.6.[3, 22].

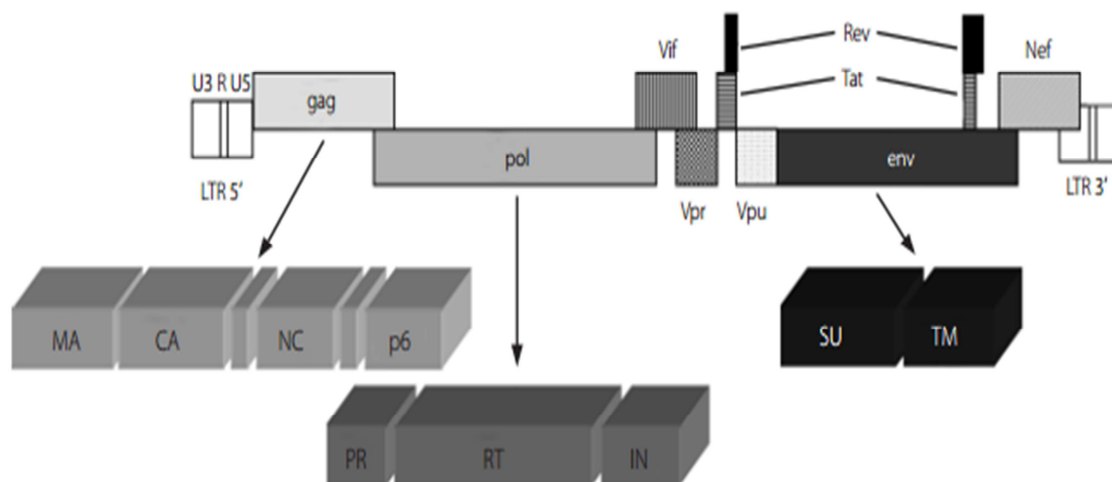


Figura 1.6 Organización del genoma del VIH-I. Se observan los tres marcos de lectura abiertos para los genes estructurales *gag*, *pol* y *env*. Se observan, además seis ORF adicionales que codifican para las proteínas accesorias/reguladoras. Se muestran las dos secuencias LTR3' y LTR5' que flanquean el genoma del virus. SU. Proteína superficial gp120. TM proteína transmembranal gp41.[Obtenido de [3]]

La traducción de los ORF para las proteínas accesorias y reguladoras se da durante los eventos tempranos en el ciclo de replicación y como se explicará más adelante, la acumulación de estos productos proteicos permite la traducción de las poliproteínas de *gag*, *pol* y *env*. cuya traducción ocurre de manera más tardía. La traducción de los genes estructurales por tanto, como en el caso de otros retrovirus, ocurre de manera policistrónica y requiere el procesamiento de las poliproteínas generadas para la maduración completa del virus a través de proteasas virales o celulares. En total, el genoma del VIH contiene la información necesaria para la codificación de nueve proteínas clasificadas en tres clases:

- Proteínas estructurales (poliproteínas): Gag, Pol y Env,
- Proteínas reguladoras: Tat y Rev,
- Proteínas accesorias: Vpu, Vpr, Nef y Vif,

Dado que las proteínas reguladoras y accesorias son los primeros eventos de traducción del genoma viral una vez insertado en el genoma del huésped, se describen primero:

1.3.5 Proteínas reguladoras

- La proteína Rev es una fosfoproteína que a grandes rasgos, permite la acumulación de transcritos virales sin eventos de corte y empalme (splicing) en el citoplasma de la célula hospedera por transporte del núcleo al citoplasma. Es por tanto, un regulador de la expresión génica del virus, y su elemento de respuesta es RRE, elemento de reconocimiento de Rev una secuencia específica en el genoma del virus [2].
- La segunda proteína reguladora es Tat que tiene actividad primordial en la transcripción inversa. Recibe el nombre de transactivador transcripcional y posee unión directa con una región específica del RNA viral. La unión se establece con el elemento TAR localizado en el LTR 5' del RNA y aumenta cientos de veces la eficiencia de la transcripción de los genes del VIH. Se ha visto que Tat, cuando se excreta, facilita la infección de otras células con una participación directa en la intervención de transducción de señales dentro de la célula [2, 22].

1.3.6 Proteínas accesorias.

- Vif es el factor de infectividad del virus y es esencial para que el virus pueda replicarse en linfocitos T CD4+ y otras líneas celulares como macrófagos. Tiene la capacidad de inhibir la actividad de ciertos factores celulares de la familia de APOBEC3G (A3G), que de forma natural bloquean la replicación viral induciendo hipermutación en el genoma viral. Vif sirve de enlace entre estos factores y el sistema de ubiquitinización llevando a la degradación este factor antiviral [2, 22].
- Nef induce regulación a la baja de la molécula CD4, favoreciendo su internalización. Disminuye también la expresión de HLA clase I, facilitando una fuerte evasión al reconocimiento por el sistema inmune de las células infectadas. Interfiere con diversas moléculas de transducción de señales activadoras en las células T del hospedero para mantener el control de la célula infectada y proseguir con su replicación [2, 22]
- Vpu es esencial para el empaquetamiento de viriones. Es una fosfoproteína integral de membrana cuya ausencia produce la acumulación de viriones en la membrana y en vesículas intracelulares. Vpu interfiere con la actividad de la proteína celular teterina. Teterina evita la liberación de los viriones al formar puentes entre la membrana viral y la membrana celular. Vpu se une a teterina provocando su degradación mediada por ubiquitinación y promoviendo la liberación de los viriones (ref). Vpu también induce la degradación de CD4 al hacer un enlace entre el dominio citoplasmático de la molécula CD4 y un marcador de proteólisis mediada por ubiquitinación [2, 22]
- Vpr forma parte de dos complejos proteicos importantes en el ciclo de replicación viral. El primero es en la transcripción inversa, donde regula la mutación del VIH evitando la acumulación excesiva de errores durante el proceso de retrotranscripción. El segundo es el complejo de pre-integración (PIC), actuando como un factor de transporte del DNA viral al núcleo de la célula. Otra de sus actividades bien caracterizada es el arresto celular en fase G₂ durante las primeras horas de infección por inactivación del complejo cinasa dependiente de ciclina (CDK) p34/cdc2.

Esta proteína se encuentra presente en grandes cantidades en los viriones por unión con p6 en el dominio C-terminal [2, 4, 22]

1.3.7 Proteínas estructurales.

Las proteínas codificadas por el gen *pol*, tras el autoprocésamiento del precursor Pr160^{gag-pol} por la proteasa viral, son tres enzimas: proteasa, transcriptasa inversa e integrasa. Este gen posee una porción de traslape con el gen *gag* viral (figura 1.6) y el precursor se traduce en conjunto con las proteínas de *gag* [4]. La tasa de traducción para estos genes traslapados es de 95% para Pr55^{gag} y 5% para el precursor Pr160^{gag-pol} [26-28].

La enzima proteasa es una proteína homodimérica aspártica, que requiere de auto-procesamiento para su liberación del polipéptido gag-pol y realizar su dimerización. Una vez que adopta su configuración activa, es la responsable de procesar los polipéptidos durante la salida de los viriones de la célula y completar el proceso de maduración viral con los cambios conformacionales que este evento conlleva [2, 27, 29].

La transcriptasa inversa es una DNA-polimerasa dependiente de RNA que como su nombre lo dice, es la encargada de convertir la información genética contenida en las dos copias de RNA viral, en cadena doble de DNA. Es una enzima dependiente tanto de RNA como de DNA que posee actividad de RNAsaH que degrada la cadena original de RNA viral, pero que carece de propiedades de exonucleasa 3'-5' [2, 3, 30]. La falta de esta actividad resulta en una baja fidelidad al no tener la capacidad de corregir los errores que ocurren durante la replicación (3×10^5 mutaciones/por ciclo de replicación) [2]. La enzima además, genera eventos de recombinación durante el proceso de retro-transcripción al cambiar entre las dos cadenas de RNA genómico viral, proceso que se conoce como elección de hebra [2].

La integrasa, como su nombre lo dice, permite la integración del DNA viral recién retrotranscrito al material genético de la célula hospedera. Tiene tres funciones enzimáticas: actividad de exonucleasa que permite la eliminación de dos nucleótidos terminales del extremo 3' del DNA viral, actividad de

endonucleasa de doble cadena que permite el corte del DNA de la célula en el sitio donde va a ser integrado el DNA viral, y finalmente actividad de ligasa que hace posible la unión covalente de cada extremo del DNA proviral con el DNA de la célula hospedera [2].

El producto polipeptídico del gen *env* es el precursor gp160. El procesamiento ocurre por una proteasa celular y tiene como productos la proteína de superficial viral gp120 (SU) y la proteína transmembranal gp41 (TM) [2]. Su interacción no covalente permite la formación de los trímeros en la superficie del virus. gp120 es la proteína con más variabilidad en el VIH y es la que tiene los dominios de unión a la molécula CD4, y a los correceptores de quimiocinas CCR5 y CXCR4. La función principal de estas proteínas es promover la reacción de fusión de membranas. Cuando se establece la unión entre gp120, el receptor y el correceptor se producen cambios conformacionales que exponen el dominio de fusión presente en gp41 haciendo posible la unión entre la envoltura viral y la membrana celular [2, 22].

El gen *gag* viral codifica para el precursor polipeptídico de 55kDa llamado Pr55^{gag}, y tiene el siguiente orden de traducción p17/p24/p2/p7/p1/p6 del cual surgen, tras su procesamiento por la proteasa viral, las proteínas p17: Matriz, MA; p24: Cápside, CA; p7: Nucleocápside, NC; p6 y dos péptidos espaciadores p2 y p1[3, 4].

La proteína de Matriz tiene una estructura trimérica y se localiza inmediatamente después de la membrana lipídica del virus y es la responsable de conferir estabilidad y estructura al virus [3]. Tiene además, la función de direccionar el precursor Pr55^{gag} a la membrana de la célula hospedera por unión de un dominio rico en ácido mirístico y aminoácidos básicos que presentan afinidad a la negatividad de la membrana; este dominio se encuentra en la región N-terminal de la proteína [2]. Se han descrito otras funciones de la Matriz, como el reclutamiento de Env a los viriones y la participación en los eventos tempranos post-entrada por interacción con el complejo de pre-integración (PIC) [2, 4, 22, 23] (Ver sección 1.4).

La Cápside tiene como función principal promover el ensamblaje del virus y posee dos dominios funcionalmente importantes. El dominio N-terminal

incorpora a la ciclofilina A celular por interacción con una asa flexible. Esta interacción resulta fundamental en la desencapsidación y su ausencia impacta en la replicación vírica por defectos tempranos post-infección. La forma cónica característica se forma por la red de hexámeros de p24 que ocasionalmente incorpora pentámeros deformando la estructura de la proteína. El dominio C-terminal contribuye a la dimerización de los precursores de gag [2, 4].

La Nucleocápside se asocia al genoma de RNA del virus por la interacción con dos dedos de Zinc presentes en Gag a través de un dominio rico en cisteínas y altamente básico. Esta interacción es crítica para promover la multimerización de Gag y mutaciones en esta región conservada abolen la encapsidación. El sitio de unión a la NC presente en el RNA viral se conoce como ψ o señal de encapsidación que se encuentra en el extremo LTR 5' del genoma viral [2, 4].

Otras de las funciones de esta proteína es la interacción con moléculas de RNA facilitando la transcripción inversa. Actúa también como chaperona induciendo una conformación termodinámicamente más estable de los ácidos nucleicos recién retrotranscritos[22].

La proteína p6, cumple una función primordial para la liberación de los viriones de la célula hospedera. El mecanismo que utiliza esta proteína es el secuestro de la maquinaria de transporte de vesiculación celular por unión con un dominio del complejo ESCRT [24]. El dominio de unión de p6 con ESCRT, PTAP, ha sido bien caracterizado y se encuentra cerca del dominio N-terminal de p6. Este dominio se une a la molécula Tsg101, componente de ESCRT-I y su delección ocasiona una acumulación de partículas virales que permanecen unidas a la membrana celular. Estudios más profundos sobre el papel de p6 en la liberación de los viriones han llevado al conocimiento de un mecanismo adicional con el que el virus de manera secundaria interacciona con el complejo de vesiculación celular. El motivo LYPLTSLRSL de p6 se une al factor AIP1, también conocido como Alix, que contiene un sitio de unión para la proteína CHMP4 de ESCRT-III. Figura 1.7. Cuando la funcionalidad del dominio PTAP se encuentra afectada o bien los niveles de Tsg101 no son los adecuados, se ha visto que la interacción con Alix es capaz de rescatar el mecanismo de liberación de las partículas [24]. Figura 1.7. La presencia y efectividad de

ambas interacciones por tanto, le resultan esenciales al virus. Estos sitios de Gag, fundamentales para la salida del virus, se conocen como dominios tardíos [22, 24, 25].

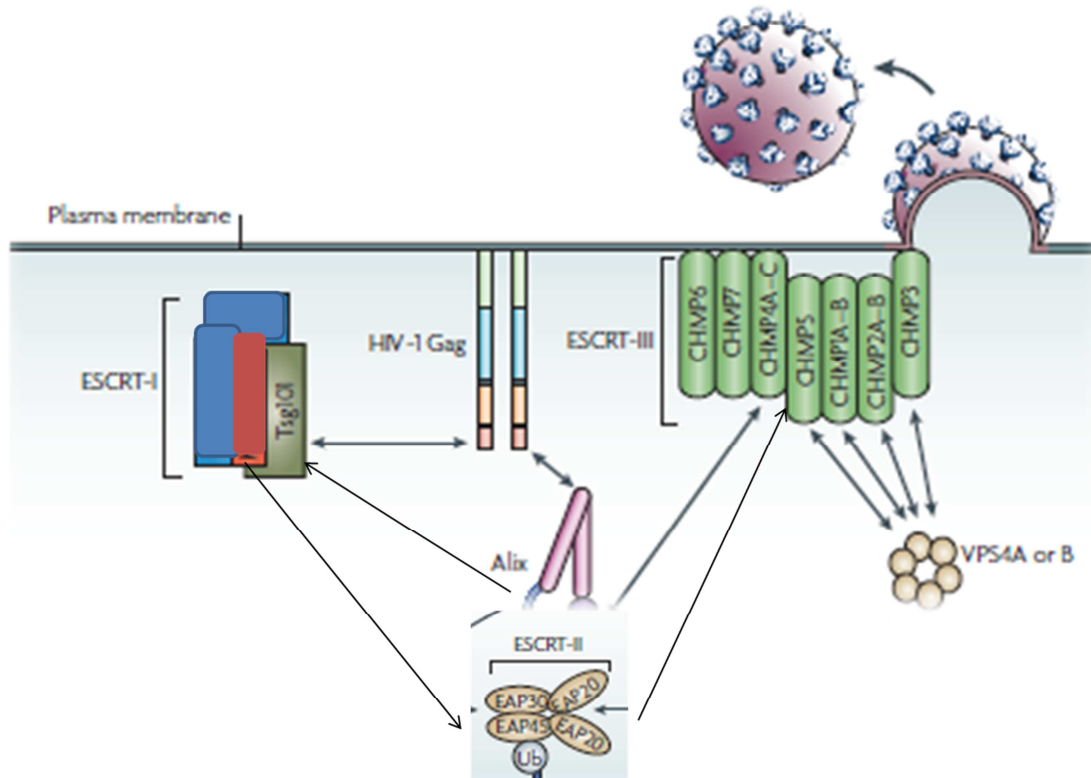


Figura 1.7. Esquema que muestra la interacción del dominio terminal PTAP presente en p6 con la maquinaria de vesiculación celular. Se muestra también la interacción del dominio LYPLTSLRSL con la molécula Alix. [Modificada de [24, 25]]

Una vez descritas las proteínas virales se describe mas a detalle su participación dentro del ciclo de replicación del virus.

1.4 Ciclo de replicación.

Para conocer cómo es que el VIH establece una infección persistente en el hospedero, es necesario estudiar su ciclo de replicación. El punto clave para que el virus pueda establecer una infección crónica en el hospedero, es lograr la inserción de su material genético en el DNA del hospedero y con ello iniciar la síntesis de sus proteínas. Para lograr este cometido es necesario, a grandes rasgos, que el virus entre a la célula, se lleve a cabo la transcripción inversa de su material genético, se integre al DNA celular, comience la síntesis tanto de las proteínas estructurales como reguladoras y accesorias, se ensamblen todos

los componentes, ocurra una salida exitosa de cada virión y se lleve a cabo una maduración correcta para obtener nuevos virus infectantes. A continuación se explica con más detalle cada una de estas etapas.

El ciclo da comienzo con el contacto de la proteína gp120 al receptor primario del virus, la molécula CD4, presente mayoritariamente en linfocitos T ayudadores y en un menor porcentaje en macrófagos, monocitos, células dendríticas, entre otras. Este paso es crucial ya que no sólo marca el inicio del ciclo de replicación, sino que interfiere con las señales de transducción intracelulares propias del linfocito T [2, 3]. La unión gp120-CD4 se traslapa con la zona de unión a ligandos naturales de la molécula CD4 como la molécula HLA clase II [2, 3].

Tras una serie de investigaciones ahora se sabe que la interacción gp120-CD4 no es suficiente para la entrada del virus, sino que se requiere además de un correceptor que ahora se sabe interacciona con la región V3 de gp120 [2, 3]. Se han descrito dos receptores de quimiocinas principales, CXCR4 y CCR5, que pueden ser usados por el VIH como correceptores. La distinción entre estos correceptores define el tropismo del virus clasificándolo en M-trópicos o R5 si el correceptor es CCR5 y T-trópicos o X4 si el correceptor usado es CXCR4. Además, se han aislado virus con tropismo dual cuya afinidad es intermedia. En la mayoría de los casos, al principio de la infección predominan los virus R5 (etapa temprana) y en etapas más tardías predominan virus X4 [1-3]. Una vez establecida esta unión ocurren cambios conformacionales en gp120 que exponen el dominio de fusión de gp41 promoviendo la fusión entre la envoltura del virus y la membrana celular [2, 3].

La fusión de membranas permite que la cápside entre el citoplasma de la célula y se dirija al núcleo celular para conformar el complejo de retrotranscripción, en este complejo la RT se encarga de sintetizar la primer hebra de DNA con ayuda de un tRNA^{Lys3} que proporciona el 3'OH. El dominio con actividad de RNAsaH degrada la porción de RNA del híbrido RNA-DNA, dejando una cadena sencilla de DNA que se complementará para formar las dos hebras de DNA para su inserción en el núcleo celular [2, 3]. La síntesis de la doble cadena permite la descapsidación y la subsecuente inserción del DNA viral al núcleo se logra por

la formación de otro complejo, PIC o complejo de preintegración, compuesto del ADNc de doble cadena, IN, RT, MA, NC y Vpr. Este complejo contiene señalizaciones para la internalización activa por los poros nucleares de la célula. Una vez dentro del núcleo, la IN forma extremos cohesivos y la ligasa une el DNA viral con el DNA de la célula en regiones del genoma transcripcionalmente activos. Al DNA viral insertado en el genoma, se le da en nombre de provirus [2, 3].

Una vez integrado el genoma viral, da inicio la transcripción de los genes. La porción LTR juega un papel importante al contener secuencias potenciadoras y promotoras a diferentes factores de transcripción presentes en el núcleo de las células activadas [2, 3]. Los primeros RNAm sufren procesamiento y modificaciones por splicing y dan lugar a las proteínas reguladoras y accesorias. Los RNAm de fase tardía dan lugar a los productos polipeptídicos de Gag, Pol y Env y la transcripción del genoma completo de virus, estos eventos de transcripción de RNAm sin procesamientos de corte y empalme, se deben a la acumulación de Rev que permite la elaboración de RNA mensajeros más largos y su salida del núcleo celular [2, 3].

El RNA viral así como los precursores Gag, Pol y Env se dirigen a la superficie celular para formar viriones (virus inmaduros). El proceso de salida de los viriones está dirigido principalmente por los precursores de Gag y Pol. El precursor Pr55^{gag} se dirige a la membrana por el dominio de la MA que se une directamente a la membrana de la célula en dominios ricos en colesterol y lípidos [2-4, 22]. La salida de los viriones depende de la presencia de Vpu y de la interacción de p6 con los componentes del sistema ESCRT ya mencionados. Durante la gemación de los virus, se adquiere parte de la membrana celular y las proteínas de superficie gp120 y gp41. Una vez liberados los viriones se lleva a cabo el proceso de maduración viral a cargo de la proteasa viral, donde se procesan los precursores para dar origen a proteínas individuales y funcionales, generando virus maduros capaces de infectar nuevas células. La maduración inicia con el autoprocésamiento de Pol que permite la liberación de proteasa y su posterior dimerización [2, 3, 31]. Figura 1.8

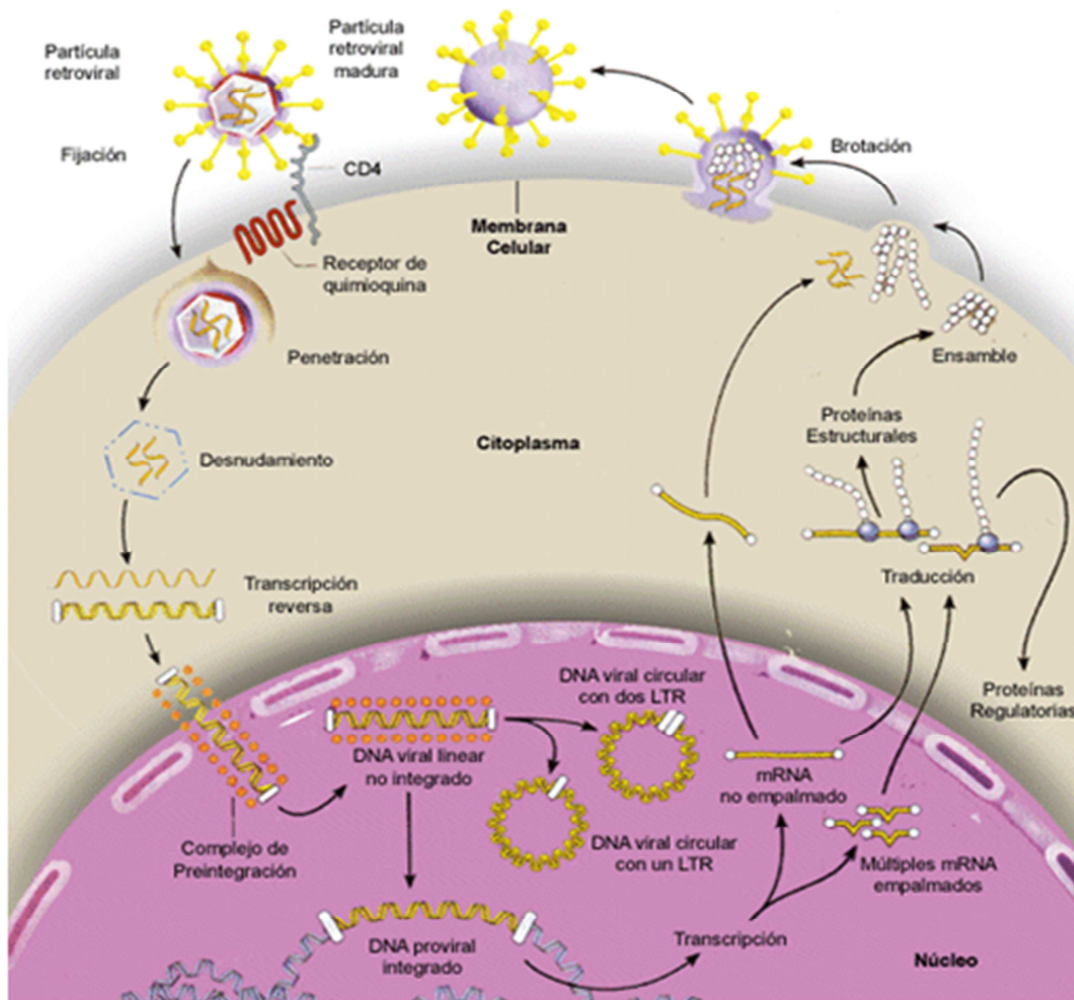


Figura 1.8. Representación esquemática del ciclo de replicación del VIH. Interacción entre gp120, CD4 y el receptor de quimiocinas (CCR5 o CXCR4). Fusión de membranas, entrada de la CA, desnudamiento del virión, transcripción inversa del genoma viral, formación del complejo de preintegración, PIC. Transporte del complejo de preintegración al interior del núcleo e integración del DNA viral (provirus). Durante la transcripción temprana se generan las proteínas reguladoras, y accesorias, en etapas tardías, se producen las proteínas estructurales y los genomas de RNA viral que se empaquetarán en las nuevas partículas virales. Transporte de RNA viral y poliproteínas a la membrana plasmática, ensamblaje y liberación de nuevos viriones por gemación. Maduración del virión por el corte de precursores por la acción de proteasa. Obtenido de [21].

1.5 Historia Natural de la enfermedad por VIH

Vías de transmisión. El VIH se transmite de las siguientes formas:

- Relaciones sexuales sin protección. Es la vía de transmisión más importante a nivel mundial. La transmisión puede ser tanto por relaciones sexuales vaginales como anales, siendo el receptor quien presenta mayor riesgo de infección. Co-infecciones con otros patógenos causantes de enfermedades de transmisión sexual aumenta el riesgo de

contagio. De manera general se ha establecido que a menor carga viral el paciente es menos infeccioso y viceversa [1].

- Uso de drogas intravenosas. Compartir agujas o material punzocortante no estéril de alguna persona con la infección [1].
- Por transfusión sanguínea con sangre o productos de ella contaminados. En la mayoría de los países ya se ha implementado el sistema de diagnóstico y esta ruta de transmisión es rara con un riesgo de adquisición de 1:1,000,000 [1].
- Transmisión materno-fetal. Puede ocurrir durante el embarazo, en el nacimiento o en el período de lactancia. En el 75% de los casos el VIH se transmite durante el último período de embarazo o durante el parto [1].

El curso de la infección por VIH puede estudiarse en tres etapas: Infección primaria o aguda, Infección crónica, de latencia o asintomática y SIDA. La duración de cada etapa varía en cada persona por factores inmunes, genéticos, virológicos, así como la inserción de un esquema de tratamiento antirretroviral [1],[5].

Infección primaria. La etapa se caracteriza por altas cargas virales, asociadas subsecuentemente a una depleción de linfocitos CD4+ en sangre periférica por la replicación descontrolada del virus en el hospedero. La etapa está acompañada de síntomas no específicos que comienzan aproximadamente 2 semanas después de la infección por el virus. Dentro de estos síntomas se encuentra fiebre, faringitis, dolor de cabeza, pérdida de peso, entre otros [2, 5]. La fuente principal de viremia (10^6 - 10^7 copias de RNA viral/mL de sangre) parece ser los Linfocitos T CD4+ CCR5+ de memoria, distribuidas principalmente en las mucosas. Durante la infección primaria ocurre una notable reducción de los linfocitos T CD4+ en circulación; pero no tan acentuada como sucede en las mucosas [5] Después del pico de viremia y en coincidencia con la aparición de respuestas inmunes del hospedero específicas (Linfocitos citotóxicos CD8+), se observa un control parcial de la viremia en un punto de equilibrio conocido como "set point" viral (10^3 - 10^5 copias/mL de sangre), de ahí la cuenta de Linfocitos T CD4+ presenta cierto aumento. En

esta etapa existen pocas variantes virales y la mayoría son R5 y la cuenta de CD4+ en sangre periférica supera las 500 células/ μ L [1, 3].

Infección crónica. Una vez montada la respuesta inmune específica contra el virus, los pacientes entran a una etapa asintomática ó crónica que varía de persona en persona por factores inmunes, genéticos y virológicos. La etapa tiene una duración de años y se caracteriza por cargas virales relativamente bajas y cuentas de Linfocitos T CD4+ con cierta estabilidad en donde se pierden aproximadamente 30-60 células/ μ L/año, las cuentas se establecen entre 200 a 500 células/ μ l. En esta etapa la replicación viral y el recambio de células es muy dinámico lo que permite que clínicamente no existan síntomas de relevancia médica, sin embargo, la replicación viral sucede de manera explosiva y constante [1, 3].

A medida que el virus se establece en el organismo ocurren variaciones virales debidas a dos factores principales: las estrategias que desarrolla el virus para escapar del sistema inmune y la misma presión selectiva inmune por parte del hospedero. Dentro de las estrategias que utiliza el virus esta la inherente variación genética debida a su alta tasa de mutación, la formación de reservorios de VIH latentes (Linfocitos T CD4+ y macrófagos), el desarrollo de mutantes de escape inmune, su elevada tasa de replicación, entre otras. Todos estos factores conllevan a una progresión lenta pero constante de la enfermedad a SIDA [1, 3]. Ver Figura 1.9.

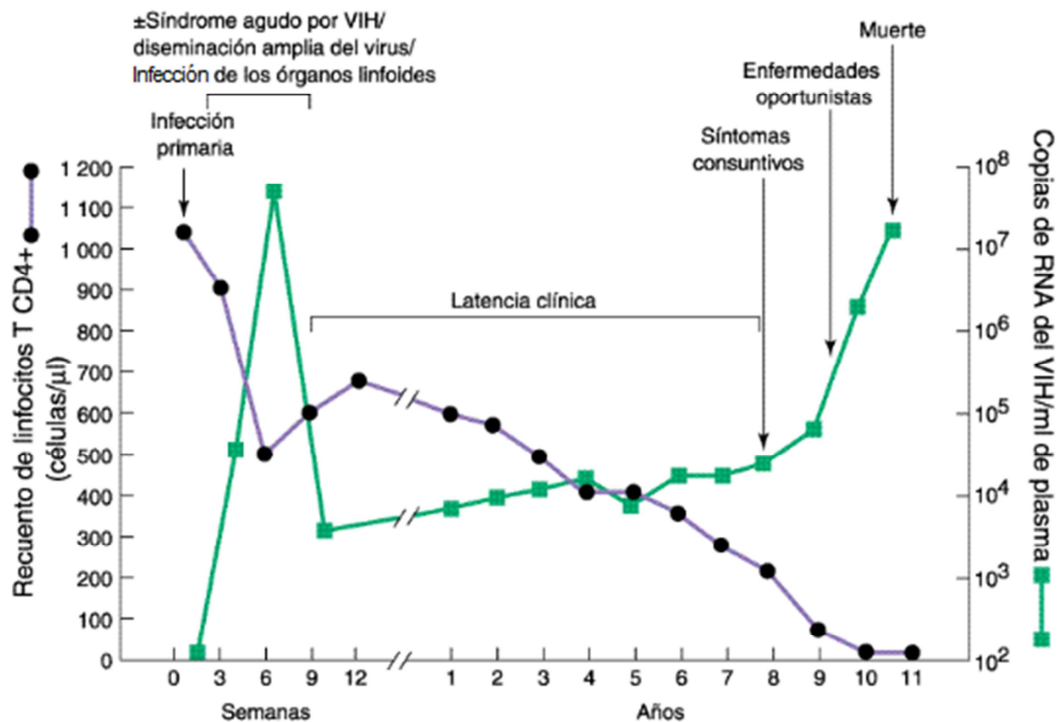


Figura 1.9 Historia natural de la enfermedad causada por VIH, sin intervención de tratamiento antirretroviral. Se tiene la variación de L T CD4+ y del número de copias de RNA viral a través del tiempo y en las diversas etapas de la enfermedad. [Obtenida de [21]].

Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida, SIDA. La progresión de la enfermedad se caracteriza por una pérdida severa de la capacidad de respuesta a diversos patógenos incluidos los oportunistas. Esta susceptibilidad de la que no son candidatos personas sanas, es reflejo de la inmunodeficiencia que ocasiona el virus por tener como blanco las células orquestadoras del sistema inmune Linfocitos T CD4+. Dentro de las enfermedades oportunistas más frecuentes se encuentran tuberculosis, infección por pneumococo neumonía, histoplasmosis, candidiasis, varicela zoster, entre otras. La cuenta de CD4+ en sangre periférica desciende por debajo de valores de 200 células/ μ L [1, 3, 5]. La gran susceptibilidad que presentan los pacientes a la diseminación de diversos patógenos en el organismo lleva invariablemente a la muerte de la persona afectada. Existen también malignidades asociadas a VIH como sarcoma de Kaposi asociado a infección por el herpesvirus humano tipo 8, linfomas asociados a infecciones por virus Epstein-Barr, carcinoma cervical y anal, entre otros [1, 3].

1.6 Tratamiento antirretroviral.

A partir de 1981, investigadores se plantearon la meta de desarrollar fármacos con efecto directo sobre el VIH. El primer fármaco desarrollado y aceptado para su uso en pacientes fue la Zidovudina o AZT en 1987, que pertenece a la familia de inhibidores nucleósidos de la transcriptasa reversa o INTR [5]. A partir de este primer lanzamiento, la lucha para controlar la epidemia siguió y hasta la fecha se han desarrollado una serie de fármacos antirretrovirales que pertenecen a diferentes familias y que tienen como blanco diferentes puntos del ciclo de replicación viral. Las familias de fármacos que se utilizan actualmente son:

Tabla 1.2. Medicamentos antirretrovirales aprobados para su uso en humanos de acuerdo a la familia a la que pertenecen así como sus características generales. Obtenida de [5, 9, 30, 32]

Familia de antirretroviral	Medicamentos aprobados para su uso en humanos	Características generales
Inhibidores nucleósidos de la transcriptasa reversa INTR	<ul style="list-style-type: none"> - Emtricitabina - Tefonovir - Abacavir - Lamivudina - Estavudina - Zalcitabina - Didanosina - Zidovudina 	Actúan de manera competitiva en el sitio activo de la RT para obstaculizar el proceso de transcripción inversa. Poseen estructuras parecidas a nucleósidos y compiten con las bases bloqueando la extensión de la cadena de DNA.
Inhibidores no-nucleósidos de la transcriptasa reversa INNTR	<ul style="list-style-type: none"> - Rilpivirina - Etravirina - Efavirenz - Delavridina - Nevirapina 	La unión de los fármacos con la RT altera su estructura y actividad impidiendo que se prosiga el proceso de transcripción inversa.
Inhibidores de proteasa	<ul style="list-style-type: none"> - Darunavir - Tipranavir - Atazanavir - Fosamprenavir - Lopinavir/ritonavir - Amprenavir - Nelfinavir - Indinavir/ritonavir - Saquinavir 	Antagonizan la actividad de proteasa e impiden su actividad para procesar los precursores Gag y Pol. Evitan la producción de proteínas y enzimas estructurales del virus, produciendo partículas virales inmaduras y no infecciosas.
Inhibidores de integrasa	<ul style="list-style-type: none"> - Raltegravir 	Evita la integración del DNA viral al genoma del huésped por interacción con IN, inhibiendo la actividad de transferencia de hebra de la enzima.
Inhibidores de fusión	<ul style="list-style-type: none"> - Enfurtivide (T20) 	Péptido que mimetiza un dominio en gp41, evitando la fusión de membranas
Antagonistas de CCR5	<ul style="list-style-type: none"> - Maraviroc 	Impide la interacción de gp120 con la molécula correceptora.

El objetivo primordial del tratamiento antirretroviral es la supresión máxima y prolongada de la carga viral del VIH en plasma, y la meta es que esto sea a en niveles inferiores a 50 copias de RNA viral/mL [9]. De manera general, y una

vez conocida la historia clínica del paciente se establece un esquema de combinación de antirretrovirales de 3 drogas activas, con al menos 2 mecanismos de acción diferentes. Cuando la supresión viral máxima no se alcanza o existen efectos adversos importantes, el esquema debe modificarse de inmediato. Debe considerarse como punto clave para el cambio en el esquema antirretroviral, el apego y la responsabilidad que tiene el paciente a su tratamiento. Puede corregirse la adherencia del paciente a la posología prescrita y con ello controlar la viremia eficazmente [9].

De manera general, los esquemas de primera línea en la mayoría de los casos resultan eficaces para el control de la viremia. En caso contrario se recurre a los esquemas de segunda línea y los esquemas de rescate que involucran la adición de aquellos fármacos que no son de primera elección como algunos inhibidores de proteasa, inhibidores de entrada o inhibidores de integrasa. Se debe tomar en cuenta, que existe una eficacia más reducida entre mayor sea la exposición a las diferentes clases de ARV, debido al acúmulo de mutaciones de resistencia entre los diversos fármacos, motivo por el cual, resulta crucial que el paciente posea una buena adherencia al primer esquema de tratamiento[9, 30].

A nivel mundial, la lucha para conseguir el acceso universal al TAR ha sido constante y se han logrado muchos avances importantes especialmente en África Subsahariana donde se ha alcanzado un 56% de cobertura, y Latinoamérica y el Caribe con un 70% y 67% respectivamente. Sin embargo, el 100% de cobertura aún es una meta que no se alcanza. Ver figura 1.10 sobre la elegibilidad del tratamiento antirretroviral [9].

Elegibilidad para el tratamiento antirretrovírico frente a cobertura, países de ingresos bajos y medios por región, 2011

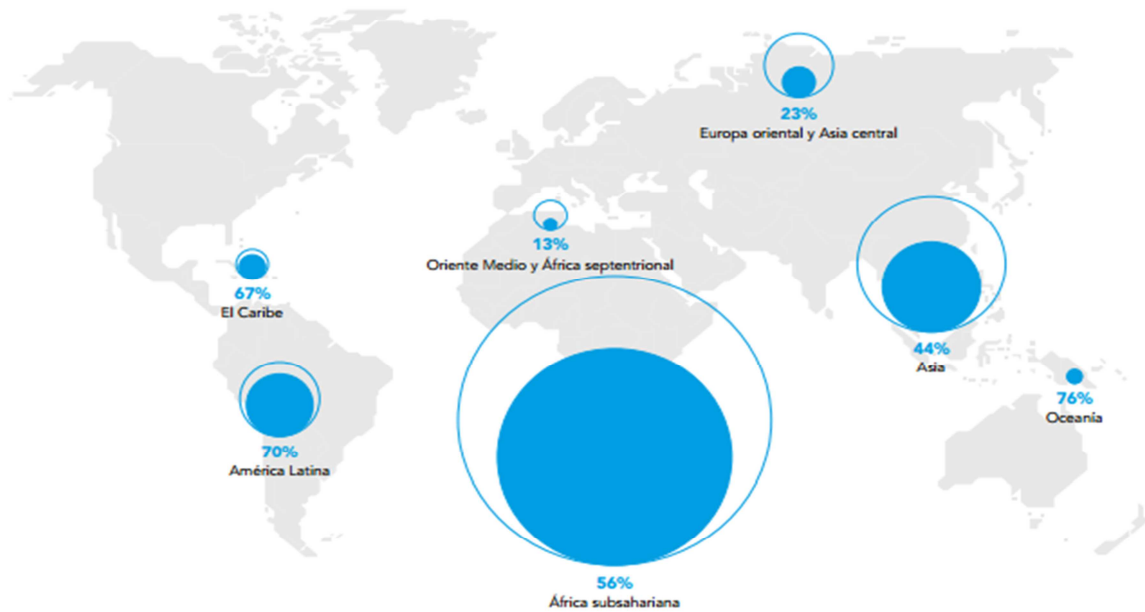


Figura 1.10. Elegibilidad para el tratamiento antirretrovírico. El área del círculo mayor representa el número de personas elegibles para la terapia antirretrovírica. El círculo sombreado y el porcentaje representan la cobertura lograda en 2011 [obtenida de ARV]. Se observa que la cobertura es baja en Europa Oriental, Asia Central, África Septentrional y Oriente Medio [9].

1.6.1 El tratamiento antirretrovírico en México.

A finales del 2003, México alcanzó el acceso universal a través del ofrecimiento de tratamiento antirretrovírico gratuito para las personas sin seguridad social que lo requieren, a través del Fideicomiso de protección contra Gastos Catastróficos del Seguro Popular. Esta política comienza ya a demostrar éxito ya que desde el año 2009, se nota el impacto del acceso universal en la reducción de la mortalidad general por SIDA [5].

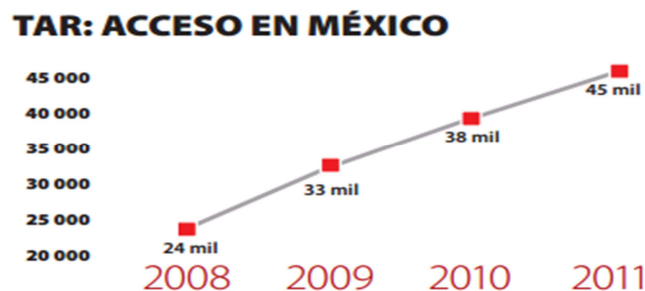


Figura 1.11 Acceso al TAR en México. Se hace notar que la gráfica muestra un aumento importante en cada año [5].

Actualmente, a nivel nacional, existe acceso gratuito vía internet a una guía actualizada sobre el esquema de tratamiento que se recomienda de acuerdo a la etapa de la enfermedad en la que se encuentra el paciente [9].

La ampliación del tratamiento del VIH con un aumento exponencial en la última década y la lucha por el acceso universal, ha contribuido a que menos personas fallezcan por causas relacionadas con el SIDA. El inicio temprano del tratamiento sigue siendo un gran desafío y se debe mantener un alto nivel de calidad en los servicios de salud para garantizar que las personas continúen el tratamiento, limitar los efectos secundarios y evitar la resistencia a los medicamentos. Así mismo el uso de posologías adecuadas permitirá que la transmisión de resistencia a los medicamentos del VIH se mantenga en niveles bajos.

1.6.2 Resistencia al Tratamiento antirretroviral.

El uso extendido de los antirretrovirales y su lucha por la universalización tiene también consecuencias negativas. Algunas de ellas y de repercusión mundial son la resistencia secundaria a fármacos y la resistencia transmitida.

Como ya se mencionó, el virus tiene una elevada tasa de mutación dada la baja fidelidad de su RT y si pensamos en un individuo en el que se producen por día 10^9 partículas virales. Es lógico suponer que el virus tiene una gran capacidad de variación y adaptación a diversas condiciones que afectan su replicación en el hospedero[30, 33].

El TAR, se constituye como una presión selectiva artificial que limita al virus, y éste en respuesta, presentará variaciones que favorezcan su adaptación en este ambiente: las mutaciones de resistencia. De todas las mutaciones que puedan surgir en el genoma del virus sólo unas cuantas le serán favorables y ventajosas que las harán permanecer en la progenie viral. Las mutaciones de resistencia se seleccionan en condiciones de tratamiento subóptimo, por ejemplo cuando una persona no toma las dosis adecuadas ni en el tiempo en el que se prescribió originalmente [30, 33, 34]. Estas mutaciones son específicas para cada familia de antirretroviral y algunas de ellas no sólo dan resistencia a un fármaco, sino a varios de ellos. En algunos casos, una sola mutación es

capaz de dar un fenotipo resistente, e.g. L90M al inhibidor de proteasa nelfinavir; sin embargo, en muchos casos se necesita la acumulación de varias mutaciones para lograr la resistencia [30].

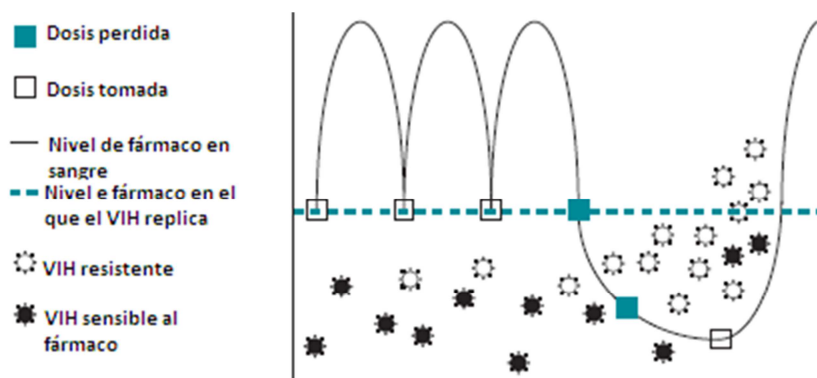


Figura 1.12 Surgimiento de mutaciones de resistencia en el VIH a causa del tratamiento subóptimo. Se observa la importancia de respetar y mantener un apego al esquema de tratamiento prescrito. Modificada de [30].

Resistencia transmitida. Cuando un paciente presenta virus circulantes que tienen alguna mutación de resistencia existe la posibilidad de que lo transmita a otra persona, esta persona estará recién infectada con un virus que posee en su genoma mutaciones de resistencia sin haber tenido contacto alguno con el(los) fármaco(s) contra los cuales presenta la resistencia [16]. Es importante hacer estudios y monitoreos de resistencia transmitida tanto a nivel regional como a nivel poblacional, para que de esta manera se pueda establecer un esquema de tratamiento que se adecue a la población tomando en cuenta el índice de mutaciones transmitidas. En cuanto a México, se sabe hasta ahora que el nivel de Resistencia transmitida se encuentra en niveles intermedios y no existe diferencia en cuanto a región geográfica [16], sin embargo, de acuerdo a lo publicado por Ávila-Ríos et al., se encontraron algunas mutaciones de resistencia específicas a ciertos ARV, que presentan una distribución geográfica diferencial [16, 35].

La resistencia a fármacos tiene efectos clínicos negativos para el paciente, el tratamiento pierde su efectividad y con ello la carga viral aumenta de manera dramática aumentando el desgaste del sistema inmune del hospedero. Una vez que se han detectado mutaciones de resistencia, la prioridad es cambiar el

esquema de tratamiento para evitar la acumulación de más mutaciones y lograr la mejora en calidad de vida del paciente.

1.6.3 Patrones de resistencia a Inhibidores de Proteasa.

Se han descrito más de 200 mutaciones de resistencia asociadas a cada una de las familias de antirretrovirales utilizados en la actualidad con más de 60 mutaciones asociadas al uso de Inhibidores de Proteasa (IPs) [30]. Como ya se describió, existen a la fecha 9 inhibidores de proteasa aprobados para su uso en humanos (Tabla 1.2). De estos fármacos, la mayoría de ellos se co-administra con ritonavir, un inhibidor de proteasa que tiene también un efecto inhibitorio en citocromo P450 para lograr un efecto de potenciación de la actividad del fármaco (“boosting”). Se utiliza la nomenclatura del fármaco seguido de la letra “r” que indica el uso de ritonavir. Nelfinavir no puede administrarse en conjunto con ritonavir [30].

De manera general, lopinavir/r, atazanavir/r, fosamprenavir/r y con menor frecuencia saquinavir/r se utilizan como fármacos de primera línea, el resto suele utilizarse como terapia de salvamento. Es esta familia de fármacos la que selecciona un mayor número de mutaciones de resistencia en comparación con el resto de familias de antirretrovirales [30].

Todos los inhibidores de proteasa actúan como péptidos mimetizadores, por inhibición competitiva del sustrato natural de la enzima: el precursor Pr55^{gag} y Pr160^{gag-pol} y tienden a ocupar más espacio que el propio sustrato[33]. Las mutaciones de resistencia a IPs surgen como consecuencia de cambios en aminoácidos en el sitio activo de la enzima que reducen la afinidad de proteasa por el inhibidor, mermando el número y naturaleza de los puntos de contacto con el fármaco. Estas mutaciones reducen mayoritariamente la afinidad por el fármaco más que por el sustrato natural confiriéndole ventaja al virus sobre el hospedero [36].

Las mutaciones de resistencia a IPs se clasifican en dos tipos: Mutaciones mayores o primarias y mutaciones menores o secundarias. Las mutaciones mayores surgen primero y poco tiempo después (semanas) de haber iniciado el régimen (Tabla 1.3), estas mutaciones confieren una gran reducción en la

susceptibilidad al fármaco pero conllevan un alto costo en la capacidad replicativa del virus. En cambio, las mutaciones secundarias surgen de manera paulatina y posterior, y por sí mismas son incapaces de aportar resistencia al inhibidor; sin embargo, en conjunto con mutaciones primarias, el fenotipo de resistencia es mayor. Las mutaciones secundarias tienen como efecto compensar las fallas en replicación y se localizan generalmente lejos del sitio activo, ejemplos de ellas son las posiciones 10, 20, 36, 63, 71. Se ha establecido que se requieren múltiples mutaciones de resistencia para desarrollar un fenotipo resistente significativo [30, 36].

Tabla 1.3. Mutaciones mayores de resistencia a IPs, modificada de la base de datos en línea de la Universidad de Stanford disponible en la red <http://hivdb.stanford.edu/DR/PIResiNote.html>, last update 10,oct 2012). [37]. Se muestran en rojo aquellas mutaciones en las que se ha reportado mayor resistencia. Subrayadas son las mutaciones en las que está contraindicada la administración del inhibidor. La primera línea muestra la posición dentro de proteasa de acuerdo a la referencia HXB2.

	30	32	46	47	48	50	54	76	82	84	88	90
a.a	D	V	M	I	G	I	I	L	V	I	N	L
consenso												
ATV/r		I	IL	V	VM	<u>L</u>	VTALM		ATFS	<u>V</u>	S	M
DRV/r		I		VA		V	LM	V	F	V		
FPV/r		<u>I</u>	IL	<u>VA</u>		<u>V</u>	<u>VTALM</u>	<u>V</u>	ATSF	<u>V</u>		M
IDV/r		I	IL	V			VTALM	V	AFTS	<u>V</u>	S	M
LPV/r		I	IL	<u>VA</u>	VM	V	VTALM	V	AFTS	V		M
NFV	N		<u>IL</u>	V	VM		VTALM		AFTS	<u>V</u>	DS	M
SQV/r					VM		VTALM		AT	<u>V</u>	S	M
TPV/r		I	IL	VA			VAM		<u>TL</u>	V		

Aún cuando se conoce que las mutaciones mayores de resistencia disminuyen mayoritariamente la afinidad sobre el fármaco, éstas, como ya se mencionó, se ven acompañadas de una seria deficiencia en la capacidad replicativa del virus orillándolo a una nueva adaptación con el surgimiento de mutaciones compensatorias. Esta adaptación en respuesta a la presión ejercida por el TAR puede surgir de dos posibilidades: mutaciones compensatorias en el mismo gen de proteasa (mutaciones menores de resistencia) o bien, en el sustrato mismo de la enzima, es decir el precursor Pr55^{gag} y más específicamente los motivos de corte en los que la enzima actúa para lograr la maduración viral [38-41].

El procesamiento de gag es una cascada de eventos de corte consecutivos y en perfecto orden en donde la enzima reconoce los motivos de corte dentro del precursor para poder liberar a cada una de las proteínas. Alteraciones en esta cascada de corte impiden la maduración de los viriones, provocando que no se observe la morfología cónica característica de la cápside del virus [31, 41]. Ver Figura 1.13. Se ha establecido el polimorfismo natural de los sitios corte con ciertas diferencias a lo largo de cada uno. Ver Figura 1.14 El motivo de corte más polimórfico es p2/NC con variación hasta del 42.7%. El motivo de corte más conservado es MA/CA con la mayoría de los sitios conservados.

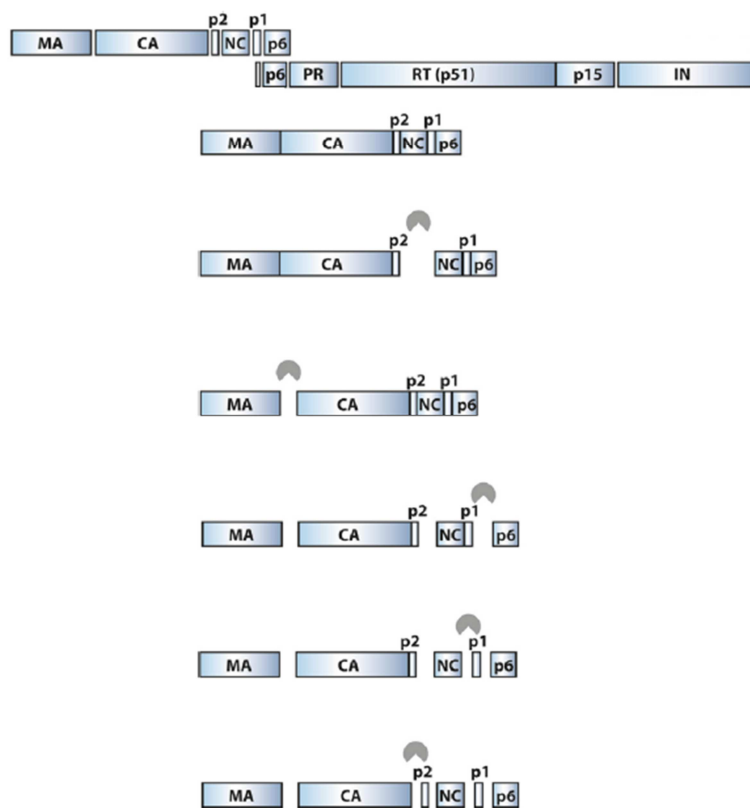


Figura 1.13. Esquema que muestra la cascada de corte para Pr55^{gag} por acción de la proteasa viral durante la maduración de los viriones Modificada de [30].

	MA					//	CA							
HXB2 aa	V	S	Q	N	Y	//	P	I	V	Q	N			
posición	128	129	130	131	132	//	133	134	135	136	137			
variabilidad %	3.5	-	4.3	-	3.5	//	-	-	0.9	0.9	-			
	CA					//	p2							
HXB2 aa	K	A	R	V	L	//	A	E	A	M	A	Q	V	T
posición	359	360	361	362	363	//	364	365	366	367	368	369	370	371
variabilidad %	0.2	0.2	1.8	11.5	1.2	//	-	-	-	-	1.2	4.1	24.8	16.4
	p2					//	NC							
HXB2 aa	S	A	T	I	M	//	M	Q	R	G	N			
posición	373	374	375	376	377	//	378	379	380	381	382			
variabilidad %	36.3	32.6	42.7	23.6	1.8	//	5.5	-	40.9	5.5	2.1			
	NC					//	p1							
HXB2 aa	E	R	Q	A	N	//	F	L	G	K	I			
posición	428	429	430	431	432	//	433	434	435	436	437			
variabilidad %	2.3	3.5	-	0.5	-	//	-	0.1	-	6.3	5.5			
	p1					//	p6							
HXB2 aa	R	P	G	N	F	//	L	Q	S	R	P			
posición	444	445	446	447	448	//	449	450	451	452	453			
variabilidad %	-	0.1	-	-	-	//	9.1	-	22.8	-	8.4			

Figura 1.14. Cuadro que muestra la variación natural de los cinco motivos de corte a lo largo de *gag*. Obtenida de [31].

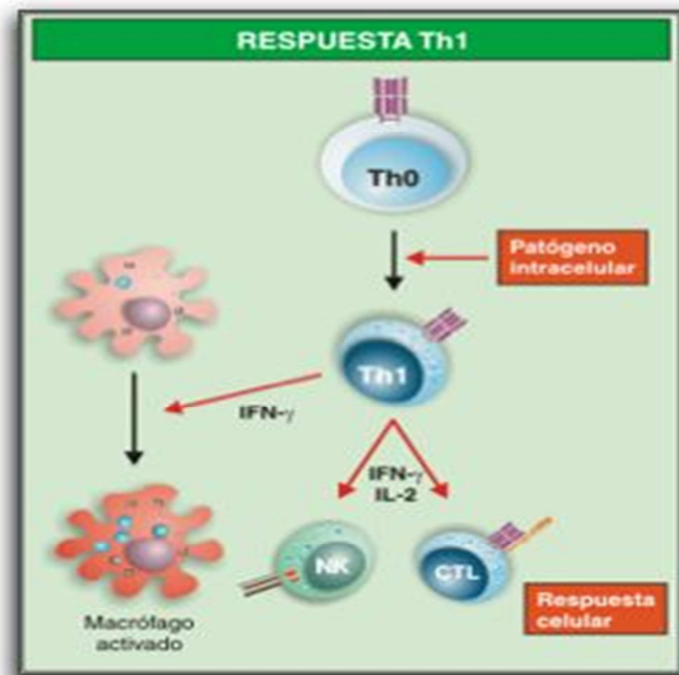
Recientes estudios se han enfocado en determinar todas aquellas posiciones que surgen a lo largo de *gag* en respuesta a la presión ejercida por el TAR, tanto en los motivos de corte, como en las proteínas de MA, CA, NC o p6. Se ha identificado que algunas de estas mutaciones no sólo actúan de manera compensatoria a la capacidad replicativa, sino que son capaces por sí mismas de conferir resistencia incluso en la ausencia del inhibidor [42-44]. Se ha descrito que la zona donde se concentra el mayor número de mutaciones asociadas a la exposición por IPs es la porción final de *gag* p2p7p1p6 donde una de las mutaciones más caracterizadas es la mutación A431V localizada en el motivo de corte p7/p1, mutación compensatoria a la mutación mayor de resistencia M46I/L en proteasa y que además por si misma confiere resistencia [42-44[45]]. Las mutaciones V128T, K436E/R, I437T/V, L449T/P/V, R452S/K, P453A/L/T también se han descrito como mutaciones compensatorias capaces de aportar resistencia. Dada la importancia del gen *gag* para la estructura y capacidad replicativa del VIH, se han hecho grandes esfuerzos para entender la evolución de este gen cuando se encuentra expuesto a IPs. La lista de posiciones en *gag* bajo presión selectiva por IPs sigue en aumento y su efecto en el ciclo de replicación viral es un campo importante de investigación[46].

Por otro lado, teniendo en cuenta que existe una región de traslape del gen *gag* con el gen *pol* es posible observar polimorfismos o mutaciones que se comparten para ambos marcos de lectura. Esta región de traslape se conoce como proteína de traslape o p6*. Investigaciones recientes han demostrado que su función principal dentro del ciclo de replicación viral es regular a la baja la actividad de proteasa y que la delección completa de p6* ocasiona hiperactividad de proteasa [27, 28]. Resulta interesante voltear la mirada a la evolución del virus bajo tratamiento antirretroviral en esta zona de traslape y su posible efecto en la modulación de la eficiencia en el corrimiento de marco de lectura.

1.7 Respuesta inmune contra el VIH

Desde los primeros contactos del virus con las células blanco del hospedero, el organismo es capaz de despertar una respuesta inmune para contrarrestar la infección. El organismo monta respuestas de tipo innata como el efecto de células asesinas naturales (NKs), monocitos, células dendríticas, entre otras. Dentro de esta respuesta son las NKs las que juegan un papel muy importante en el control de la viremia dada su citotoxicidad [47]. Se montan respuestas de anticuerpos desde las primeras semanas de la infección, y en sangre pueden encontrarse abundantemente anticuerpos contra gp120 o gp41. Aunque con el tiempo se ha identificado la presencia de anticuerpos neutralizantes, el control es limitado por la facilidad del virus para evadir este tipo de respuesta inmune[48]. Es la respuesta celular, sin embargo, la que ha demostrado mayor efectividad y control sobre el VIH [48-51]. Específicamente se ha establecido el control de la infección mediado por las células: linfocitos T citotóxicos CD8+, CTLs. Esta citotoxicidad mediada por CTLs surge en parte como consecuencia a los estímulos y ambiente de citocinas dispuesto y orquestado por la respuesta de tipo Th1 de los linfocitos TCD4+, favorecida en la infección por VIH (Figura 1.15).

Figura 1.15. Respuesta tipo Th1 en linfocitos TCD4+. Tipo de respuesta favorecida en la infección por VIH rica en citocinas proinflamatorias y citotóxicas [52].



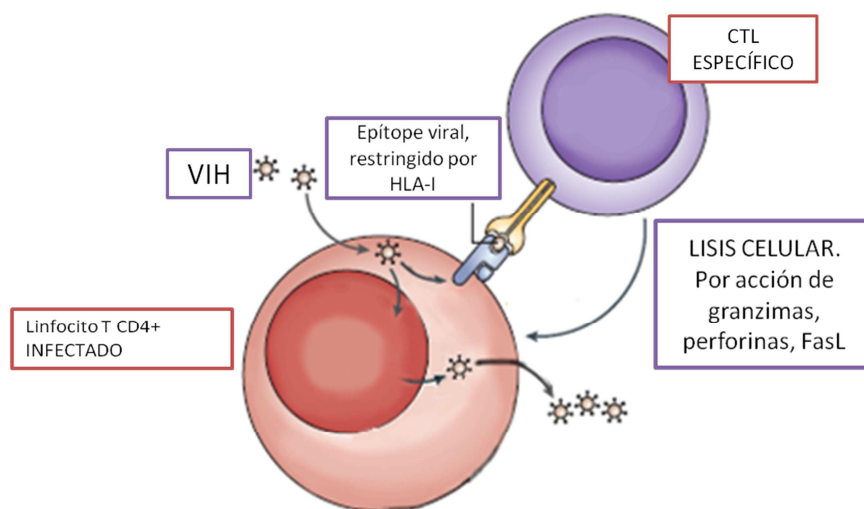
De manera general, la estimulación de los linfocitos T CD4+ sucede cuando células presentadoras de antígenos profesionales (APC), presentan pequeños péptidos del patógeno en el contexto de moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) de clase II, (también conocido como antígeno leucocitario humano (HLA) de clase II) a una célula T virgen mediante el reconocimiento específico de su TCR, Este reconocimiento conlleva a la diferenciación a células TH1 cooperadoras que favorecen la producción de un ambiente rico citocinas para lograr y favorecer una respuesta celular efectiva La activación hacia Th1 también tiene efectos sobre macrófagos y linfocitos B para la síntesis de anticuerpos [52].

Como ya se puntualizó, los linfocitos T CD8+ juegan un papel crucial en el control de la infección [51, 53]. Estas células son estimuladas cuando una APC presenta algún péptido viral de longitud de entre 8-12 aminoácidos a su TCR, mediante una interacción sumamente específica. Esta presentación de antígeno ocurre en el surco de las moléculas HLA clase I expresadas en la célula infectada presentando péptidos lineales cortos derivados de las proteínas virales (epítomos), los CTLs mediante su TRC llevan a cabo el reconocimiento de tipo "llave-cerradura". Existen dos respuestas efectoras

principales como consecuencia de este reconocimiento: actividad citotóxica y producción de factores solubles[52].

La producción de factores solubles incluye la liberación de INF- γ que enriquecen el ambiente para alcanzar un estado antiviral de las células vecinas y la liberación de β -quimionas (RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β) que resultan ser ligandos al correceptor CCR5 evitando con ello, la infección de nuevas células. La capacidad citotóxica, por otro lado, se ha descrito por dos vías: una vía granulo-dependiente por efecto de granzimas y perforinas que permeabilizan la membrana celular y activan cascadas de señalización para apoptosis respectivamente; y una vía granulo-independiente donde la molécula FasL (ligando de Fas CD95 presente en la célula infectada) inicia el proceso de muerte celular programada (Figura 1.16) [52].

Figura 1.16. Efecto de CTL's sobre el VIH. Se muestra el control de la infección por VIH a través del efecto citotóxico de CD8+ s. Modificada de [53]



1.7.1 Presión selectiva por moléculas HLA.

Como se describió en el apartado 1.6.2, el virus es capaz de adaptarse a las diferentes condiciones que ofrece el hospedero una vez que entra en el organismo. La respuesta inmune que controla parcial y temporalmente la infección se encuentra presente en todo momento, constituyéndose como una presión selectiva natural muy fuerte sobre el virus [34, 50, 53, 54]. Teniendo en cuenta que este control se encuentra favorecido hacia la respuesta por CTLs

[34, 53] y que esta respuesta se da gracias al reconocimiento por el TCR a los péptidos virales presentados en el contexto de moléculas HLA-I, es factible pensar que dada la gran variación del VIH, éste encuentre la manera de adaptarse y evadir al sistema inmune. Así, el virus escapa del reconocimiento de CTLs mediante la selección de mutaciones de escape, pequeños cambios que desarrolla el virus dentro de epítipo o en posiciones adyacentes al mismo. Estas mutaciones tienen efecto directo en la unión del péptido, disminuyendo la afinidad al surco de presentación en la molécula HLA, evitando el correcto procesamiento de los péptidos virales e impidiendo el reconocimiento por el TCR [34, 49, 53, 55].

En este contexto, las moléculas HLA-I juegan un papel decisivo, ya que dependiendo de la carga genética que un individuo posea, será el repertorio de moléculas HLA que determinen el reconocimiento del virus. Dentro de los diferentes genes de HLA-I: A, B, ó C, se sabe que los alelos HLA-B son los más polimórficos con más de 2700 alelos distintos [18, 53]. En este sentido múltiples investigaciones ya han descrito los péptidos específicos que reconoce cierto alelo de HLA. Más aún, se han descrito asociaciones de reconocimiento de ciertos péptidos virales, en el contexto de HLAs específicos con protección o riesgo de avance de la infección por VIH. Ejemplo de ello son los alelos HLA-B*5701 y HLA-B*2705 que han mostrado una asociación fuerte y consistente con un control eficiente de la infección por VIH y un avance lento de la enfermedad. Por el contrario, los alelos HLA-B*3502 y HLA-B*3503 se asocian a un control deficiente de la replicación y un avance rápido de la enfermedad [18, 47, 53, 56, 57].

Cuando un virus desarrolla mutaciones de escape, estos cambios pueden tener o no un alto costo en la capacidad replicativa. Se conoce que cambios en Gag, especialmente en p24 tienen efectos negativos en la capacidad replicativa del VIH dada la alta conservación e importancia funcional de esta proteína [49]. Siempre que exista el alelo HLA selector, el cambio permanecerá tenga o no implicaciones negativas para el virus; sin embargo, si el virus se transmite a una persona carente de ese alelo, la mutación revertirá. Conforme la enfermedad progresa, además de las mutaciones de escape, surgen también mutaciones compensatorias, que como su nombre lo dice, sirven para

contrarrestar los efectos negativos en la capacidad replicativa viral que surgen por la selección de mutaciones de escape inmune [34, 45, 49].

1.8 Múltiple presión selectiva sobre el VIH.

Una vez descrito este contexto global se tiene entonces, que los virus presentes en un paciente que ha iniciado con un régimen de tratamiento antirretroviral, están sujetos a dos presiones selectivas que dirigen la evolución del virus: Una presión selectiva natural y constante ejercida por el sistema inmune y una presión artificial ejercida por el tratamiento antirretroviral. El efecto de estas dos fuertes presiones sobre el virus, se ha constituido como un foco importante de investigaciones que buscan describir en parte la evolución y adaptación viral en su hospedero humano, así como buscar posibles blancos terapéuticos y candidatos a inmunógenos contra el virus [54, 58].

Dada la posible interacción entre estas dos presiones, surge la posibilidad de que existan sitios en el genoma viral que puedan ser blanco simultáneo de la presión selectiva inmune y farmacológica. Puede existir la posibilidad que una mutación de resistencia al tratamiento antirretroviral se encuentre dentro de un péptido que es reconocido por cierto alelo HLA, influenciando la posibilidad de reconocimiento inmune. Así, se pueden plantear dos escenarios: que esta mutación de resistencia a fármacos antirretrovirales y funja también como mutación de escape inmune confiriéndole doble ventaja al virus, o bien, que aumente la antigenicidad del péptido haciéndolo mejor blanco de la respuesta inmune. En este último escenario, si el virus muta para adquirir resistencia a fármacos, se volvería un mejor blanco para el sistema inmune, quedando el VIH acorralado entre dos presiones selectivas opuestas. Por otro lado, las mutaciones de escape que surjan por efecto de la presión que ejerce el sistema inmune, también podrían asociarse con la susceptibilidad del virus al tratamiento antirretroviral [34, 54].

La búsqueda de sitios donde confluyan presiones selectivas sobre el genoma del VIH es interesante debido a su posible aplicación en el campo de vacunas y en la posible potenciación del tratamiento antirretroviral. De acuerdo a esta hipótesis, la existencia de tales sitios donde confluyan presiones selectivas opuestas, permitiría acorralar al virus y mejorar el control de su replicación, así como evitar el uso de fármacos asociados a mutaciones que provoquen tanto resistencia como escape inmune en individuos con alelos HLA específicos [34, 54].

CAPÍTULO II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Una vez que el VIH entra al organismo, se encuentra sujeto a las respuestas del sistema inmune que el hospedero es capaz de montar eficazmente para controlar la infección. La respuesta inmune que posee un mayor efecto en el control de la viremia y la progresión de la enfermedad, es la respuesta citotóxica, mediada por linfocitos T CD8+, CTLs [34, 50, 53, 54]. Las células infectadas procesan las proteínas virales para generar péptidos virales, algunos de los cuales serán presentados en la superficie en el contexto de moléculas HLA de clase I. Los CTLs, reconocen a las células infectadas mediante la unión de su TCR con el complejo HLA-péptido viral, lo cual culmina en la respuesta citotóxica por liberación de granzimas y perforina ocasionando la muerte de la célula infectada [52]. Se dice entonces, que esta respuesta de CTLs se encuentra definida y restringida por las moléculas HLA de clase I [53]. Dada la efectividad de la respuesta de CTLs para controlar al VIH, esta respuesta inmune se constituye como una presión selectiva muy fuerte que dirige sin lugar a dudas, la evolución viral [34]. A manera de adaptación, el virus responde a esta presión con cambios en su genoma afectando el procesamiento de los epítomos antes de su presentación, que evitan la unión de los péptidos virales a la molécula HLA o que disminuyen la afinidad de la unión TCR-HLA/péptido [49]. Estos cambios adaptativos en el virus se conocen como mutaciones de escape inmune. Se sabe que las mutaciones de escape que surgen en el gen *gag* conllevan un alto costo en la capacidad replicativa del virus; sin embargo, también es posible que se seleccionen mutaciones adicionales que compensen esta deficiencia confiriéndole una ventaja al virus en presencia de la presión selectiva por HLA [49, 53].

El surgimiento de la terapia antirretroviral, por otro lado, constituye una presión selectiva adicional, que de manera artificial limita la replicación del virus dentro del organismo [16]. Los Inhibidores de Proteasa, IPs, tienen como blanco la enzima viral proteasa evitando con ello la maduración de los viriones [30]. De manera semejante como ocurre con la presión ejercida por el sistema inmune, el virus es capaz de seleccionar cambios en su genoma para escapar a esta presión artificial: mutaciones de resistencia. Las mutaciones mayores de resistencia son las que tienen un mayor efecto de escape a la presión ejercida

en proteasa pero que conllevan también un alto costo en la capacidad replicativa del virus ya que los cambios se encuentran en el sitio de unión al sustrato de la enzima. De manera gradual se van seleccionando también mutaciones menores de resistencia dentro de *pol* que tienen un efecto mínimo de resistencia al antirretroviral pero que compensan los costos en capacidad replicativa [30]. Un fenotipo de resistencia a IPs que evita el control de la viremia en los pacientes, surge con la acumulación de una serie de mutaciones mayores y menores, sin embargo investigaciones recientes se han enfocado al estudio de las interacciones entre una proteasa resistente y sus sustratos naturales [30, 31]. Gag es uno de los sustratos de proteasa que ha mostrado evidencia de adaptación frente a la presión ejercida por IPs [31]. En especial se han observado cambios a lo largo de todos los motivos de corte del polipéptido, mayoritariamente hacia la porción final p2p7p1p6, y aunque existen pocos reportes, también se han encontrado mutaciones asociadas con presión selectiva por IPs en las proteínas p17 y p24 dentro de Gag [31, 38, 41, 43]. La mayoría de las mutaciones seleccionadas por IPs en Gag actúan de manera compensatoria, modificando la afinidad de la enzima resistente por el sustrato, sin embargo, se han reportado mutaciones que aportan resistencia a IPs incluso en la ausencia del medicamento. Una de las mutaciones más caracterizadas es la A431V localizada en el motivo de corte p7/p1, mutación compensatoria y de resistencia, algunos otros ejemplos son las mutaciones V128T, K436E/R, I437T/V, L449T/P/V, R452S/K, P453A/L/T [31, 45, 59]

En este escenario complejo y dinámico en el que el VIH está sujeto a múltiples presiones selectivas que dirigen la evolución y adaptación viral, resulta lógico esperar que existan interacciones entre estas presiones selectivas. Estas interacciones pueden favorecer doblemente al virus confiriéndole tanto escape al sistema inmune como resistencia al tratamiento antirretroviral; sin embargo, también existe la posibilidad de limitar la variabilidad del virus por efectos contrarios entre estas interacciones [34]. Podría esperarse que ciertas mutaciones de resistencia o compensatorias dentro de *pol* o en *gag*, pudieran incrementar la antigenicidad de péptidos presentados por moléculas HLA de clase I, mejorando con ello el control inmune del virus. Por otro lado, las mutaciones de escape inmune o mutaciones compensatorias, pueden tener un

efecto negativo en la susceptibilidad al tratamiento antirretroviral. En ambos escenarios se habla de un acorralamiento viral [34].

Teniendo en mente el escenario previamente descrito, en el presente trabajo se realizó una búsqueda profunda de posibles interacciones que surgen entre la presión ejercida por el sistema inmune y la presión por parte del tratamiento antirretroviral, específicamente por IPs, en el gen *gag* de VIH circulante en México. Se estudió una cohorte de pacientes mexicanos que presentaban un fenotipo resistente a IPs. Esta búsqueda tuvo como primer acercamiento la descripción filogenética de la cohorte, seguido de un análisis de las secuencias de *gag* con especial enfoque en la variabilidad de los motivos de corte a lo largo del polipéptido y hacia la porción final p2p7p1p6. Posteriormente, se hizo una búsqueda de mutaciones asociadas al uso de IPs previamente reportadas y una relación con aquellas posiciones seleccionadas positivamente resultantes del análisis de razón de sustituciones sinónimas y no sinónimas, estableciendo posibles asociaciones con alelos HLA. El encontrar posiciones en el genoma viral donde exista confluencia de presiones selectivas es relevante para optimizar la elección y el tratamiento antirretroviral de manera individualizada para aquellos pacientes en el que son conocidas las mutaciones de resistencia presentes, así como la presencia de alelos HLA-I específicos. Esta confluencia pueden conferirle doble ventaja al virus o en el escenario contrario, una vez conocidos los factores inmunes y de mutaciones en el genoma podría establecerse un régimen en el que se orille al acorralamiento favoreciendo el control viral en los pacientes. Más aun, este estudio abre nuevas perspectivas en el entendimiento de la evolución del VIH y de la adaptación del virus a su hospedero en el marco de la era del tratamiento antirretroviral y en el contexto inmunogenético mexicano.

CAPÍTULO III. HIPÓTESIS

Dada la doble presión selectiva por parte del sistema inmune y el tratamiento antirretroviral a la que se encuentra sometido el VIH, se encontrarán posiciones en el genoma viral exclusivas de la cohorte que surgen en respuesta a la presión selectiva adicional ejercida por el tratamiento.

Se encontrarán posiciones en el genoma viral donde ambas presiones selectivas converjan, causando dos tipos de consecuencias: 1. Un doble escape del virus hacia ambas presiones selectivas; 2. El acorralamiento del virus entre dos presiones selectivas opuestas.

CAPÍTULO IV. OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL.

Estudiar y caracterizar las interacciones entre presión selectiva inmune y por tratamiento antirretroviral en el gen *gag* del VIH-1, con enfoque en la porción terminal p2p7p1p6, en una cohorte de pacientes mexicanos con resistencia a inhibidores de proteasa.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- Extraer el RNA viral a partir de plasma de pacientes con falla hacia el tratamiento con IPs.
- Amplificar mediante PCR anidada la región *gag-pro* del genoma viral a partir de RNA de virus libre en plasma de pacientes con falla al tratamiento con IPs.
- Secuenciar la región *gag-pro* del VIH de pacientes con falla al tratamiento con IPs.
- Generar una base de secuencias alineadas tanto para la región *gag-pro* viral de cada paciente como para la porción de traslape en el marco de lectura del gen *pol*.
- Establecer las relaciones filogenéticas de las secuencias de la región *gag-pro* de los virus de los pacientes de la cohorte en estudio.
- Realizar un análisis comparativo de variabilidad, por entropía de Shannon, entre la cohorte de pacientes expuestos a IPs en estudio y una cohorte de pacientes vírgenes a tratamiento antirretroviral.
- Establecer la variabilidad de los motivos de corte de la proteasa viral a lo largo del gen *gag* en VIH de la cohorte de pacientes expuestos a tratamiento con IPs y en comparación con una cohorte de pacientes vírgenes a tratamiento.
- Describir la presencia de mutaciones asociadas a selección por IPs en el gen *gag*, en pacientes expuestos a IPs y en comparación con pacientes vírgenes a tratamiento.
- Realizar un análisis evolutivo tanto para las secuencias del gen *gag* como de la porción de traslape con el gen *pol* de VIH de pacientes

expuestos a IPs, buscando posiciones en las regiones de interés bajo presión selectiva por razón de sustituciones sinónimas y no sinónimas.

- Establecer posibles posiciones dentro del gen *gag* viral donde pudiera existir confluencia de presiones selectivas y/o que sean exclusivas de la cohorte en estudio.
- Establecer posibles asociaciones entre los alelos HLA frecuentes en la población mexicana y aquellas posiciones que se encontraron bajo presión selectiva o asociadas a la exposición a IPs en los virus de la cohorte en estudio.

CAPÍTULO V. METODOLOGÍA.

SELECCIÓN DE PACIENTES.

Se emplearon muestras de plasma de individuos infectados por VIH, con falla a inhibidores de proteasa, seleccionadas del banco de muestras del Laboratorio de Diagnóstico Viroológico del Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. Los criterios de selección fueron contar con la cantidad de plasma suficiente para la realización de las pruebas del presente estudio y contar con una genotipificación del gen *pol* previa que mostrara la presencia de mutaciones de resistencia a inhibidores de proteasa. Se obtuvo un grupo final de 74 muestras. Para cada muestra se extrajo RNA viral y se secuenció el gen *gag* para cada uno como se indica a continuación. El presente estudio fue evaluado y aceptado por el Comité de Ciencia y Bioética del INER.

EXTRACCIÓN DE RNA.

Se extrajo RNA viral de plasma para cada paciente, utilizando el kit QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Valencia C.A). La extracción se logró por unión selectiva del RNA a una membrana de sílica-gel dispuesta en una columna. Brevemente, posterior a la centrifugación de la muestra de plasma para concentrar las partículas virales, se lisó bajo condiciones desnaturizantes con base en tiocianato de guanidina; el lisado se unió a la membrana de sílice y el RNA unido a la membrana se estabilizó y lavó con buffers de alta fuerza iónica. Finalmente, el RNA viral se eluyó con un buffer libre de RNAsas de baja fuerza iónica.

AMPLIFICACIÓN DEL GEN *gag-pro*. PCR ANIDADA

Para lograr la amplificación de la región *gag-pro* de aproximadamente 1500 pb se llevaron a cabo dos rondas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la primera de ellas por transcripción inversa acoplada a PCR y una segunda reacción que permite obtener cantidades adecuadas del DNA de la región de interés. Para ambas rondas se utilizó un termociclador Veriti 96 well Thermal Cycler (Life Technologies, Carlsbad, CA).

Se realizó una primera amplificación utilizando la enzima SuperScript® III One-Step RT-PCR Platinum® Taq High Fidelity (Invitrogen, Carlsbad, CA) que permite la reacción de retro-transcripción seguida de amplificación de la región de interés en un solo paso. Se logró la amplificación por la utilización de los primers “forward” 623Fi (5'-AAATCTCTAGCAGTGGCGCCCGAACAG-3') y “reverse” 2cRx (5'-TAACCCTGCGGGATGTGGTATTCC-3') de acuerdo a la siguiente mezcla de reacción y programa de amplificación.

Componente	Volumen por muestra
dH ₂ O	8.5 µL
Buffer 2x	12.5 µL
Primer “forward” 623Fi (20 pmol/µL)	0.5 µL
Primer “reverse” 2cRx (20 pmol/µL)	0.5 µL
RT-Taq platinum polimerasa	0.5 µL
RNA viral	2.5 µL
Volumen final	25 µL

Programa de amplificación: 1 ciclo de 30 min a 55°C y 2 min a 94°C, 35 ciclos de 15s a 94°C, 30s a 55°C y 2 min a 68°C y finalmente 1 ciclo de 5 min a 68°C.

Para la segunda ronda de amplificación se utilizó la enzima Platinum® Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA), y los primers “forward” G1 (5'-GCAGGACTCGGCTTGCTGAA-3') y “reverse” G10 (5'-TATCATCTGCTCCTGTATC-3') de acuerdo a la siguiente mezcla de reacción y programa de amplificación.

Componente	Volumen por muestra
dH ₂ O	16.25µL
Buffer 10x	2.5µL
MgCl 50 mM	1µL
dNTP´s mix 10 µM	0.5µL
Primer “forward” G1 (20 pmol/µL)	1µL
Primer “reverse” G10 (20 pmol/µL)	1µL
Taq platinum DNA polimerasa	0.25µL
DNA primera ronda	2.5µL
Volumen final	25µL

Programa de amplificación: 1 ciclo de 94°C por 3min , 35 ciclos de 30s a 94°C, 30s a 56°Cy 2 min a 72°C, finalmente 1 ciclo de 5min a 72°C.

VERIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS POR ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA AL 1%.

Se realizó un gel de agarosa al 1% para comprobar la presencia de la banda correspondiente al producto amplificado de aproximadamente 1500 pb para cada paciente. Se utilizó el marcador de peso molecular ϕ x 174 RF DNA/*Hae* III Fragments (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se incluyó en todos los casos un control negativo de la reacción en cuyo pozo no debe observarse ninguna banda.

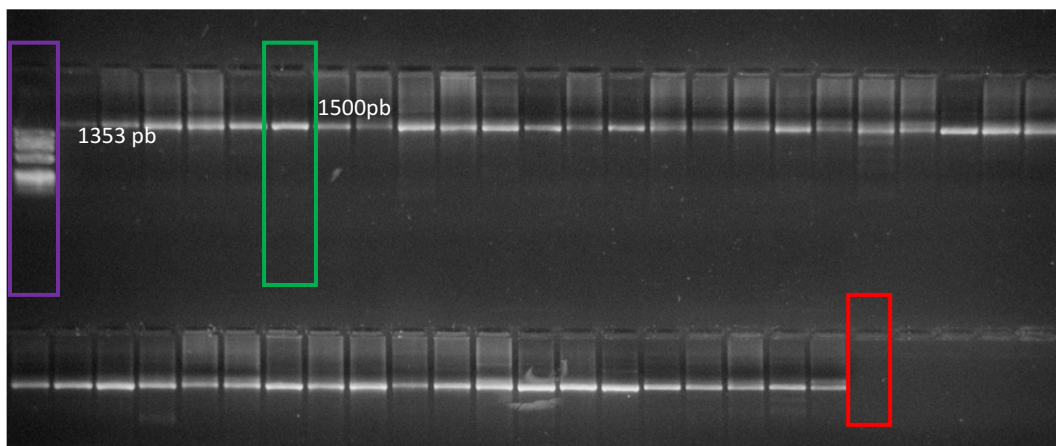


Figura 5.1. Se muestra el gel de una serie de muestras donde todos los pozos presentan la banda de aproximadamente 1500pb. En recuadro morado se muestra el patrón de bandas del marcador de peso molecular, el recuadro verde muestra el ejemplo de la visualización de la banda para una de las muestras. El recuadro en rojo muestra el pozo correspondiente al control negativo.

PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN.

Todos los productos de amplificación fueron purificados utilizando el kit de purificación QIAquick® PCR Purification Kit (QIAGEN, Valencia, CA). La purificación se llevo a cabo por unión selectiva del DNA a una membrana de sílica dispuesta en una columna bajo la presencia de una alta concentración de sales. Las impurezas se eliminaron por lavados con buffers de alta fuerza

iónica y el DNA purificado se eluyó por el uso de un buffer de baja fuerza iónica y pH básico.

CUANTIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN.

Para poder realizar una reacción de secuencia eficiente de los productos amplificados (con un rango de concentración de 10-40 ng/μL), se midió la concentración del producto de PCR utilizando un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE). La pureza del DNA purificado fue evaluada en el software por la relación entre ácidos nucleicos/proteínas (absorbancia 260/280), siempre considerando valores mayores a 1.8.

SECUENCIACIÓN DEL GEN *gag-pro*

Una vez purificado y cuantificado cada producto de PCR se prosiguió a preparar la reacción de secuenciación. Se realizaron ocho secuencias con ocho primers distintos que aseguran cubrir el producto amplificado en ambos sentidos (3'→5' y 5'→3') para cada uno de los pacientes. La secuenciación se realizó por el método de Sanger, que hace mano de didesoxinucleótidos (ddNTPs) carentes del grupo OH 3' marcados, que funcionan como terminadores de cadena. Para la reacción de secuencia se empleó el reactivo Big Dye Terminator v.3.1 cycle-sequencing (Life Technologies, Carlsbad, CA) que incluye ddNTPs marcados con fluorocromos. La PCR de secuencia se realizó en un termociclador Veriti 96 well Thermal Cycler (Life Technologies, Carlsbad, CA).

Se emplearon los siguientes primers: Cuatro primer's "forward" G2 (5'-GCGGCGACTGGTGAGTA-3'), GAS3 (5'-CATCAATGAGGAAGCTGCAG-3'), GAS5 (5'-CTCTAAGAGCCGAGCAAGCT-3'), HPR1977 (5'-GTTAAGTGTTCATTGTGG-3'); cuatro primer's "reverse" GS1 (5'-TTATCTAAAGCTTCCTTGGTGTCT-3'), GAS4 (5'-GGTTCTCTCATCTGGCCTGG-3'), GAS6 (5'-AAAATAGTCTTACAATCTGG-3'), GA2274R (5'-TCTTTATTGTGACGAGGGGTCTG-3'); con la siguiente mezcla de reacción y programa en termociclador.

Componente	Volumen por muestra
dH ₂ O	3μL
Buffer 5x	2μL
BigDye v3.1	1μL
Primer´s (2pmol/μL)	2μL
Dilución de DNA (10-40ng totales)	2μL
Volumen final	10μL

Programa en termociclador: 1 ciclo de 1min a 96°C, 40 ciclos de 10s a 96°C, 5s a 50°C y 1min a 60°C.

Una vez concluida la reacción de amplificación, la placa se purificó utilizando acetato de sodio 3 M (adición de 1 μL por pozo de reacción) y etanol al 100% (50 μL por pozo), se mezcló con vórtex y se centrifugó por 20min a 2000rpm. Se quitó el excedente de etanol por centrifugación de la placa invertida en papel absorbente a 150 rpm por un minuto. Se adicionó 150μL de etanol al 70% para la eliminación de impurezas con una centrifugación de 5min a 2000rpm. Se realizaron como mínimo dos pasos de centrifugación para eliminación de etanol con la placa invertida en papel a una velocidad de 150 rpm por 1 minuto. Finalmente, el precipitado se resuspendió en 15μL de formamida con una centrifugación final de 150rpm durante 1 min para bajar todos los excedentes de suspensión adheridos a la paredes.

Los productos de la reacción de secuencia se separaron por electroforesis capilar en el equipo ABI Prism 3730xl DNA Genetic Analyzer (Life Technologies, Carlsbad, CA). La preparación de la placa de secuencia para el análisis así como la revisión del resultado se realizó con el software Sequencing Analysis v5.4 (Life Technologies, Carlsbad, CA). El ensamblado de la secuencia de los 8 primer´s utilizados para cada paciente se realizó con el software SeqScape v2.7 (Life Technologies, Carlsbad, CA) con edición y revisión manual para cada secuencia. Se obtuvo una secuencia consenso de la región *gag-pro* para cada paciente.

ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS *gag-pro*.

Alineamiento de las secuencias.

Una vez obtenidas las secuencias para cada paciente se importaron en formato FASTA al programa MEGA 5.05 (Análisis Molecular de Genética Evolutiva). La herramienta que utiliza el programa para el alineamiento múltiple de secuencias es Clustal W. Una vez obtenido el primer alineamiento, se editó de forma manual, en conjunto con una secuencia de referencia VIH-HXB2 y una secuencia de VIH subtipo B, obtenidas de la base de datos de VIH de Los Álamos (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/html>). Se consideró en cada secuencia, las inserciones y/o deleciones que presentan para llegar al mejor alineamiento. Se utilizó la secuencia de referencia HXB2 como comparación para la numeración del gen *gag-pro* y su producto protéico.

Análisis filogenéticos.

Se construyó un árbol filogenético para las secuencias de todos los individuos en estudio a partir del fragmento de una longitud aproximada de 1500 pb de la región *gag-pro*. Se utilizó el programa MEGA 5.05 con el método de Maximum Likelihood, calculando las distancias evolutivas con el modelo General Time Reversible Model. La significancia del árbol se probó mediante 1000 réplicas de bootstrap. Se incluyó la secuencia de referencia HXB2 y la secuencia consenso de VIH subtipo B. (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/html>)

ANÁLISIS EVOLUTIVO DE LAS SECUENCIAS INCLUIDAS EN EL ESTUDIO.

Se buscaron aquellas posiciones dentro de *gag* que tuvieran evidencia de estar sujetas a selección positiva. La búsqueda se hizo utilizando un modelo evolutivo de codones basado en razones de sustituciones sinónimas (dS) y no sinónimas (dN) disponible a través del servidor en línea DataMonkey (www.datamonkey.org). El modelo utiliza al análisis SLAC (Single-Likelihood Ancestor Counting). Este análisis estima los valores de:

$$dN = \frac{NN}{EN} \text{ y } dS = \frac{NS}{ES}$$

Donde ES y EN son valores esperados y NS y NN valores observados de acuerdo al ajuste que realiza reconstruyendo secuencias ancestrales sitio por sitio y utilizando parámetros de modelos de nucleótidos y codones donde calcula cada valor de acuerdo a las sustituciones sinónimas y no sinónimas para cada sitio.

Si $dN > dS$ se dice que la posición se encuentra bajo selección positiva y es un sitio que tiende a la variación, si $dN < dS$ se dice que la posición esta bajo presión selectiva negativa o que tiende a la conservación. Considerando una significancia estadística con una $p < 0.01$

ANÁLISIS DE COMPARACIÓN DE VARIABILIDAD.

Considerando que la cohorte en estudio se encontraba bajo una presión selectiva adicional, es decir, el tratamiento antirretroviral, se hizo un análisis de comparación de variabilidad con una cohorte de pacientes que carecen de esta presión selectiva adicional, es decir, de pacientes vírgenes a tratamiento. Para ello, se utilizó una cohorte de 200 secuencias de la región *gag-pro* utilizadas para el proyecto "Impacto de mutaciones en el gen *gag* en la capacidad replicativa del VIH en el contexto inmunogenético de la población mexicana", realizado en los laboratorios del CIENI, INER (Alva-Selma datos no publicados) y que forman parte de la Base de Datos de Epidemiología y Evolución del VIH en México.

Este análisis se hizo utilizando la herramienta de estimación de entropía de Shanon para cada una de las posiciones del alineamiento en ambos grupos de comparación. Esta herramienta se encuentra en la base de datos de VIH de los Alamos (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/ENTROPY/entropy/entropy.html>), bajo el nombre de Entropy Two. Este análisis, mediante una medida de variación posición a posición de un alineamiento, permite la comparación de grupos de secuencias alineadas con características distintas y determina si hay una variabilidad relativa mayor en alguno de los grupos. Si existe una diferencia

y además es significativa, el gráfico que se obtiene muestra resaltadas aquellas posiciones con dicha significancia.

Esta herramienta realiza una estimación de apoyo estadístico de 1000 aleatorizaciones con reemplazo, tomando en cuenta la frecuencia (e.g. una posición con 50% A y 50% T tiene una mayor entropía de Shannon que una posición con 90% A y 10% T) y el número de posibilidades (e.g. una posición con 90% A, 5% T y 5% G tiene una mayor entropía de Shannon que una posición con 90% A y 10% T). De esta manera, la entropía de Shannon se define como una medida simple de incertidumbre en un conjunto de datos. Aplicado a secuencias, la entropía de Shannon podría considerarse como la habilidad de predecir qué aminoácido se encontraría en cada posición de la secuencia, basándose en un muestreo.

IMPACTO DE PRESIÓN SELECTIVA EJERCIDA POR HLA.

Con el fin de hacer un análisis más específico del impacto de la presión selectiva por HLA en el gen *gag*, se utilizaron los datos de asociaciones entre la expresión de alelos HLA específicos y la presencia de polimorfismos en el virus previamente estimados para una cohorte de aproximadamente 700 pacientes mexicanos (Juárez, C. et al, datos no publicados) usando un modelo evolutivo complejo desarrollado por Carlson y colaboradores [60]. Este modelo llamado Redes de Dependencia Filogenética (PDN) estima la existencia de asociaciones HLA-codón del VIH o, codón de VIH-codón de VIH, corrigiendo para los tres principales confusores: la co-variación de codones de VIH, el desequilibrio de ligamiento de los genes HLA y los efectos confusores de la filogenia del VIH [60].

Es un modelo multivariado que representa las dependencias probabilísticas entre un atributo blanco: la ausencia o presencia de cierto aminoácido en cada uno de los codones del virus, con un atributo predictor: la ausencia o presencia de todos los posibles alelos HLA y/o la presencia o ausencia de otros codones adicionales al atributo blanco presentes en el proteoma del virus, corrigiendo para la estructura filogenética del virus. Esta red de dependencia muestra gráficamente que atributos predicen cierto codón blanco a través de la

asociación de una distribución de probabilidad para cada atributo blanco condicionada por varios atributos predictores.

Para saber si existe una asociación, significativa se hace la comparación de un modelo nulo que supone que el atributo predictor no ejerce presión selectiva sobre algún codón del VIH, con un modelo alternativo que supone que si existe presión selectiva ejercida sobre el blanco. De esta manera, iterativamente se añaden atributos predictores para obtener la mayor significancia y se registra el tipo de distribución más significativa de acuerdo a 4 posibles: atracción, tener el predictor hace más probable tener el blanco, repulsión, no tener el predictor hace menos probable tener el blanco, escape, tener el predictor hace menos probable tener el blanco y reversión donde no tener el predictor hace más probable tener el blanco. Al final las correlaciones positivas de asociación se establecen por los pares atracción/repulsión y las correlaciones negativas por el par escape/reversión [60].

Se utilizaron también, los datos de tipificación HLA de clase I para los genes A, B y C disponibles en la Base de Datos de Epidemiología Molecular y Evolución del VIH en México del CIENI, INER (Valenzuela-Ponce, et al, datos no publicados), y se evaluó la posibilidad de que alelos HLA frecuentes en la cohorte mexicana, pudieran explicar la presencia de selección positiva en las posiciones dentro de *gag* encontradas y en relación con los resultados por el modelo de PDN.

Adicionalmente se incluyeron asociaciones con alelos HLA reportadas en el mapa de epítopes confirmados experimentalmente de la Base de Datos de VIH de Los Álamos disponible en www.hiv.lanl.gov. [61] Esta búsqueda adicional permitiría encontrar asociaciones adicionales no encontradas por el modelo de PDN con posibilidad de asociación al contexto inmunogenético mexicano.

CAPÍTULO VI. RESULTADOS

6.1 CARACTERÍSTICAS DE LA COHORTE.

Se estudió una cohorte de 74 pacientes mexicanos extraídos del banco de pacientes del Laboratorio de Diagnóstico Viroológico del CIENI. Se tomaron las muestras de plasma de aquellos pacientes que contaran con el volumen suficiente para la realización de cada técnica experimental, así como los datos genotípicos de mutaciones que confieren resistencia a al menos un Inhibidor de Proteasa. Se contó con los datos de los parámetros clínicos de cuenta de linfocitos T CD4+ y carga viral plasmática de cada paciente. Cabe hacer notar, que la presencia de mutaciones en otros genes blanco de terapia antirretroviral no se conoce. De la cohorte de estudio, un 89.2% de pacientes pertenecían al Distrito Federal y un 10.8% pertenecían a los siguientes estados de la República:

- Veracruz, 3 pacientes.
- Jalisco, 1 paciente.
- Michoacán, 1 paciente.
- Guerrero, 3 pacientes.

La proporción de los pacientes de acuerdo al género fue de 82.4% sexo masculino, 17.6% sexo femenino. Ver Tabla 6.1. La cohorte del presente estudio reflejaba las proporciones características de hombres y mujeres infectados por VIH en México, conociéndose que un 80% de los individuos que viven con el virus en nuestro país son hombres [12].

El 96% de los pacientes de la cohorte poseía al menos una mutación mayor de resistencia a IPs en el gen de proteasa. La mediana de mutaciones mayores fue de 3 mutaciones por paciente con un rango de 0 a 5 (Tabla 6.1). El 100% de los pacientes poseían al menos una mutación menor de resistencia (Tabla 6.2), que como ya se describió requieren acumularse para causar resistencia a IPs [30].

En un principio se seleccionó un total de 76 pacientes, sin embargo, al realizar análisis posteriores de las secuencias de la región *gag-pro* (ver la sección de resultados: análisis filogenético de la cohorte), se encontró que para dos casos,

se trataba del mismo paciente pero en diferentes fechas de toma de muestra. Se tomó en cuenta para los análisis la primera fecha de toma de muestra.

Tabla 6.1. Descripción de los parámetros clínicos de los pacientes de la cohorte de estudio.

Proporción de hombres (%)	82.4
Proporción de mujeres (%)	17.6
Pacientes cuyos virus presentaron al menos una mutación mayor de resistencia a IP (%)	95.95
Número de mutaciones mayores (mediana [rango])	3 [0-5]
Carga Viral Plasmática (copias de RNA/mL) (mediana* [rango])	31,485 [833-793,286]
Conteo de linfocitos T CD4+ (células/μL) (mediana* [rango])	240 [12-984]

*Valor de la mediana con datos faltantes de 15 pacientes para la cuenta de Linfocitos T CD4+ y 5 pacientes para Carga Viral,

La mediana del conteo de linfocitos T CD4+ fue de 240 células/ μ L (rango 12 – 984 células/ μ L), un valor bajo que refleja por un lado, la cronicidad en la que se encuentran la mayoría de los pacientes en estudio, y por el otro, el deterioro del sistema inmune asociado a la presencia de falla al tratamiento antirretroviral. La mediana de carga viral fue de 31,485 copias/ μ L, un valor alto que refleja la pérdida del control virológico en los pacientes por parte del tratamiento antirretroviral (Tabla 6.1).

6.2 ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LAS SECUENCIAS EN ESTUDIO.

Como un primer acercamiento al estudio de la variabilidad de las secuencias de la región gag-pro de pacientes con falla a esquemas de tratamiento con IPs, y para buscar posibles agrupamientos de las secuencias que mostraran posibles eventos fundadores comunes entre subconjuntos de secuencias, se construyeron árboles filogenéticos.

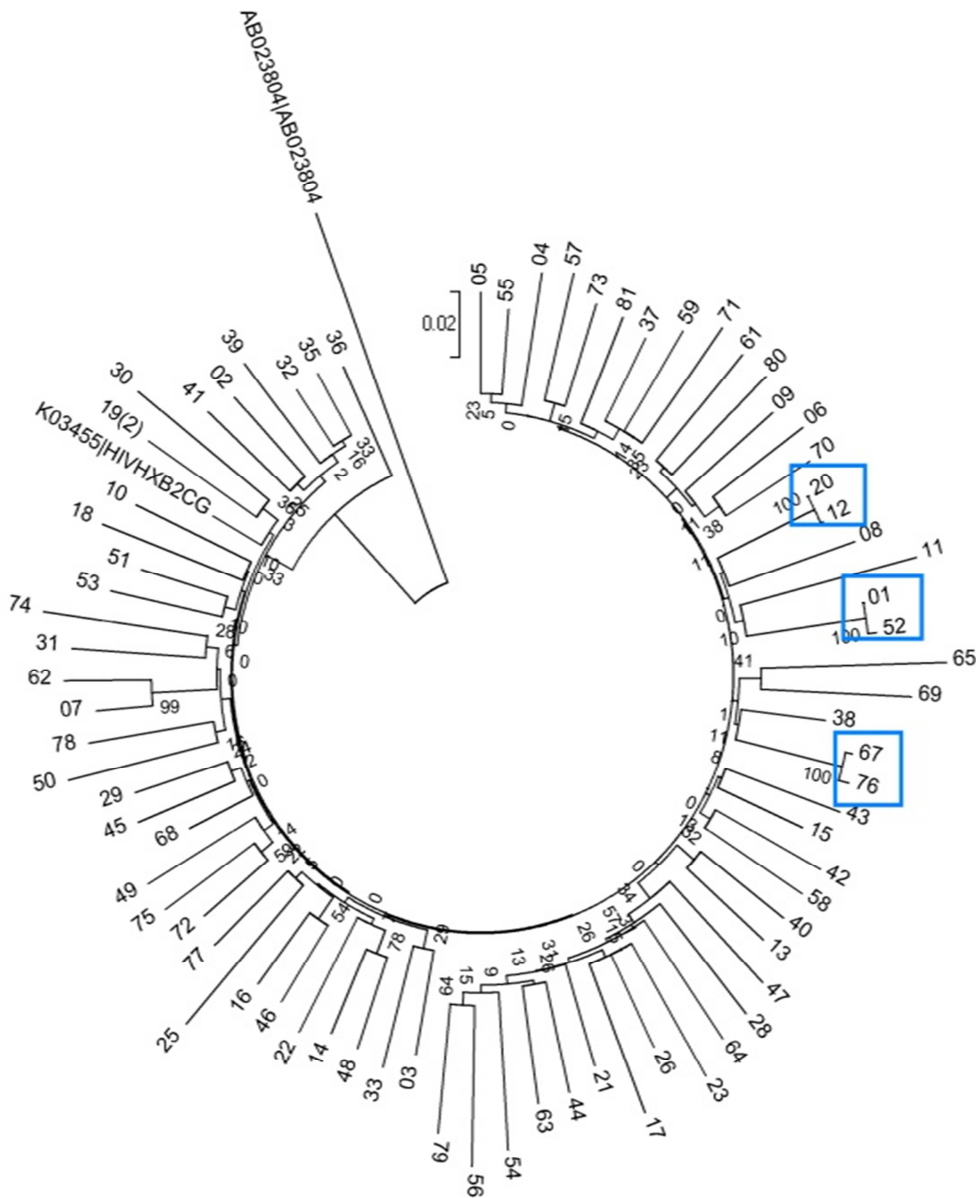


Figura 6.1 Árbol filogenético para las 76 secuencias de la región *gag-pro* de los virus presentes en cada paciente incluidas en el estudio. El análisis filogenético fue realizado por el programa Mega 5.05. Se utilizó el método de Máxima Verosimilitud (Maximum Likelihood) tomando como representativo el árbol consenso tras 1000 réplicas de bootstrap. La distancia evolutiva se calculó utilizando el modelo “General Time Reversible Model (GTR)”. Se muestra el nombre de la secuencia de referencia HXB2 y una secuencia VIH subtipo B, tomadas de la Base de Datos de VIH de Los Álamos. (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/html>). El recuadro azul muestra aquellas secuencias que se encuentran a la misma distancia genética y se sospecha de posibles pares de transmisión

El árbol filogenético, no mostró clusters evidentes que sugirieran una agrupación o similitud genética clara entre subconjuntos de secuencias. Las secuencias presentaron poca divergencia entre sí dadas las ramas equidistantes a lo largo del árbol consenso, y los bajos valores de bootstrap de

los nodos externos. Esto sugiere una población viral altamente homogénea. Se encontraron tres pares de secuencias con muy baja distancia genética, lo que nos hizo sospechar la presencia de posibles pares de transmisión. Se hizo una búsqueda más profunda en las bases de datos del CIENI para corroborar esta hipótesis, observándose que las secuencias similares pertenecían al mismo paciente en distintos puntos en el tiempo. El par 01/52 se trató de muestras del mismo paciente tomadas en diferentes fechas. Al tratarse de la misma secuencia, en el árbol consenso se observó una rama que muestra secuencias a la misma distancia. El mismo caso ocurrió con el par 67/76. Para el par 20/12 el análisis comparativo de las secuencias mostró ambigüedades nucleotídicas distintas y en diferentes posiciones a lo largo de la región amplificada *gag-pro*, que sin embargo, pertenecían al mismo paciente en distintos puntos en el tiempo.

Una vez conocido el par 67/76 se hizo un análisis particular de los parámetros clínicos y de mutaciones. El paciente presentó progresión de la enfermedad reflejada en la disminución de la cuenta de linfocitos T CD4+ (primera toma 239 células/ μ L, toma subsecuente 115 células/ μ L) y un repunte considerable en la carga viral (45,450 copias/ μ L iniciales, >100,00 copias/ μ L posteriores). Se observó en el genotipo del virus circulante la acumulación de una mutación mayor de resistencia en *pol* (Tabla 6.3). Se debe tomar en cuenta, sin embargo, que se desconoce qué otros factores inmunes o de tratamiento antirretroviral poseía el paciente. Con el par 01/52 no se contó con los parámetros clínicos que apoyaran la misma idea, el número de mutaciones mayores de resistencia se mantuvo.

Tabla 6.2. Características de los pares de pacientes que surgieron por el análisis filogenético de la cohorte.

ID. Paciente	Mutaciones asociadas a resistencia en proteasa*	# Mutaciones mayores	Carga viral**	CD4+
1	L10F, L10V, I13V, K20R, L33I, M36I, K43T, M46I, I54V, A71V, I84V, N88D, L90M	5	NA	NA
52	I13V, K20R, L33I, M36I, M46I, I54V, A71V, I84V, N88D, L90M	5	31,485	110
67	L10I, I13V, K20R, L33F, M36I, M46I, I54A, A71V, V82T	3	45,450	239
76	L10I, L10V, I13V, K20R, L33F, M36I, M46I, M46L, I54A, A71V, V82T	4	>100000	115

*Se resaltan las mutaciones mayores de resistencia en cada paciente, de acuerdo a la base de datos en línea de la Universidad de Stanford: HIV drug resistance database <http://hivdb.stanford.edu/DR/PIResiNote.html> **NA - No disponible.

Una vez conocida la información anterior, se hizo el reajuste en cuanto al número de pacientes incluidos, tomando en cuenta las 74 secuencias únicas en estudio. Se muestra en la siguiente tabla el desglose los pacientes incluidos.

Tabla 6.3. Desglose de mutaciones menores y mayores de resistencia a IPs y parámetros clínicos de los 74 pacientes incluidos en el estudio.

ID. Paciente*	Mutaciones asociadas a resistencia en proteasa **	# Mutaciones mayores	Carga viral***	CD4+
2	L10F, D30N , M36I, K45R, N88D	2	2,226	388
3	I13V, K20M, L24I, L33F, M36V, F53L, I54V, V82S	2	73,073	211
4	L10I, K43T, I54V, A71T, V82A	2	4,413	123
5	L10I, K43T, M46I, I54A, A71V, V82A	3	833	376
6	L10I, K20R, M36I, M46I, F53L, I54V, A71V, G73T, V82A, L90M	4	51,707	272
7	L10F, I13L, M36L, M46I, I54V, V82A	3	136,416	95
8	L10I, K20R, V32I, L33F, M36L, M46I, I47V, I54M, A71V, V77I, V82A	5	NA	NA
9	L10I, I13V, M36V, I54L, A71V, V77I, N88S	2	72,521	457
10	L10I, V32I, K43T, K45R, M46I, I47A, A71V, V82T, L90M	5	71,356	NA
11	L10I, I13V, V32I, M46I, I47A, V77I, V82A	4	177,343	63
12	L10I, I13V, I54V, Q58E, A71I, A71V, V77I, I84V, L90M	3	24,478	42
13	L10F, I13V, L33I, E35G, M36I, I66F, A71T, G73S, I84V, L90M	2	40,564	115
14	L10I, L33F, M46I, I54V, A71V, G73T, V77I, V82A, L90M	4	6,766	74
15	A71T, V77I, L90M	1	NA	NA
16	L10I, M36V, G48V, F53L, I54V, V82A, L90M	4	23,380	375
17	L10F, I54V, A71I, V77I, V82A	2	176,730	34
18	L10I, L33F, G48V, A71V, V82A, L90M	3	53,980	257
19	L10I, L33F, M46I, I54V, A71V, G73T, V77I, V82A	3	19,048	196
20	L10I, V11I, A71I, A71V, I84V, L90M	2	793,286	22
21	M36L, K45I, I54V, Q58E, A71V	1	50,997	145
22	L10F, L33F, M46I, I54V, A71V, G73S, V77I, I84V, L90M	4	18,792	368
23	L10F, L33F, I54V, A71T, G73S, V77I, V82A, L90M	3	57,133	NA

25	L10I, A71V, V77I, N88D	1	28,265	254
26	M36I, I54V , A71V, G73S, V82A , L90M	3	NA	NA
28	L10I, L33F, M36I, K43T, M46I , I54V , V82F , L90M	4	162,965	181
29	K20R, L33I, M36I, K45R, I54V , A71I, N88S , L90M	3	3,083	433
30	A71I, V77I, L90M	1	5,213	272
31	L33F, I50L , A71V, G73S	1	6,700	382
32	L10I, Q58E, A71I, G73S, I84V , L90M	2	211,529	352
33	M46I , I54V , N88D , L90M	4	115,723	368
35	L10F, L33F, M46I , I54V , A71V, V82A , L90M	4	31,202	253
36	D30N , K45R, N88D	2	1,467	172
37	L10I, L33F, K43T, M46L , G48V , I54V , V82A , I84V , T91S	5	6,638	342
38	K20R, M36I, M36V, M46I , I50L, I54V , V77I, L90M	3	4,024	NA
39	M36I , A71T	0	117,948	103
40	L10I, I54V , A71V, G73S, V77I, L90M	2	81,579	88
41	L10I, M46I , I54V , A71T, V82A	3	109,330	NA
42	L10I, K20R, L33F, M36I, I47V , F53L, I54V , Q58E, A71V, V82A , L90M	4	1,326	257
43	K20R, M36I, M46I , F53L, I54V , A71V, V77I, V82F , L90M	4	40,566	NA
44	L10I, A71V, G73S, V77I, L90M	1	41,127	73
45	L10F, D30N , I54L , A71T, V77I, N88D	3	NA	NA
46	L10I , A71T , V77I	0	74,171	204
47	I54V , A71V, G73S, G73T, I84V , L90M	2	20,840	277
48	L10I, L10V, L33F, K43T, M46I , I54A , A71V, V82T	3	1,791	321
49	L10V, I13V, M46I , A71T, V77I, I84V , N88D , L90M	4	84,213	12
50	L10V, K20R, M36I, M46I , I50L , F53L, V77I, L90M	3	6,050	484
51	L10V, K20R, M36I, M46L , I54V , Q58E, V82A	3	13,125	417
52	I13V, K20R, L33I, M36I, M46I , I54V , A71V, I84V , N88D , L90M	5	31,485	110
53	M46L , G48V, I54A , A71I, V77I, V82A	3	22,733	117
54	I13V, L33I, M36I, K45R, I54V , A71V, G73S, V77I, L90M	2	8,158	82
55	L10I, I13V, K20R, M36I, V82A	1	286,873	100
56	L33F, K43T, M46L , I54V , A71V, G73S, V82A , L90M	4	NA	NA
57	K20R , M36I , M36L , A71V , V77I	0	247,949	235
58	L10I, M36I, A71T, L90M	1	27,084	249
59	L10I, I13V, M46I , Q58E, V77I, L90M	2	28,637	70
61	L10F, M46I , F53L, A71V, T74P, I84V , L90M	3	8,452	210
62	L10V, I13V, L33F, M36L, M46L , I54V , I66F, A71I, A71T, V82T , N83D , L90M	4	11,512	240
63	L10I, A71V, I84V	1	10,905	295
64	L10V, I13V, D30N , L33F, M46I , F53L, V77I, I84V , N88D , L90M	5	383,965	78
65	L10F, M36I, M46I , I54V , A71V, G73S, V82T , L90M	4	>100000	NA
67	L10I, I13V, K20R, L33F, M36I, M46I , I54A , A71V, V82T	3	45,450	239
68	L10I, A71V, T74P, I84V , L90M	2	6,030	287
69	L10F, K20R, M36I, M46I , I54V , Q58E, H69K, G73T, I84V , L90M	4	30,200	NA
70	L10I, I13V, L33F, M46L , F53L, I54V , A71V, T74P, V77I, V82A , L90M	4	89,100	344
71	L10F, D30N , M36I, K45R, V77I, N88D	2	608,000	NA
72	L10F, I13V, L33F, K43T, M46I , I54V , A71V, V82A , L90M	4	673,000	NA
73	I54V , A71V, V77I, V82A , L90M	2	543,000	45
74	L10I, I13V, K20R, M36L, K45R, A71T, V77I, N88D	1	1,068	984
75	L10I, K20M, M36I, A71T, L90M	1	23,900	507
77	L10I, K20R, L33I, M36I, G48V , A71T, G73S,	2	18,394	851

	L90M			
78	L10V, L33F, G48V , I54S, A71V, V82A , L90M	3	>100000	NA
79	L10R, L23I, V32I, K43T, N88S , T91S	1	119,881	441
80	L10V, I13V, K20R, L24I, L33F, M36I, K43T, M46L , I54V , I66F, A71V, T74P, V82T , I84V , T91S	4	54,100	305
81	L10I, M46I , F53L, I54V , A71I, G73T, V77I, V82F, L90M	3	18,470	98

*Se muestra en texto resaltado a los tres pacientes que no poseen mutaciones mayores de resistencia. **El número de mutaciones mayores resaltadas de acuerdo a la base de datos en línea de la Universidad de Stanford: HIV drug resistance database <http://hivdb.stanford.edu/DR/PIResiNote.html>[37] ***NA – No disponible.

Con la finalidad de asociar características clínicas y demográficas de los pacientes con la presencia de posibles agrupaciones genéticas de los virus analizados, se exploraron manualmente los árboles filogenéticos construidos. En primer lugar, se resaltaron en el árbol filogenético las secuencias de aquellos pacientes que poseían cargas virales menores a 10,000 copias de RNA / mL (Figura 6.2), con el objeto de buscar similitudes en virus con capacidades replicativas similares en presencia de falla al tratamiento antirretroviral.

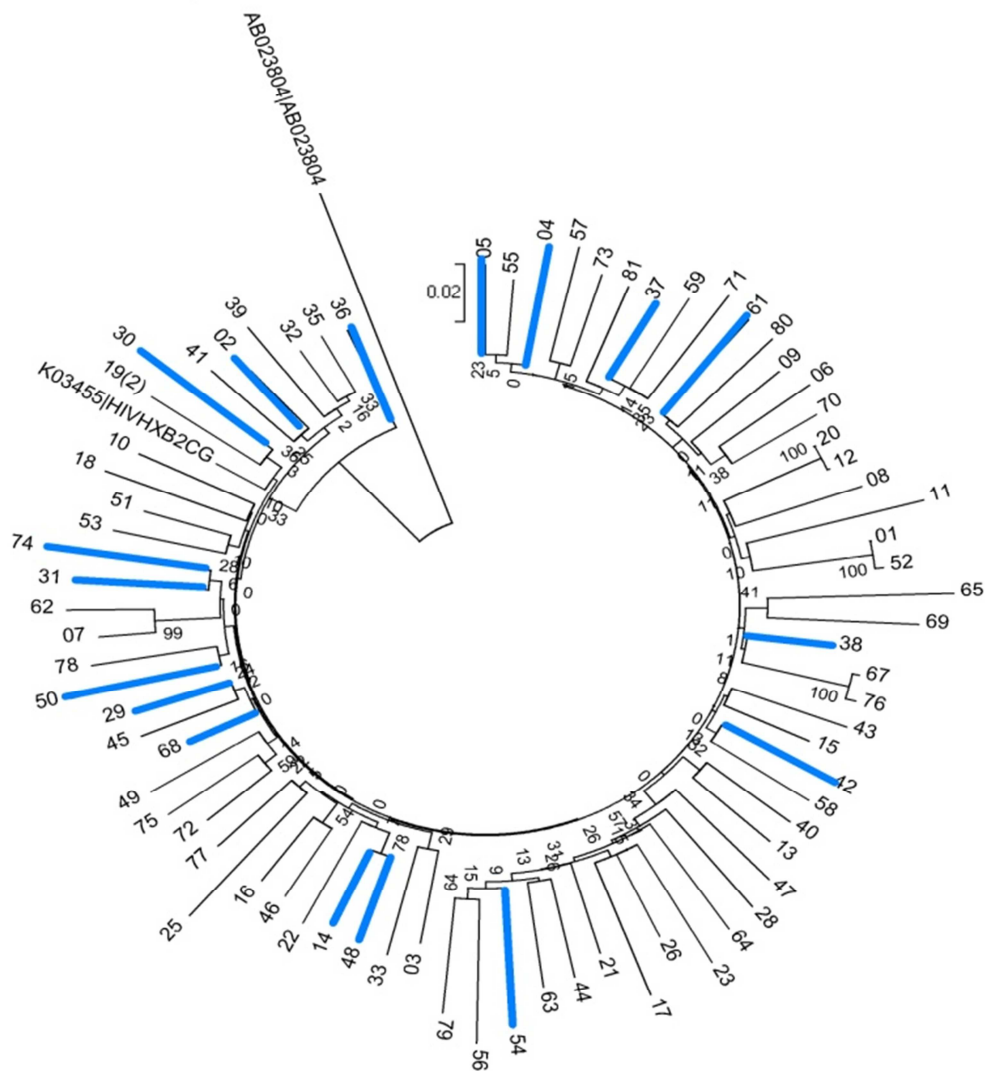


Figura 6.2 Árbol filogenético para la región *gag-pro* de los virus de los pacientes incluidos en el estudio. Cargas virales <math>< 10,000\text{ copias}/\mu\text{L}</math>. Se resaltan en azul las secuencias de pacientes con CV <math>< 10,000</math>, con un total de 17 pacientes. El árbol se realizó por el método de Máxima Verosimilitud, con el modelo GTR. La confiabilidad del árbol se evaluó con 1000 réplicas de bootstrap.

Se identificaron pares de secuencias como 14 y 48 con un valor de bootstrap de 78. El paciente 14 presentó las mutaciones mayores de resistencia en proteasa V82A, L90M, M46I, I54V y el paciente 78 las mutaciones L90M, V82A, G48V, teniéndose una concordancia en las mutaciones L90M y V82A. Se observó el par 74-31 sin soporte de bootstrap, ambos pacientes poseen sólo una mutación mayor de resistencia que no es compartida.

El segundo parámetro que se utilizó para la búsqueda de cercanía genética, fue el valor de cuenta de linfocitos T CD4+. Se resaltaron las secuencias de

los virus de pacientes con valores de conteos de linfocitos T CD4+ mayores a 200 células/ μ L y de los pacientes que tuvieran conteos de linfocitos T CD4+ menores a 100 células/ μ L (Figura 6.3). Siendo pacientes con falla al tratamiento, valores más altos de conteos de linfocitos T CD4+ podrían asociarse a menor tiempo de evolución viral y valores bajos a un mayor tiempo de replicación y evolución viral, con el consecuente daño al sistema inmunológico.

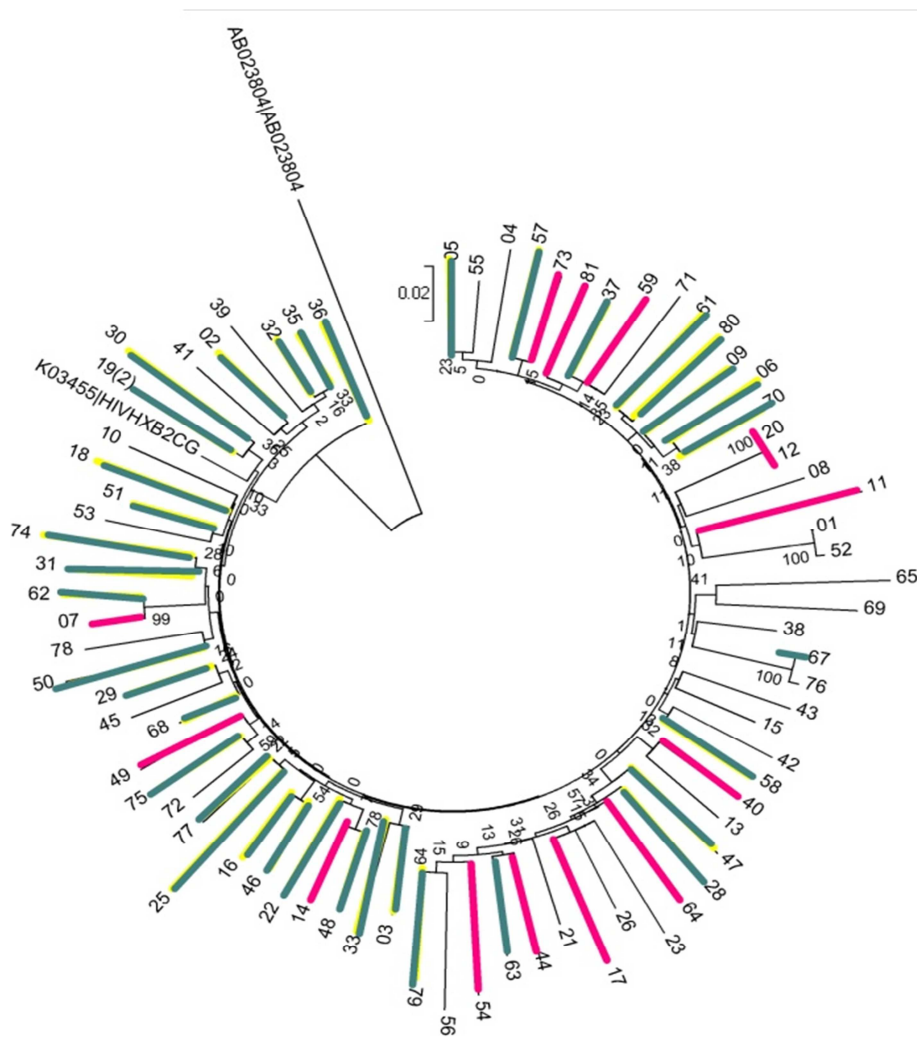


Figura 6.3 Árbol filogenético para la región *gag-pro* de los virus de los pacientes incluidos en el estudio. CD4+ >200 células/ μ L y CD4+ <100 células/ μ L. En rosa se indican los pacientes con conteos de linfocitos T CD4+ menores a 100 células/ μ L, en verde, pacientes con cuentas de linfocitos T CD4+ >200 células/ μ L. El árbol se realizó por el método de Máxima Verosimilitud, con el modelo GTR. La confiabilidad del árbol se evaluó con 1000 réplicas de bootstrap.

En general se pudieron observar algunos agrupamientos de secuencias de virus de pacientes con conteos de linfocitos T CD4+ más altos, resaltando los

clusters de las secuencias 61, 80, 09, 06, 70 y el de las secuencias 77, 25, 16, 46, 22, 48; así como los pares 33-03, 31-74, 30-19 y 32-35; aunque en la mayoría de los casos, las agrupaciones no fueron soportadas por valores de bootstrap altos (Figura 6.3).

El último enfoque se hizo desde el punto de vista mutacional. Se identificaron a los pacientes que poseyeran en su genotipo un número de mutaciones mayores de resistencia a IPs superior a cuatro (Figura 6.4). Este criterio podría permitirnos observar virus con mayor tiempo de evolución en presencia de un régimen de tratamiento subóptimo.

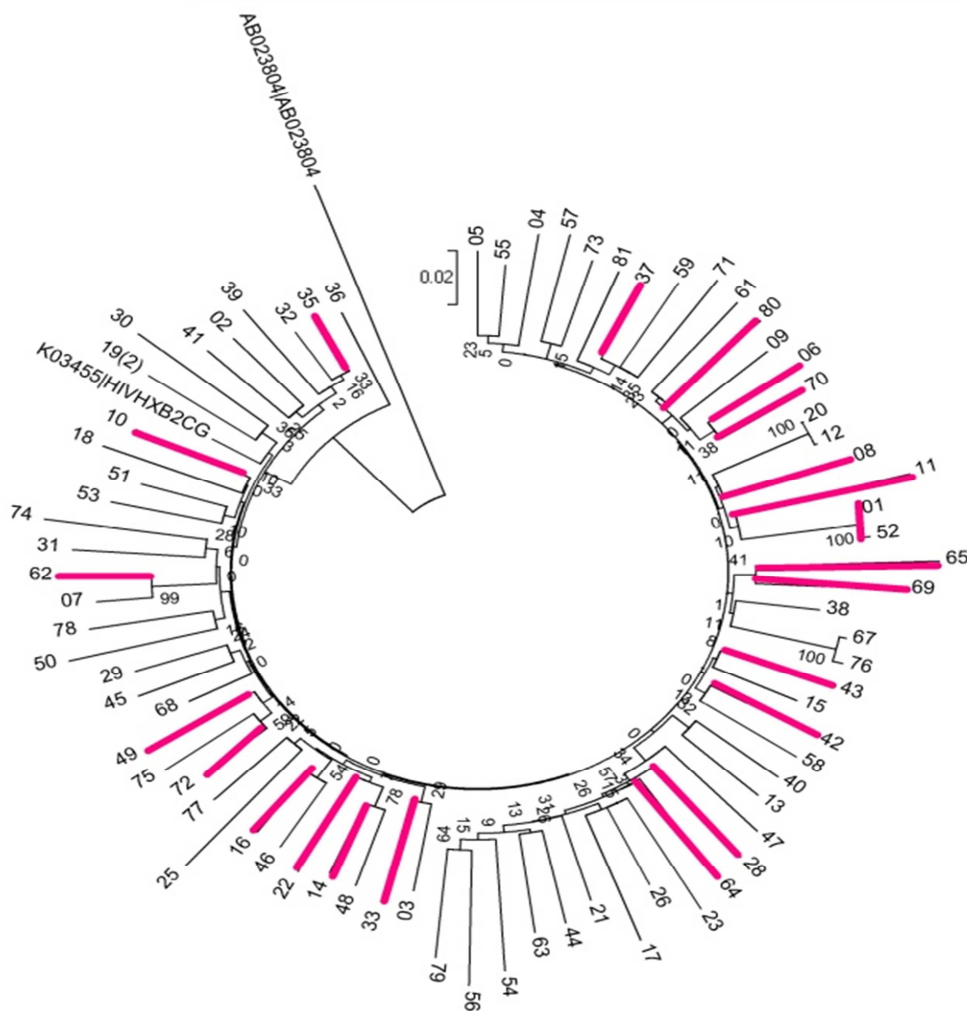


Figura 6.4 Árbol filogenético para la región *gag-pro* de los virus de los pacientes incluidos en el estudio de mutaciones de resistencia en *pol*. Se muestran en rosa las secuencias de los virus con más de 4 mutaciones mayores de resistencia a IPs. El árbol se realizó por el método de Máxima Verosimilitud, con el modelo GTR. La confiabilidad del árbol se evaluó con 1000 réplicas de bootstrap.

En general las secuencias de los virus con alto número de mutaciones mayores a IPs se encontraron intercaladas en el árbol filogenético generado. Se observaron solo algunos pares de secuencias sin soporte de bootstrap (e.g. 06-70 y 69-65) Ver Figura 6.4.

En conjunto, los resultados de los análisis filogenéticos demuestran que se trató de una cohorte homogénea sin indicios de agrupación genética geográfica o por parámetros clínicos que pudieran apreciar secuencias con una evolución semejante. Se identificaron sólo algunos pares de secuencias en los árboles mostrados aunque sin un buen soporte de bootstrap.

6.3 COMPARACIÓN DE VARIABILIDAD POR ENTROPÍA DE SHANNON.

Dado que el precursor Pr55^{gag} es procesado por la proteasa viral y dado que este sustrato presenta una respuesta adaptativa al uso de inhibidores de proteasa, se buscó hacer una comparación global de la variabilidad de las secuencias del gen *gag* en la corte de estudio, caracterizada por la presencia de mutaciones de resistencia a IPs, comparando con secuencias del gen *gag* de una cohorte de pacientes vírgenes a tratamiento (n=200), provenientes del banco de secuencias del grupo de Evolución Molecular del VIH del Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (Alva-Selma, trabajo de tesis “Impacto de mutaciones en el gen *gag* en la capacidad replicativa del VIH en el contexto inmunogenético de la población mexicana”) [72]. Este análisis permitió analizar la evolución viral en presencia de la presión selectiva adicional que ejerce el tratamiento antirretroviral sobre el virus. Para el análisis de variabilidad se utilizó la variable matemática entropía de Shannon, cuyas características se describen en la sección de Metodología.

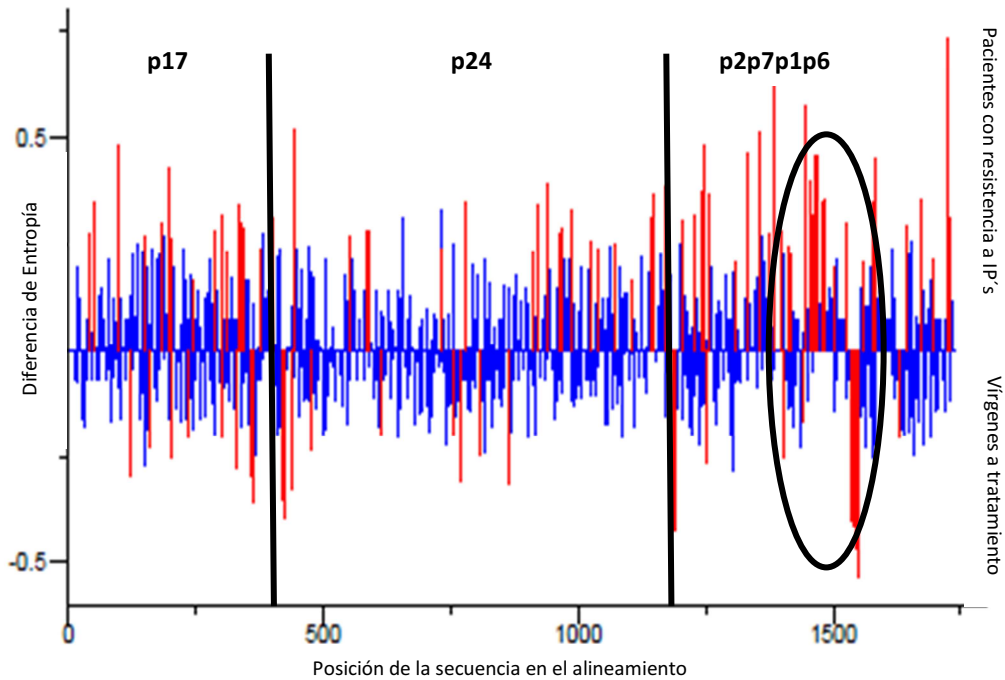


Figura 6.5. Diferencia de Entropía en el gen *gag* de virus de pacientes con resistencia a IPs y pacientes vírgenes a tratamiento. Todas aquellas posiciones en las que el valor de entropía es positivo, representan sitios del gen *gag* con mayor variabilidad en pacientes con falla a IPs. Las posiciones en las que el valor de entropía es negativo representan sitios del gen *gag* con mayor variabilidad en pacientes vírgenes a tratamiento. Las posiciones que se resaltan en color rojo son aquellas posiciones en las que la diferencia de entropía es significativa para cualquiera de las dos cohortes ($p < 0.05$). Los análisis de entropía se realizaron con la herramienta en línea de estimación de entropía de Shannon en la Base de Datos de VIH de Los Álamos. Se utilizaron 74 secuencias de pacientes con falla a IPs y 79 secuencias de pacientes vírgenes a tratamiento.

Se observó un mayor número de posiciones en *gag* con variabilidad significativamente mayor en virus de pacientes con resistencia a IPs (Figura 6.5). La mayoría de las posiciones con diferencia significativa en entropía de Shannon se observaron hacia la porción final de *gag* p2p7p1p6 en los pacientes con resistencia, con un mayor número de posiciones significativas en la proteína p6. Estos resultados en conjunto, sugieren que Gag presenta evolución y adaptación en presencia de la presión ejercida por IPs reflejada en una mayor variabilidad global. Es la porción final de la proteína la que presentó una mayor variabilidad sugiriendo que es esta región en donde se concentra la mayor respuesta evolutiva del virus.

6.4 DESCRIPCIÓN DE LA VARIABILIDAD DE LOS MOTIVOS DE CORTE DEL GEN *gag* EN LA COHORTE DE ESTUDIO.

Como siguiente paso, se analizó la variabilidad de los sitios de corte de la proteasa a lo largo de la poliproteína Gag en los virus de los pacientes con resistencia a IPs. Estos sitios, al ser blanco directo de la actividad de la proteasa viral, estarían influenciados directamente por la presión selectiva asociada al uso de inhibidores de proteasa. La variabilidad observada en las secuencias de la cohorte de estudio se comparó con la previamente descrita en la literatura para pacientes vírgenes a tratamiento antirretroviral [31], y la observada en secuencias de una cohorte mexicana de referencia constituida por pacientes vírgenes a tratamiento antirretroviral del banco de secuencias del Grupo de Evolución Molecular del VIH del CIENI, INER (n=80) (Figura 6.6).

HXB2	MA					//	CA				
	V	S	Q	N	Y		P	I	V	Q	N
Posición	128	129	130	131	132		133	134	135	136	137
% Variación cohorte de referencia	3.5	*	4.3	*	3.5		*	*	0.9	0.9	*
% Variación vírgenes a TAR	8.7	*	3.7	*	6.3		*	2.5	*	1.3	1.3
% Variación resistencia a IPs	18.9	2.7	12.2	1.35	6.76		*	*	6.8	2.7	*

HXB2	CA					//	p2							
	K	A	R	V	L		A	E	A	M	A	Q	V	T
Posición	359	360	361	362	363		364	365	366	367	368	369	370	371
% Variación cohorte referencia	0.2	0.2	1.8	11.5	1.2		*	*	*	*	1.2	4.1	24.8	16.4
% Variación vírgenes a TAR	*	*	*	8	1.3		*	1.3	*	*	5.3	6.7	33.3	14.7
% Variación resistencia a IPs	2.7	*	8.11	14.9	4.1		*	1.4	1.4	*	5.4	13.5	35.1	12.2

HXB2	p2					//	NC				
	S	A	T	I	M		M	Q	R	G	N
Posición	373	374	375	376	377		378	379	380	381	382
% Variación cohorte de referencia	36.3	32.6	42.7	23.6	1.8		5.5	*	40.9	5.5	2.1
% Variación vírgenes a TAR	42.7	32	61.3	16	*		*	*	33.3	8	2.7
% Variación resistencia a IPs	63.5	54.1	66.2	29.7	1.4		4.1	2.7	41.9	1.4	*

HXB2	NC					//	p1				
	E	R	Q	A	N		T	L	G	K	I
Posición	428	429	430	431	432		433	434	435	436	437
% Variación cohorte de referencia	2.3	3.5	*	0.5	*		*	0.1	*	6.3	5.5
% Variación vírgenes a TAR	6.67	4	2.67	1.33	*		*	*	*	8	8
% Variación resistencia a IPs	13.5	4.1	*	29.7	*		*	*	1.35	21.6	14.9

HXB2	p1					//	p6				
	R	P	G	N	T		L	Q	S	R	P
Posición	444	445	446	447	448		449	450	451	452	453
% Variación cohorte de referencia	*	0.1	*	*	*		9.1	*	22.8	*	8.4
% Variación vírgenes a TAR	*	*	2.7	*	1.33		10.7	*	34.7	9.33	12
% Variación resistencia a IPs	2.7	*	1.4	*	2.7		23	*	20.3	4.1	29.7

Figura 6.6. Comparación de la variabilidad de los motivos de corte a lo largo de Gag en secuencias de pacientes con resistencia a IPs y pacientes vírgenes a tratamiento antirretroviral. Las celdas en color rosado resaltan las posiciones en las que se observó mayor variabilidad en secuencias de pacientes con resistencia a IPs. Las celdas en color azul resaltan las posiciones en las que la variabilidad fue mayor en secuencias de pacientes vírgenes a tratamiento. Se muestran los aminoácidos consenso de las posiciones adyacentes a los sitios de corte de la secuencia de referencia HXB2. Se compara la variabilidad entre pacientes con resistencia a IPs del CIENI, INER (n=74), pacientes vírgenes a tratamiento antirretroviral del CIENI, INER (n=80) y variabilidad en cohorte de referencia de pacientes vírgenes a TAR de acuerdo a lo reportado por Fun et al [31]. *Indica posiciones en donde no hay variación del aminoácido.

Se observó claramente una diferencia en el grado de polimorfismo de las posiciones adyacentes a los 5 motivos de corte a lo largo del precursor Pr55^{gag} en las secuencias de pacientes con falla a IPs con respecto a pacientes vírgenes a tratamiento antirretroviral. En general, el grado de polimorfismo resultó mayor para pacientes con previa exposición a IPs, con respecto a pacientes vírgenes a tratamiento antirretroviral (Figura 6.6). El motivo de corte que resultó más polimórfico fue p2-NC con una variación que superó el 30% en la secuencia de aminoácidos para varias posiciones. Existen algunas posiciones a lo largo de la poliproteína que previamente se han reportado como sitios altamente conservados[31, 49] La mayoría de estas posiciones se mantuvieron conservados o presentaron una muy baja incidencia de variación tanto en pacientes vírgenes a tratamiento como en pacientes con falla a IPs, e.g. P133, A364, A366, M367, N432, T433, N447, Q450, T448 (Figura 6.6).

Así mismo, en algunas de las posiciones que se reportan como altamente conservadas, se observó un aumento importante en el porcentaje de variación de los pacientes con resistencia a IPs, e.g. V135 con un 6.8% en pacientes con falla a IPs, respecto al 0.9% reportado en pacientes vírgenes a TAR, R361 con un 8.11% de variación respecto al 1.8% reportado, E428 con un 13.5% en comparación con el 2.3% reportado [31].

Se notó una variación favorecida especialmente hacia la porción final del gen, p2p7p1p6, donde existió un mayor número de posiciones con diferencias altas entre pacientes vírgenes a tratamiento y con falla a IPs (últimos tres motivos de corte, e.g. S373, A374, I376 E428, A431, K436, I437, L449, P453 (Figura 6.6).

Las posiciones A431, K436, I437 en el motivo NC/p1y L449 en el motivo p1-p6 ya han sido asociadas con el uso de IPs y representan mutaciones que contribuyen al desarrollo de resistencia a IPs o compensan las fallas replicativas [31, 42, 45, 62].

Estos resultados, en concordancia con los resultados mostrados por el análisis de entropía de Shannon, muestran que los virus que han sido previamente expuestos a IPs presentan una respuesta adaptativa a la presión por los fármacos, reflejada en una mayor variación. Esta variación asociada a la evolución del virus en presencia de IPs es especialmente importante en los sitios blanco de la proteasa viral en la poliproteína Gag, en especial hacia la porción final p2p7p1p6.

6.5 ANÁLISIS DE MUTACIONES DE RESISTENCIA EN *pol* Y DE MUTACIONES PREVIAMENTE ASOCIADAS AL USO DE INHIBIDORES DE PROTEASA EN *gag* EN LOS VIRUS DE LA COHORTE EN ESTUDIO.

Una vez estudiada la variabilidad general de las secuencias de los virus expuestos a IPs en comparación con virus de pacientes vírgenes a tratamiento, y caracterizado el aumento en la variabilidad en los sitios blanco específicos de la proteasa viral en Gag de virus expuestos a IPs, se prosiguió con un análisis comprensivo de mutaciones previamente asociadas al uso de IPs tanto en el gen *pol* como en el gen *gag* de los virus de pacientes con resistencia a IPs.

6.5.1 MUTACIONES MAYORES DE RESISTENCIA A INHIBIDORES DE PROTEASA EN EL GEN *pol*.

Con la finalidad de establecer el patrón de mutaciones mayores de resistencia a IPs en el contexto de los pacientes mexicanos del CIENI, INER, se calcularon las frecuencias de mutaciones previamente asociadas al desarrollo de resistencia en los virus de los pacientes de la cohorte en estudio a partir de secuencias de *pol* previamente obtenidas como parte del seguimiento de los pacientes participantes en el estudio (Figura 6.7).

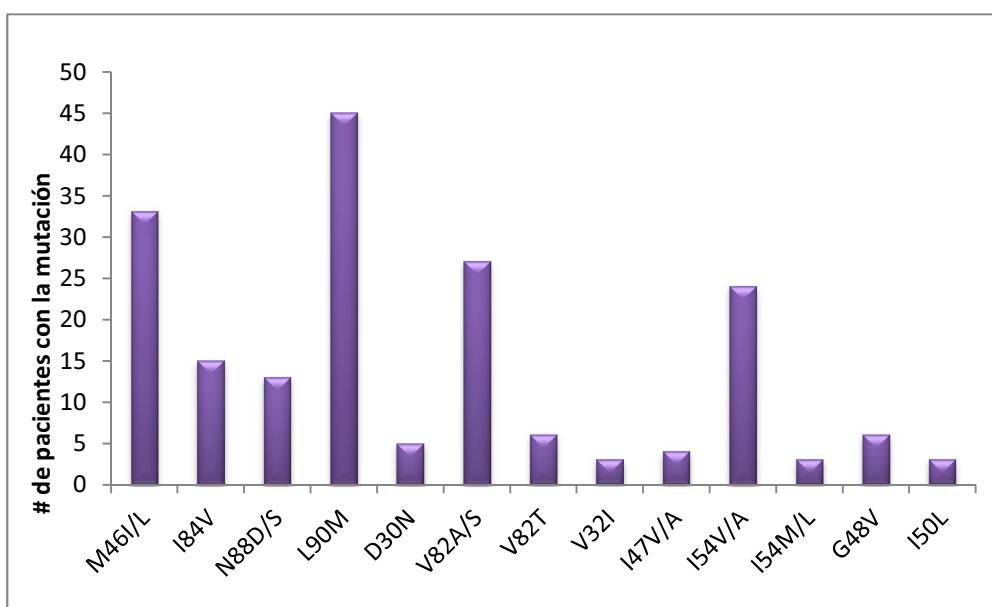


Figura 6.7. Frecuencia de aparición de mutaciones mayores de resistencia a Inhibidores de Proteasa en el gen de la proteasa viral de los virus de los pacientes de la cohorte en estudio. Se muestran las frecuencias de las mutaciones mayores a IPs previamente descritas (ref), para una cohorte de 74 pacientes con falla a regímenes de tratamiento conteniendo IPs.

La mutación L90M fue la de mayor frecuencia en la cohorte de pacientes con resistencia a IPs (Figura 6.7). La segunda mutación en frecuencia fue M46I/L, seguida de V82A/S e I54V/A. Teniendo en cuenta que el esquema de tratamiento que se utiliza con mayor frecuencia en el CIENI es Lopinavir/ritonavir (LPV/r) y dado que en concordancia con el inhibidor de proteasa que se utilice, se han descrito vías de desarrollo de mutaciones de resistencia [37] se ha reportado el patrón de mutaciones en respuesta al uso de LPV en las posiciones 82, 54 y 46. Notoriamente este es el conjunto de mutaciones que resultó más frecuente en los pacientes. La mutación L90M sin

embargo, no se ha reportado como mutación seleccionada por el uso de Lopinavir y aporta poca resistencia, pero en conjunto con otras mutaciones, incrementa notoriamente el nivel de resistencia [37]. La mutación M46I/L cobra importancia con el surgimiento de la mutación compensatoria y de resistencia A431V, en Gag [31, 63-65].

6.5.2 FRECUENCIA DE APARICIÓN DE MUTACIONES ASOCIADAS A LA EXPOSICIÓN A IPs EN EL GEN *gag*.

A continuación se buscaron, en la cohorte de pacientes con resistencia a IPs, mutaciones previamente asociadas con resistencia a IPs en el sustrato de la proteasa viral, Pr55^{gag}. Para tal fin, se realizó una lista de todas las mutaciones en Gag, con evidencia de asociación al uso de IPs, clasificando cada mutación de acuerdo al tipo de evidencia que la asocia a la exposición a este grupo de fármacos (Tabla 6.6) y se evaluó la frecuencia de cada mutación. Estas frecuencias se compararon con las observadas en virus de una cohorte de pacientes mexicanos vírgenes a tratamiento antirretroviral del banco de secuencias del Grupo de Evolución Molecular del VIH del CIENI, INER (n=80). Las frecuencias de mutaciones asociadas a IPs en pacientes vírgenes a tratamiento y con resistencia a IPs se compararon mediante pruebas exactas de Fisher, en los casos en que la diferencia de porcentaje entre las cohortes fuese alta (Tabla 6.7).

Tabla 6.4. Código de colores que indica el tipo de asociación de cada mutación reportada al uso de IPs.

Asociación de la mutación en <i>gag</i> frente a la exposición a IPs*
in vitro
in vivo
in vivo / in vitro
in vivo / in vitro, asociado a resistencia a inhibidores de proteasa
in vivo, asociado a resistencia a inhibidores de proteasa
in vivo, asociado a resistencia a inhibidores de maduración
in vitro, asociado a resistencia a inhibidores de maduración.

*Obtenida de [31]

Tabla 6.5. Lista de mutaciones en la región *gag-pro* que han sido previamente asociadas al uso Inhibidores de Proteasa y su prevalencia en pacientes con resistencia a IPs y vírgenes a tratamiento antirretroviral.

	% Pacientes con resistencia a IPs	% Vírgenes a tratamiento.	Valor p*
MA			
E12K	28.38	32	NA
G62R	2.70	2.67	NA
L75R	0	0	NA
Y79T	0	0	NA
T81A	5.41	2.67	p=0.442
K112E	0	0	NA
CS MA/CA			
V128T/I	8.11	1.33	p=0.0630
Y132T	0	0	NA
CA			
M200I	0	4	p=0.245
H219Q/P	28.38	24.00	NA
CS CA/p2			
A360V	0	0	NA
V362I	10.81	6.67	p=0.401
L363M/T/C/Y/N	4.05	0	p=0.120
S368C/N	2.70	2.67	NA
p2			
Q369H	6.76	1.33	p=0.116
V370A/M	27.03	20	p=0.39
T371del	5.41	2.67	p=0.442
CS p2/NC			
S373P/Q/T	36.49	37.33	NA
A374P/S	5.41	4.00	NA
T375N/S	21.62	41.33	p=0.0133
I376V	12.16	9.33	NA
G381S	1.35	6.67	p=0.209
NC			
I389T	17.57	20	NA
V390A/D	0	0	NA
I401T/V	4.05	1.33	p=0.367
R409K	0	0	NA
CS NC/p1			
E428G	5.41	5.33	NA
Q430R	0	1.33	NA
A431V	27.03	1.33	p=2.47E-06
K436E/R	12.16	8.00	p=0.428
I437T/V	10.81	0	p=0.0030
CS p1/p6 gag			
L449T/P/V	12.16	9.33	NA
S451T/G/R	4.05	4.00	NA
R452S/K	0	0	NA
P453A/L/T	24.32	12.00	p=0.0580
p6 gag			
E468K	0	1.33	NA
Q474L	0	0	NA
A487S	4.05	4.00	NA
P497L	1.35	0	NA

p6 pol			
V484G/I/P/S	9.46	-	NA
CS TFP/p6 pol			
D437N	67.57	-	NA

El código de colores corresponde al definido en la Tabla 6.6. Comparación entre la cohorte de pacientes con resistencia a IPs n=74 y pacientes vírgenes a tratamiento n=80. NA. No aplica dada la ausencia de la mutación en ambas cohortes o bien, a la cercanía en porcentajes en ambos grupos de comparación. *Obtenidos por prueba exacta de Fisher. Valores con significancia estadística resaltados en rojo ($p < 0.05$). CS del inglés clavage site. TFP del inglés Transframe Poliprotein.

Se observaron dos mutaciones con frecuencias significativamente mayores en pacientes con resistencia a IPs: A431V e I437T/V ($p < 0.05$, Tabla 6.5). Ambas mutaciones han sido previamente asociadas a resistencia a IPs (Tabla 6.4). Las mutaciones V128T con $p = 0.0630$ y P453A/L/T con $p = 0.0580$ y ambas también asociadas a resistencia a IPs, mostraron tendencia a la significancia. Sólo una de las mutaciones se encontró con frecuencia significativamente mayor en los pacientes vírgenes a tratamiento: T375N/S ($p < 0.05$, Tabla 6.5).

Para obtener una mejor visualización tanto de la frecuencia de aparición así como de la diferencia de porcentajes entre las cohortes, se hizo un gráfico resumiendo la información de la Tabla 6.5. La Figura 6.8 muestra el porcentaje de cada mutación de acuerdo al código de colores establecido, y en correspondencia con su localización dentro de la proteína.

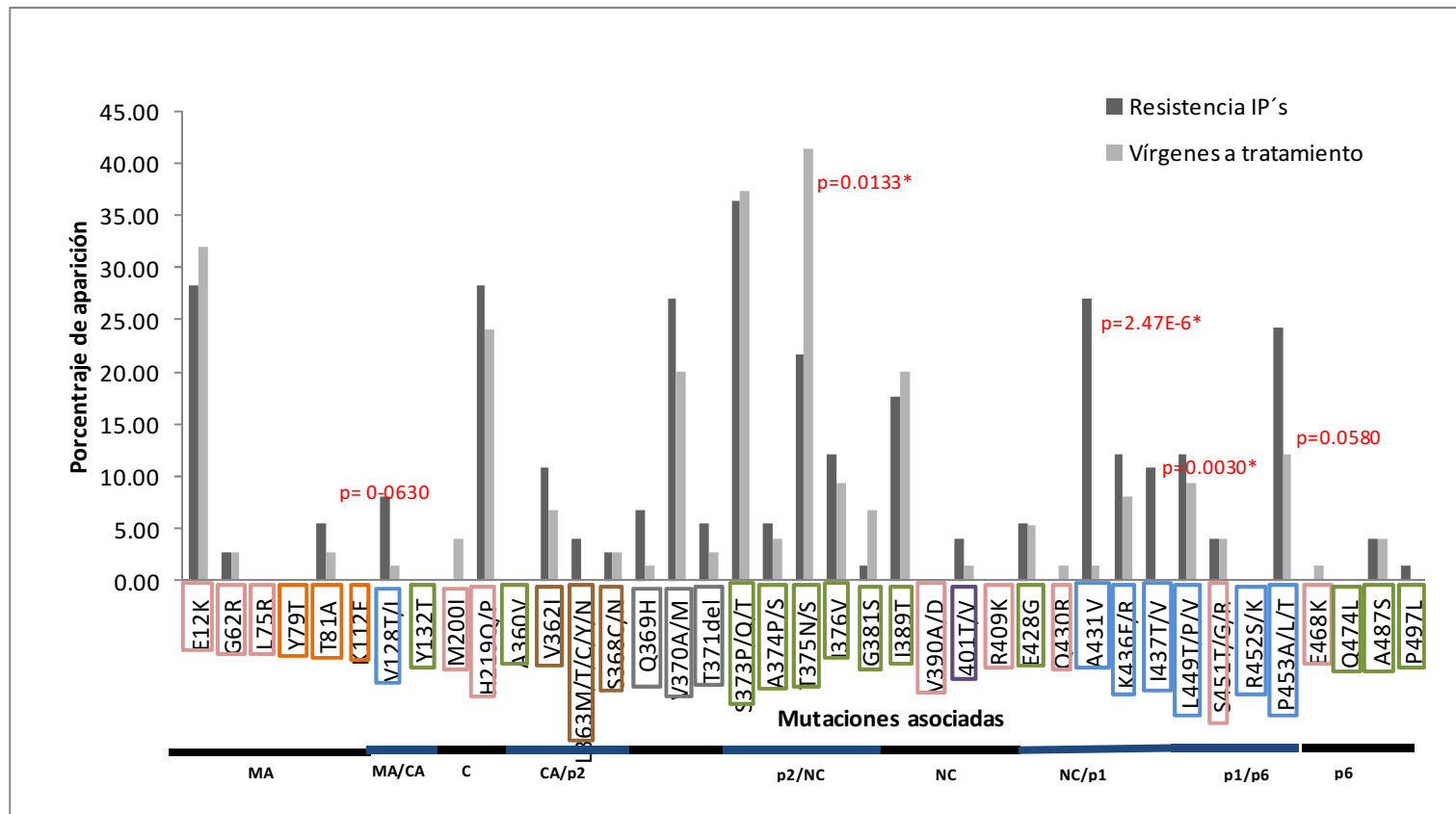


Figura 6.8. Mutaciones seleccionadas en gag por el uso de IPs: Comparación entre pacientes con resistencia a IPs y pacientes vírgenes a tratamiento. La evidencia de asociación al uso de IPs de cada mutación se muestra de acuerdo al código de colores de la Tabla 6.4. Se muestra el valor de p en aquellas mutaciones con frecuencias distintas entre pacientes con exposición a IPs y vírgenes a tratamiento. * indica $p < 0.05$. Se muestra la posición de cada mutación en la proteína (parte inferior de la gráfica).

Se observó que no todas las mutaciones asociadas a evolución en presencia de IPs se encontraron en los pacientes, e.g. L75R, Y79T, K112E, A360V, V390A/D, R409K, R452S/K. Interesantemente, la mayoría de las mutaciones presentaron un nivel basal alto en los pacientes que no se habían sometido al tratamiento antirretroviral y en algunas de ellas el porcentaje de aparición en este grupo fue incluso mayor que en los pacientes con resistencia a IPs, ej E12K (Figura 6.8).

Fueron cinco las mutaciones que presentaron diferencia en frecuencia entre las cohortes: V128T, A431V, I437T/V, P453ALT, T375N/S (Figura 6.8). Cuatro de estas mutaciones (V128T, A431V, I437T/V, P453ALT) tuvieron frecuencias mayores en pacientes con resistencia a IPs. Estas mutaciones han sido previamente reportadas tanto en ensayos *in vivo* como *in vitro* como mutaciones compensatorias que pueden aportar cierta resistencia a IPs por si mismas [39,59, 63, 65] (Tabla 6.5). A excepción de la mutación V128T que se encuentra en Matriz, el resto de las mutaciones se encuentran hacia la porción final del gen, específicamente en los motivos de corte NC/p1 y p1/p6 (A431V, I437T/V, P453ALT). La mutación restante, T375N/S fue más frecuente en pacientes vírgenes a tratamiento antirretroviral ($p=0.0133$). Así mismo, mutaciones como E12K, M200I, S373P/Q/T, G381S, I389T, Q430R, E468K presentaron frecuencias mayores en esta cohorte, aunque sin alcanzar significancia estadística (Tabla 6.5).

Tabla 6.6. Mutaciones que presentaron frecuencias mayores en los pacientes con resistencia a IPs.

Mutación	Tipo asociación con IPs	Posición en el precursor Pr55 ^{gag}
V128T	In vivo/ In vitro, asociado a resistencia a IP's	Matriz
A431V	In vivo/ In vitro, asociado a resistencia a IP's	Motivo de corte NC/p1
I437T/V	In vivo/ In vitro, asociado a resistencia a IP's	Motivo de corte NC/p1
P453A/L/T	In vivo/ In vitro, asociado a resistencia a IP's	Motivo de corte p1/p6

En conjunto estos análisis muestran que existe una correlación entre el inhibidor de proteasa utilizado y las mutaciones seleccionadas en proteasa mostrando un patrón característico de selección que en su conjunto originan un

fenotipo de resistencia. Así mismo, pudieron identificarse mutaciones específicas previamente reportadas en Gag con frecuencias significativas mayores en los pacientes con resistencia a IPs. Sin embargo, pudo observarse también que existen niveles basales altos de ciertas mutaciones asociadas al uso de IPs en pacientes mexicanos vírgenes a tratamiento y que incluso pueden ser significativamente más frecuentes en este grupo como en el caso de la mutación T375N/S.

6.6 SITIOS BAJO PRESIÓN SELECTIVA EN EL GEN *gag*. ANÁLISIS POR MODELOS DE RAZÓN DE SUSTITUCIONES SINÓNIMAS Y NO SINÓNIMAS.

Dada la observación de una mayor variabilidad en las secuencias de los virus de pacientes con resistencia a IPs, así como la identificación de mutaciones específicas previamente asociadas y en respuesta al uso de IPs en este grupo, se realizó un análisis evolutivo de las secuencias para poder identificar a las posiciones que pudieran estar bajo presión selectiva positiva debido al tratamiento, el sistema inmune o a la confluencia de ambas. Para la realización de este análisis, las secuencias se alinearon con respecto a la secuencia de referencia HXB2, utilizando la herramienta Clustal W del software Mega 5.05. El alineamiento se analizó con base en dos marcos de lectura: el marco de lectura para *gag* que tiene como resultado el precursor polipeptídico Pr55^{gag}, y en el marco de lectura en la porción de traslape con *pol* cuya traducción resulta en la proteína de traslape p6* y el inicio de proteasa [66].

Utilizando las secuencias para el marco de lectura del gen *gag*, se realizó la búsqueda de las posiciones que se encontrarán bajo presión selectiva positiva, usando un modelo de evolución de codones basado en la tasa de sustituciones sinónimas (dS) y no sinónimas (dN) disponible en el servidor en línea DataMonkey, utilizando el análisis SLAC (Ver Metodología).

Para tener una primera visualización de las secuencias, a través de la herramienta del servidor, se obtuvo una gráfica con los valores de la diferencia dN-dS en cada codón a lo largo de todas las posiciones del alineamiento (Figura 6.9).

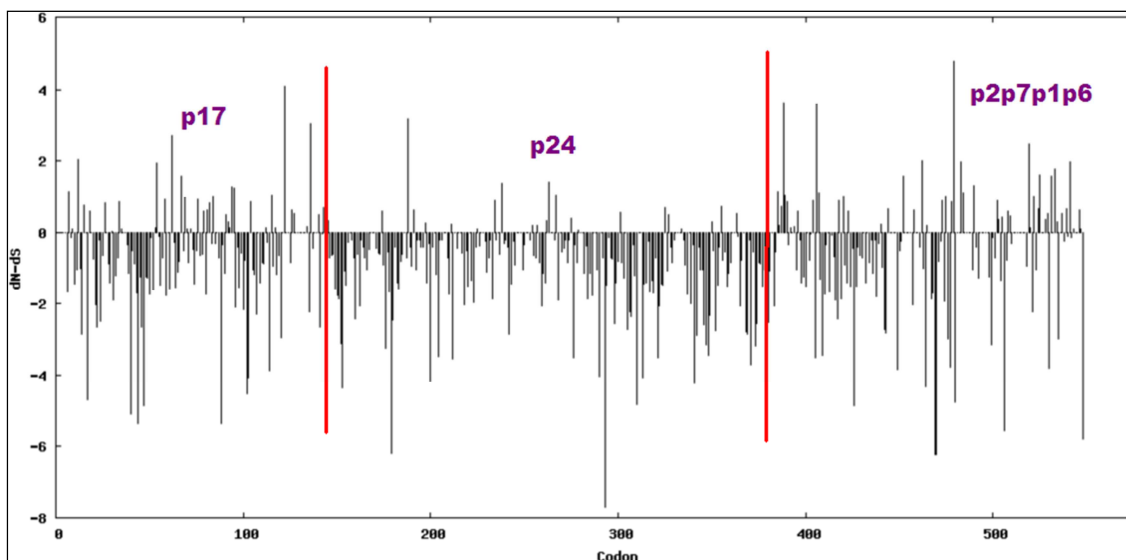


Figura 6.9. Posiciones seleccionadas positiva y negativamente a lo largo del gen gag en los pacientes con resistencia a IPs. Cuando la diferencia entre la razón de sustituciones no sinónimas (dN) y sinónimas (dS) es positiva se considera que la posición se encuentra bajo presión selectiva positiva y que tiende a la no conservación del aminoácido presente. De manera contraria, cuando la diferencia es negativa, se considera que la posición se encuentra bajo presión selectiva negativa y que tiende a la conservación del aminoácido. Los valores dN-dS se obtuvieron con la herramienta en línea DataMonkey. Se muestran los sitios de corte para cada proteína viral dentro del polipéptido Pr5^{gag}.

De manera global, se observó que la mayoría de las posiciones dentro de Gag tienden a la conservación del aminoácido, dado el mayor número de posiciones con valor dN-dS negativo. Fue notoria una mayor conservación de p24 en comparación con p17 y la porción final de la proteína. Se observó un mayor número de posiciones seleccionadas positivamente en la región p2p7p1p6, seguida de la proteína de matriz, p17. Adicionalmente, se determinó la significancia de las posiciones bajo aparente presión selectiva positiva, obteniéndose 28 posiciones con tasas de sustituciones no sinónimas significativamente mayores ($p < 0.1$) (Tabla 6.7).

Tabla 6.7. Posiciones bajo presión selectiva positiva por razón de sustituciones sinónimas y no sinónimas (dN/dS) para el gen gag de virus de pacientes con resistencia a IPs.

Codón en el alineamiento	Codón HXB2	Proteína	dN-dS	Valor p*
7	7	p17	3.88943	0.01328
12	12	p17	6.93157	0.00563049
26	26	p17	2.76588	0.0683671
54	54	p17	6.62554	0.00536033
58	58	p17	3.15794	0.0417086

62	62	p17	9.12501	0.00455585
67	67	p17	5.35221	0.0126276
81	81	p17	2.10465	0.0876684
94	94	p17	4.38556	0.0374355
95	95	p17	4.16883	0.0690697
115	115	p17	3.56508	0.0757463
188	173	p24	10.7576	5.58E-06
238	223	p24	4.72458	0.0583099
263	248	p24	4.77718	0.0416986
388	373	p2	12.2469	0.000597004
406	389	p7	12.1176	0.000196435
407	390	p7	3.73574	0.034517
452	431	p7	5.32236	0.00231685
462	441	p1	6.8169	0.00482749
473	451	p6	3.03796	0.0970339
475	453	p6	3.42737	0.0938872
490	456	p6	4.4297	0.0166421
502	463	p6	3.00404	0.0913991
519	473	p6	8.35299	0.000750162
522	476	p6	3.48602	0.0379226
533	483	p6	5.98812	0.0254999
539	488	p6	2.15743	0.0883888
541	490	p6	6.72707	0.00927131

*Se muestran posiciones con valores $p < 0.1$, determinados con el servidor en línea DataMonkey (www.datamonkey.org).

De estas 28 posiciones seleccionadas positivamente, once se encontraron en p17, tres en p24 y catorce en la porción final del gen gag p2p7p1p6. Estas catorce posiciones constituyeron el 50% del total de posiciones bajo presión selectiva positiva. Esta región final que incluye a las proteínas NC y p6 así como los péptidos espaciadores p1 y p2, mostró que p6, a pesar de ser de menor tamaño que la NC presentó un mayor número de sitios con evidencia de presión selectiva positiva (nueve de las catorce posiciones) (Tabla 6.7).

Dado que la proteína p24 consta de 232 a.a., se tuvo un 1.3% de proporción de selección positiva, p17 presentó una proporción del 8.33%, NC una proporción del 5.5% y p6 con 17.3%. Se obtuvo entonces, que de acuerdo al tamaño de la proteína se tiene el siguiente orden de evidencia de selección positiva en la cohorte de estudio: $p6 > p17 > p7 > p24$

Con fines comparativos que permitieran conocer el impacto de la doble presión selectiva característica de la cohorte en estudio, se buscó la lista de posiciones seleccionadas positivamente de todas las secuencias de la cohorte mexicana

de referencia constituida por pacientes vírgenes a tratamiento antirretroviral del banco de secuencias del Grupo de Evolución Molecular del VIH del CIENI, INER (n=500) (Soto, M datos no publicados). Al tratarse de un mayor número de secuencias, la potencia para encontrar posiciones bajo presión selectiva positiva fue mayor y el número total de posiciones encontradas resultó con un total de 53 posiciones bajo presión selectiva positiva. El análisis de estas posiciones, permitió observar que al igual que en la cohorte de pacientes con resistencia a IPs, la región con mayor incidencia de posiciones bajo presión selectiva positiva fue la porción final del gen *gag*, incluyendo un 40% de los sitios (21 de 53). Al comparar las posiciones identificadas como bajo presión selectiva positiva en los virus de pacientes con resistencia a IPs y las identificadas en virus de pacientes vírgenes a tratamiento, se tuvo coincidencia en 24 de las 28 posiciones. Las 4 posiciones no coincidentes: codones 28, 452, 502 y 522, para el alineamiento de pacientes con resistencia a IPs, sugieren ser sitios asociados exclusivamente a la presión selectiva adicional que ejerce el tratamiento antirretroviral en la cohorte (Tabla 6.8).

Tabla 6.8. Posiciones bajo presión selectiva positiva exclusivas de los pacientes con resistencia a IPs.

Codón en el alineamiento para <i>gag</i>	Porcentaje de aparición (%)	Valor p*	Posición en HXB2	Proteína
58	18.9	0.042	R58	MA
452	29.7	0.0023	A431	p7/p1
502	17.6	0.091	F463	p6
522	12.2	0.038	Q476	p6

*Determinado por el servidor en línea DataMonkey.

De las 4 posiciones bajo presión selectiva positiva exclusivas de pacientes con resistencia a IPs se presentaron las siguientes variaciones: R58K/Q, A431V F463L/I, Q476P/R/K. La posición que presentó mayor porcentaje de aparición en la cohorte fue la posición A431V, con 29.7%, seguido de las variaciones R58K/Q, F463L/I, Q476P/R/K con 18.9%, 17.6%, 12.2% respectivamente. Interesantemente, la posición 431 (específicamente la mutación A431V) fue además, una de las posiciones previamente asociadas con exposición a IPs significativamente más frecuentes en la cohorte de pacientes con resistencia a IPs (Tabla 6.5, Figura 6.8). Ninguna de las tres variaciones restantes (R58K/Q, F463L/I, Q476P/R/K) se ha asociado previamente con exposición a IPs.

Con el objeto de buscar posibles agrupaciones genéticas y posibles eventos fundadores de virus con mutaciones en las 4 posiciones bajo presión selectiva exclusiva de los virus de pacientes con resistencia a IPs, se localizaron las secuencias relevantes dentro del árbol filogenético construido para las secuencias *gag* de los virus de los pacientes de la cohorte de estudio (Figura 6.10).

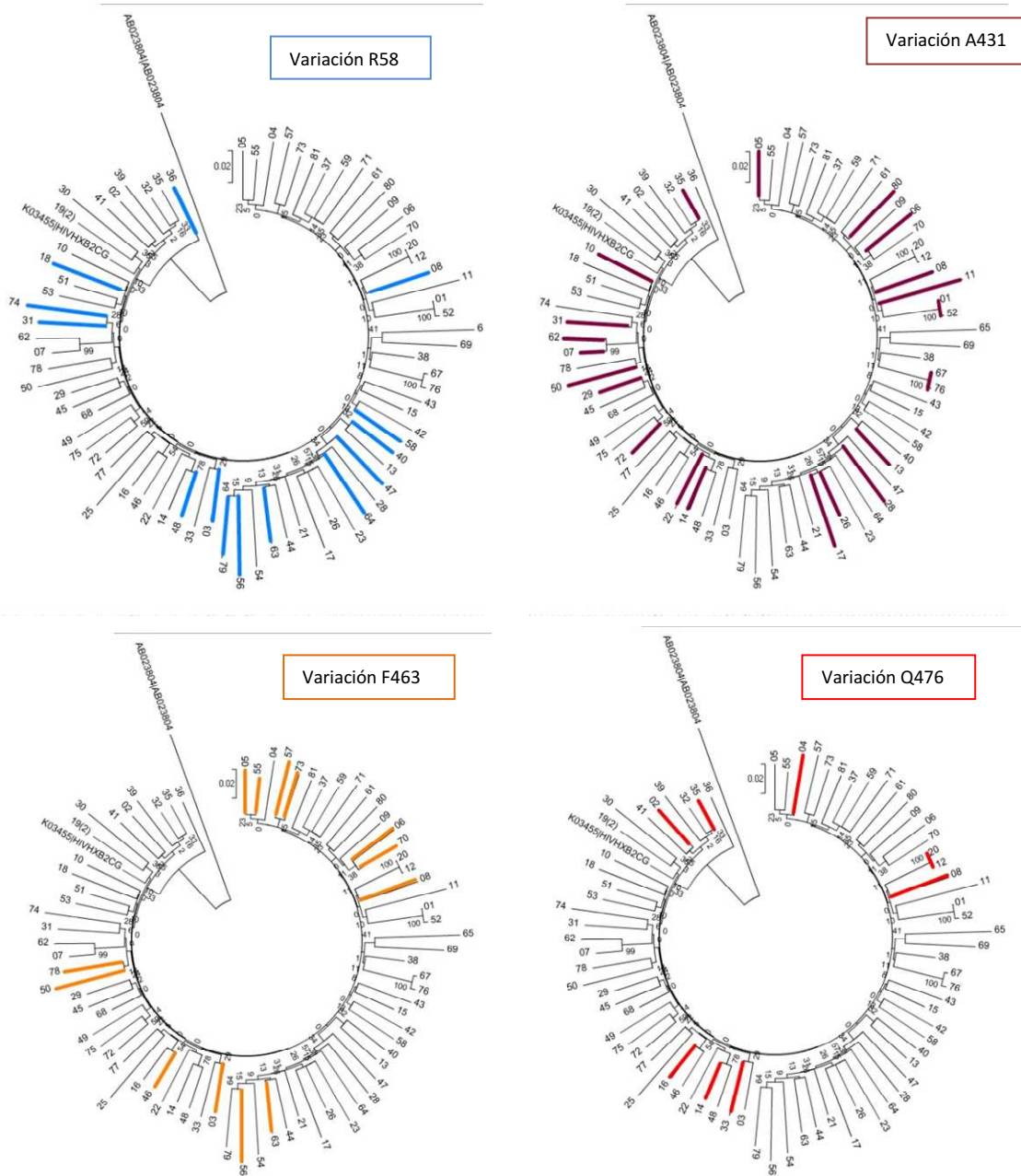


Figura 6.10. Conjunto de árboles que muestra las secuencias de los pacientes con alguna de las 4 posiciones exclusivas de la cohorte. Se identifican las secuencias que poseen alguna de las variantes R58K/Q, F463L/I, Q476P/R/K, A431V en el árbol correspondiente. El análisis filogenético fue realizado con el programa Mega 5.05. Se utilizó el

método de Máxima Verosimilitud (Maximum Likelihood) tomando como representativo el árbol consenso tras 1000 réplicas de bootstrap. La distancia evolutiva se calculó utilizando el modelo "General Time Reversible Model (GTR)". Se muestra el nombre de la secuencia de referencia HXB2 y una secuencia VIH subtipo B, tomadas de la Base de Datos de VIH de Los Álamos. (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/html>).

Se observaron algunos pares de secuencias con baja distancia genética para la variante R58K/Q: el par 73-31, ambas secuencias con la variante R58K aunque sin aporte de bootstrap, el par 58-79 con variantes distintas R58K y R58Q respectivamente. La variante F463 también presentó pares de secuencias: 05-55 ambas con la variante F463L aunque sin soporte de bootstrap, los pares 78-50 y 06-70 con las variantes F463I y F463L respectivamente. Las variaciones A431V y Q476P/R/K se observaron homogéneamente distribuidas en el árbol.

Estos resultados muestran la presencia de una fuerte presión selectiva positiva en el gen *gag* de virus de pacientes con resistencia a IPs, especialmente hacia la región terminal p2p7p1p6. Aún con el menor número de pacientes en la cohorte de individuos con resistencia a IPs, con respecto a la cohorte de individuos vírgenes a tratamiento, fue posible identificar posiciones bajo presión selectiva exclusivas de la cohorte de pacientes con resistencia a IPs. Estas posiciones muestran una evolución particular del virus bajo la presión selectiva de los fármacos. Así mismo, fue posible observar que la presencia de posiciones bajo presión selectiva en los pacientes con IPs no se asoció a efectos fundadores evidentes en el grupo de secuencias analizadas, distribuyéndose estas posiciones en la cohorte en estudio.

6.7 ANÁLISIS CONJUNTO: ANÁLISIS DE PRESIÓN SELECTIVA POSITIVA Y MUTACIONES ASOCIADAS AL USO DE IPs EN EL GEN gag Y SU POSIBLE CONFLUENCIA CON LA PRESIÓN SELECTIVA POR HLA.

Con el objeto de obtener una mejor visualización del impacto de la presión selectiva múltiple en los pacientes con resistencia a IPs, con respecto a los pacientes vírgenes a tratamiento, se realizaron una serie de diagramas que pudieran dar evidencia de posibles posiciones asociadas a la evolución del virus bajo diferentes presiones selectivas (Figuras 6.11-6.13).

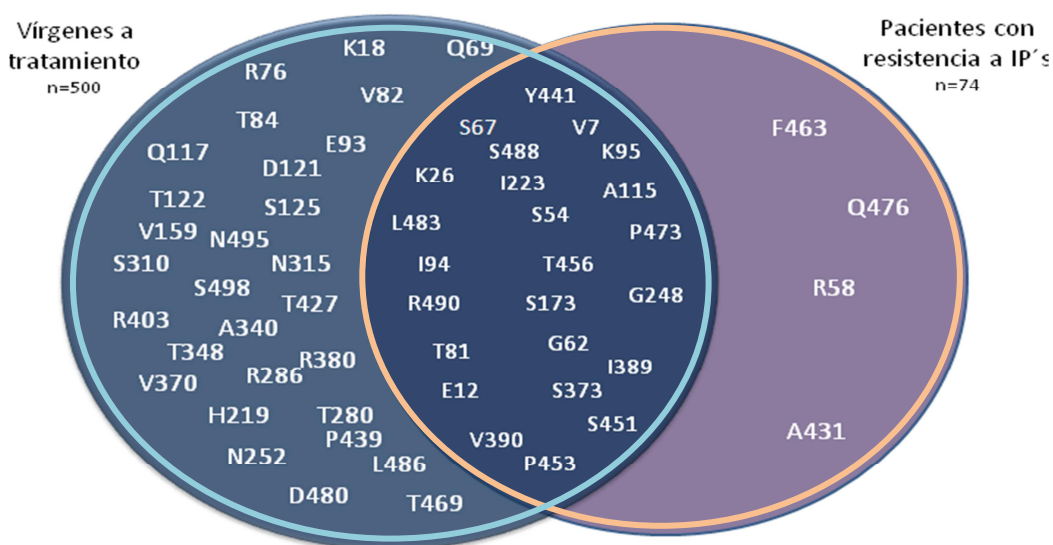


Figura 6.11. Diagrama de Venn que muestra todas las posiciones bajo presión selectiva positiva de los pacientes vírgenes a tratamiento y los pacientes con resistencia a IPs. Se muestran las posiciones bajo presión selectiva positiva ($p < 0.1$), determinadas por razones de sustituciones sinónimas y no sinónimas con el servidor en línea Datamonkey, en virus de la cohorte de pacientes con resistencia a IPs ($n=74$) y virus de pacientes vírgenes a tratamiento antirretroviral de la base de datos de Epidemiología Molecular y Evolución del VIH del CIENI, INER ($n=500$).

El diagrama permitió apreciar la mayor densidad de posiciones seleccionadas positivamente en los pacientes vírgenes a tratamiento dado el mayor número de pacientes incluidos en el análisis, con una consecuente mayor potencia para detectar posiciones bajo presión selectiva. Sin embargo, a pesar de esta diferencia de "N", el análisis permitió identificar las posiciones exclusivas en la cohorte de pacientes con resistencia a IPs descritas arriba: A431, R58, Q476, F463. Así mismo, se observaron las 24 posiciones bajo presión selectiva positiva compartidas en ambos grupos de pacientes que podrían representar

sitios bajo presión selectiva inmune presente en la evolución viral en ambos casos.

Para indagar sobre el impacto del tratamiento antirretroviral como fuerza selectora adicional en la progenie viral de los pacientes, se identificaron a las mutaciones reportadas previamente asociadas al uso de IPs de la Tabla 6.7 dentro de las posiciones con evidencia de presión selectiva positiva (Figura 6.12).

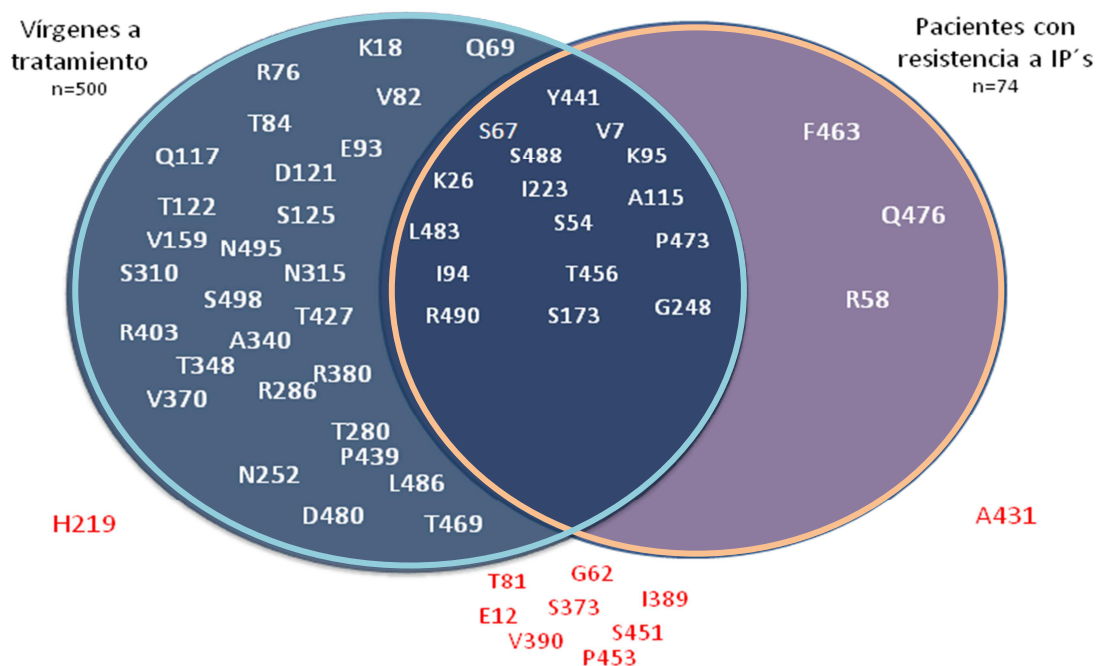


Figura 6.12. Diagrama de Venn que muestra las posiciones seleccionadas positivamente en ambas cohortes y la identificación de mutaciones asociadas al uso de IPs. Se identifican en rojo y fuera del diagrama las posiciones con evidencia de presión selectiva positiva que coinciden con mutaciones previamente asociadas al uso de IPs.

Interesantemente, se observaron ocho mutaciones previamente asociadas al uso de IPs identificadas como bajo presión selectiva positiva tanto en pacientes con resistencia a IPs como en pacientes vírgenes a tratamiento antirretroviral. Estas mutaciones podrían representar sitios de interacción de presiones selectivas al constituir sitios de importancia en la presión selectiva inmune en el contexto inmunogenético mexicano, además de constituir sitios con evidencia de variación por exposición a fármacos.

Desde el punto de vista de los pacientes vírgenes a tratamiento, la mutación H219Q/P que de acuerdo a la Tabla 6.7, se encontró presente con alta frecuencia (28.38%), fue la única que también se identificó como una mutación asociada al uso de IPs. Esta mutación podría representar un evento fundador característico de virus mexicanos. Por último, de las cuatro posiciones bajo presión selectiva positiva exclusivas de los pacientes con resistencia a IPs, como ya se mencionó, sólo una se ha asociado al uso de IPs (A431V). Las tres posiciones adicionales podrían representar nuevos sitios asociados a la evolución del virus en presencia de IPs, previamente no identificados en otras cohortes.

Dado el alto número de posiciones bajo presión selectiva positiva observadas en ambos grupos de pacientes, se indagó sobre el impacto que pudiera tener la respuesta mediada por CTLs en la presión selectiva positiva en estos sitios. Este análisis permitiría también conocer las posibles posiciones con evidencia de confluencia de presiones selectivas. Para evaluar el impacto de la respuesta de CTLs en la evolución del virus de la cohorte en estudio, se buscaron asociaciones de las posiciones con evidencia de selección positiva con la presencia de alelos HLA de clase I específicos. Para lograr esto, se utilizaron los resultados del análisis de redes de dependencia filogenética (PDN) (Claudia Juarez, et al. Datos no publicados), previamente llevados a cabo para un conjunto de 500 secuencias de *gag* de virus circulante en México, obtenidas del banco de secuencias de Epidemiología Molecular y Evolución del VIH en México del CIENI, INER. El modelo PDN busca asociar un polimorfismo en la secuencia del virus con cierto alelo HLA corrigiendo para los efectos confusores de la filogenia del VIH, el desequilibrio de ligamiento de alelos HLA y la co-variación de codones de VIH, evitando falsos positivos. De esta manera, se buscó cuántas de las posiciones bajo presión selectiva positiva, se encontraban asociadas también a algún alelo HLA-I (Figura 6.13).

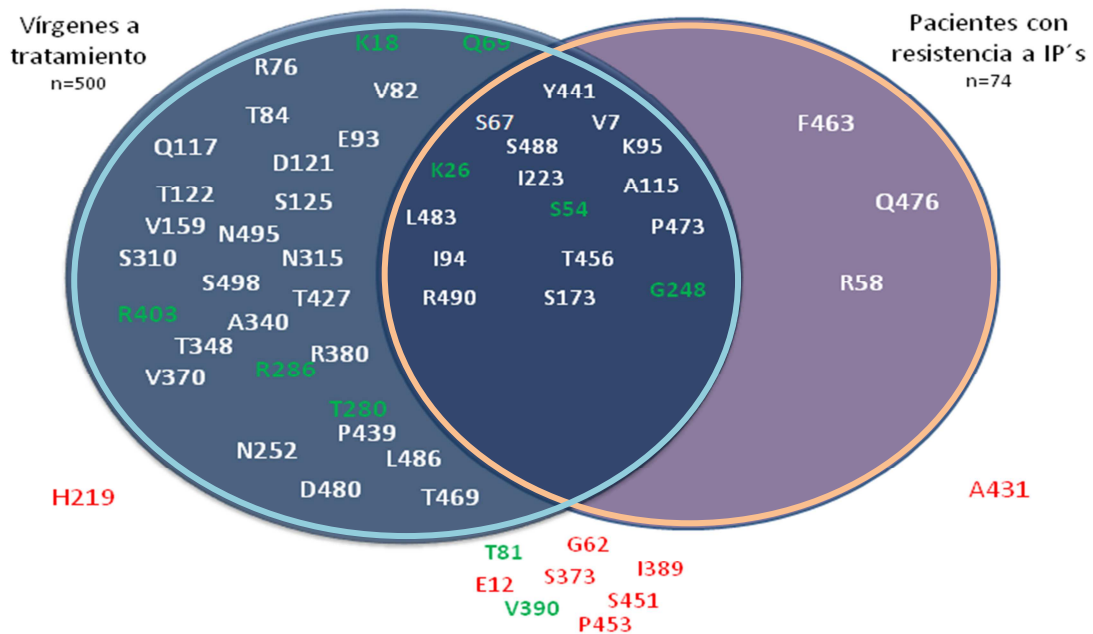


Figura 6.13. Diagrama de Venn que muestra todas las posiciones seleccionadas positivamente en ambas cohortes, las mutaciones asociadas con el uso de IPs, así como las posiciones asociadas a algún alelo HLA-I. Se muestran en verde las posiciones asociadas a algún alelo HLA mediante el modelo PDN. El análisis de PDN se llevó a cabo previamente para 500 secuencias de gag de virus circulante en México de la base de datos de secuencias del CIENI, INER. Fuera de los conjuntos se resaltan en rojo las posiciones asociadas al uso de IPs sin asociación a algún alelo HLA.

De las posiciones bajo presión selectiva positiva compartidas en ambos grupos de pacientes, cinco se asociaron a algún alelo HLA por el modelo PDN: K26, S54, G248, T81 y V390. De estas posiciones, dos se han asociado adicionalmente al uso de IPs: T81 asociada con los alelos C*14 y B*15:03 y la posición V390, asociada con los alelos B*27:05 y A*11. Estas posiciones por tanto, podrían representar sitios con evidencia de confluencia de la presión selectiva inmune y por exposición a IPs. El alelo A*11, se ha establecido como un alelo común en la población mexicana [18]. Del resto de las posiciones en la intersección asociadas con HLA-I, K26 se asoció con el alelo HLA B*15:01 común también en población mexicana [18], S54 con el alelo HLA B*15 y G248 con C*04:01.

Ninguna de las posiciones exclusivas de la cohorte de pacientes con resistencia a IPs mostró asociación con algún alelo HLA, lo cual sugiere que la presión selectiva positiva observada puede deberse al efecto exclusivo de la

exposición a IPs. Por último, sólo 5 posiciones se asociaron a algún alelo HLA en los pacientes vírgenes a tratamiento.

Como un análisis adicional se buscó en el mapa de epítomos de CTLs previamente reportados y comprobados experimentalmente de la Base de Datos de Inmunología de Los Álamos (<http://www.hiv.lanl.gov/content/index>) a las posiciones con selección positiva y asociadas al uso de IPs en la cohorte de pacientes con resistencia a IPs y la cohorte vírgen a tratamiento, para encontrar posibles asociaciones con alelos HLA adicionales a los mostrados por el análisis de PDN y que pudieran ser frecuentes en población mexicana (Tabla 6.9). Estas asociaciones podrían dar evidencia de otras posiciones en las que la presión selectiva múltiple confluye.

Tabla 6.9. Asociación con alelos HLA-I de las posiciones seleccionadas positivamente y asociadas al uso de IPs en pacientes con resistencia a IPs y pacientes vírgenes a tratamiento.

Posición bajo presión selectiva positiva	Mutación asociada al uso de IPs	Alelo HLA-I asociado*
E12	E12K	A*11
T81	T81A	A*02:01
H219	H219Q/P	B*35:01, B*39:10, B*4006, B*40:02
S373	S373P/Q/T	B*45:01, B*40:02, A*02:01
I389	I389T	A*11
V390	V390A/D	A*11
A431	A341V	B*48:01, B*40:02

*La asociación se obtuvo buscando la posición en el mapa de epítomos reportado en la base de datos de los Álamos disponible en <http://www.hiv.lanl.gov>[61]

Las posiciones E12, S373 e I389 también mostraron evidencia de confluencia entre presiones selectivas al tratarse de posiciones con selección positiva en ambas cohortes y asociadas al uso de IPs. No se encontró asociación con algún alelo HLA-I para las posiciones G62, P453 y S541.

Estos resultados en conjunto muestran que a pesar de la diferencia en número de pacientes incluidos para la identificación de sitios con evidencia de selección positiva se logró la identificación de posiciones por efecto exclusivo del uso de IPs en los pacientes con resistencia previamente no reportados. La identificación de posiciones bajo presión selectiva positiva compartidas entre las cohortes, sugiere un fuerte efecto de la presión selectiva inmune aún en la cohorte de pacientes con falla a IPs.

6.8 ANÁLISIS DE LAS POSICIONES CON EVIDENCIA DE PRESIÓN SELECTIVA EXCLUSIVAS DE LA COHORTE DE PACIENTES CON RESISTENCIA A IPs Y DE MUTACIONES ASOCIADAS AL USO DE IPs.

Los análisis mostrados hasta ahora, han permitido la identificación de posiciones exclusivas de interés en la evolución de los virus de la cohorte de pacientes mexicanos con resistencia a IPs a lo largo de la región *gag-pol*. Desde el punto de vista de variabilidad, se encontraron mutaciones asociadas al uso de IPs con frecuencia significativamente mayor en pacientes con resistencia a IPs (V128T, A431V, I437T/V P453A/L/T) (Figura 6.8). Desde el punto de vista evolutivo, se encontraron posiciones con evidencia de presión selectiva positiva y que resultaron exclusivas de la cohorte de pacientes con resistencia a IPs (A431V, F463L/I, Q476P/R/K, R58K/Q) (Figura 6.11). Dado este panorama, se hizo un análisis considerando todas éstas posiciones exclusivas para entender mejor las características que definen a la cohorte que se estudió.

Tabla 6.10. Posiciones exclusivas de los pacientes con resistencia a IPs.

HXB2	Proteína	Análisis utilizado
R58K/Q	CA	-Presión selectiva positiva por razones dN/dS
F463L/I	p6	-Presión selectiva positiva por razones dN/dS
Q476P/R	p6	-Presión selectiva positiva por razones dN/dS
A431V	Motivo de corte NC/ p1	-Mutaciones asociadas a exposición a IPs. -Presión selectiva positiva por razones dN/dS
I437T/V	Motivo de corte NC/p1	-Mutaciones asociadas a exposición a IPs.
P453A/L/T	Motivo de corte p1/p6	-Mutaciones asociadas a exposición a IPs.
V128T/I	Motivo de corte MA/CA	-Mutaciones asociadas a exposición a IPs.

Con el objeto de conocer cuántas y cuáles de éstas variaciones se encontraban presentes en cada uno de los pacientes con resistencia a IPs, se realizó un análisis detallado de las posiciones bajo presión selectiva positiva exclusivas del grupo de pacientes con resistencia a IPs así como de las mutaciones asociadas a IPs con variabilidad significativamente más alta en este grupo de pacientes (Tabla 6.8, Tabla 6.10). El 74.3% de los pacientes presentaron variación en al menos una de las 7 posiciones posibles, con un número variable de mutaciones mayores de resistencia a IPs en *pol* (5-0 mutaciones mayores).

Ninguno de los pacientes presentó las 7 variaciones, siendo cuatro el número máximo dentro de un mismo paciente. Se incluyeron a los pacientes con ID: 42, 43 y 49, por poseer un número alto de mutaciones mayores de resistencia a IPs (4 mutaciones mayores de resistencia) y que sin embargo, no presentaron ninguna de las posiciones exclusivas. (Tabla 6.11). El 25.68% restante, no presentó ninguna de las siete posiciones y presentó un número de mutaciones mayores de resistencia en *pol* de 0-4.

Tabla 6.11. Desglose de pacientes que mostraron al menos una de las 7 posiciones exclusivas en los pacientes con resistencia a IPs.

ID Paciente	# Mut. mayores	Carga viral	Q476K/P/R	F463L/I	R58K/Q	A431V	V128T/I	I437T/V	P453A/L/T	*Total
8	5	?	*	*	*	*				4
10	5	71,356				*				1
37	5	6,638						*		1
64	5	383,965			*					1
6	4	51,707		*		*	*		*	4
11	4	177,343				*				1
14	4	6,766	*			*				2
16	4	23,380	*				*			2
22	4	18,792				*			*	2
28	4	162,965				*				1
33	4	115,723	*							1
35	4	31,202	*			*				2
42	4	1,326								0
43	4	40,566								0
49	4	84,213								0
52	4	31,485				*				1
62	4	11,512				*				1
65	4	>100000					*			1
69	4	30,200							*	1
70	4	89,100		*				*		2
72	4	673,000				*				1
80	4	54,100					*			1
5	3	833		*		*			*	3
50	3	6,050		*		*			*	3
78	3	>100000		*				*		2
18	3	53,980			*					1
48	3	1,791			*					1
7	3	136,416				*		*		2
29	3	3,083				*			*	2
67	3	45,450				*	*		*	3
19	3	19,048						*		1
23	3	57,133						*	*	2
12	3	24,478	*						*	2
2	2	2,226	*							1

4	2	4,413	*					*		2
20	2	793,286	*							1
3	2	73,073		*	*					2
56	2	?		*	*					2
73	2	543,000		*						1
36	2	1,467			*				*	2
47	2	20,840			*					1
13	2	40,564				*			*	2
17	2	176,730				*			*	2
9	2	72,521					*		*	2
77	2	18,394						*		1
32	2	211,529							*	1
68	2	6,030							*	1
53	2	22,733				*				1
55	1	286,873		*						1
63	1	10,905		*	*				*	3
31	1	6,700			*	*				2
40	1	81,579			*				*	2
58	1	27,084			*					1
74	1	1,068			*					1
79	1	119,881			*					1
54	1	8,158							*	1
46	0	74,171		*						1
57	0	247,949		*						1

*Se resaltan en rojo los pacientes que no presentaron ninguna posición exclusiva y tienen un alto número de mutaciones mayores de resistencia en proteasa.

Para poder apreciar si existía alguna relación entre el número de posiciones exclusivas en los pacientes con resistencia a IPs y el número de mutaciones mayores de resistencia en *pol* se hizo un gráfico de barras con los datos mostrados en la Tabla 6.11.

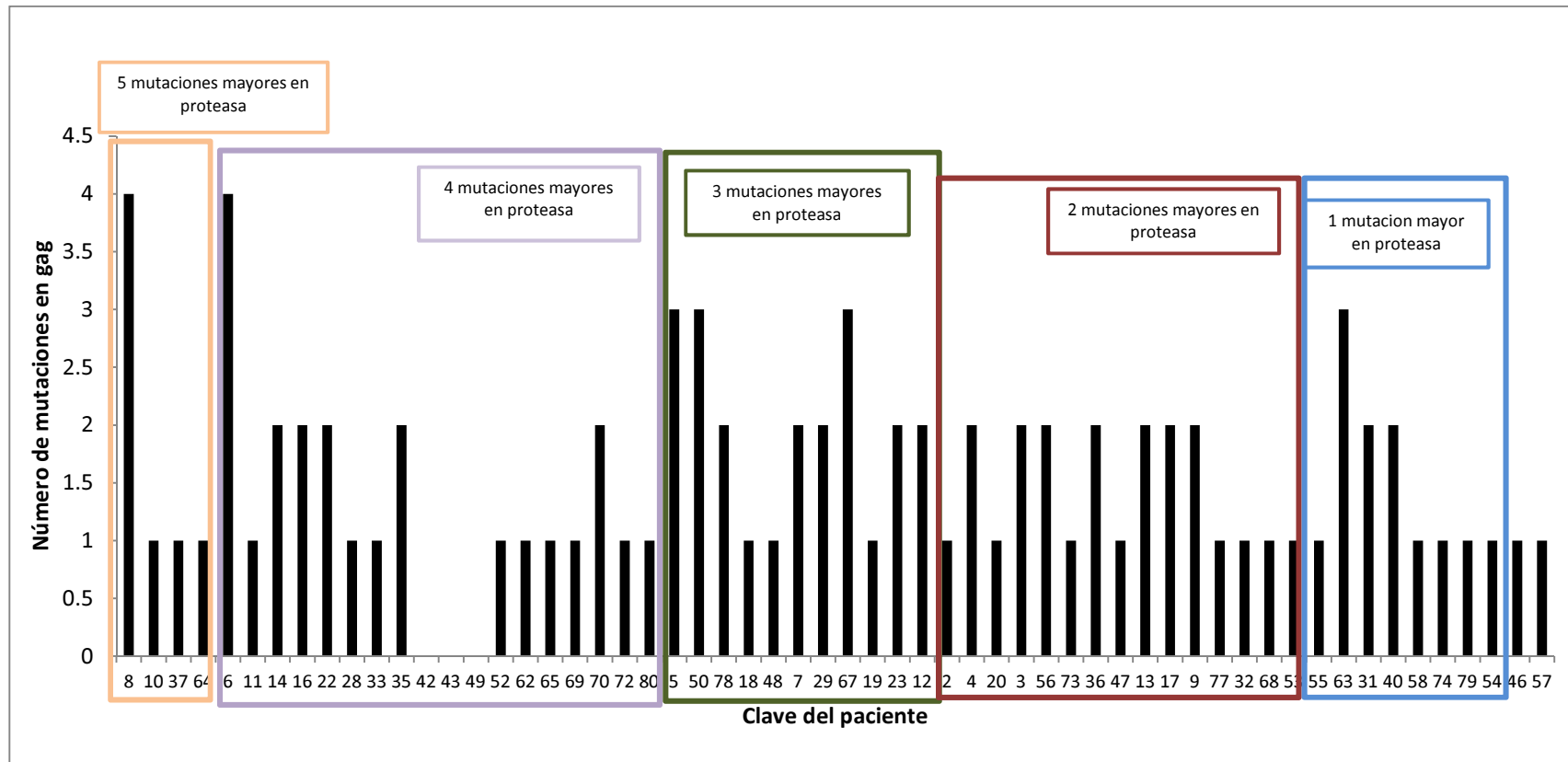


Figura 6.14. Desglose de pacientes que presentan al menos una de las posiciones exclusivas de los pacientes con resistencia a IPs en correspondencia con el número de mutaciones mayores en *pol*. Se muestra a cada paciente de acuerdo al número de posiciones exclusivas que presenta en *gag* y agrupados de acuerdo al número de mutaciones mayores de resistencia a IPs en *pol*.

La mayoría de los pacientes (55.5%) presentaron sólo una de las posiciones exclusivas independientemente del número de mutaciones mayores en *pol*. En conjunto, estos resultados muestran que no existe una relación evidente entre el número de posiciones exclusivas en los pacientes con resistencia a IPs y el número de mutaciones mayores de resistencia en *pol* (Figura 6.14).

6.9 PRESIÓN SELECTIVA EN LA PORCIÓN DE TRASLAPE DEL GEN *gag* CON EL GEN *pol*.

Con el objeto de analizar el efecto de la presión selectiva en diferentes marcos de lectura, y para evaluar el impacto de la presión selectiva en marcos de lecturas distintos sobre la variabilidad de Gag p2p7p1p6, se hizo un último análisis con el alineamiento de la porción correspondiente a la proteína de traslape p6* (56 codones) y los primeros 13 aminoácidos de proteasa a raíz del cambio en el marco de lectura de la región *gag-pro*. Como se ha descrito arriba, se realizó un análisis de presión selectiva positiva por razón de sustituciones sinónimas y no sinónimas para p6*.

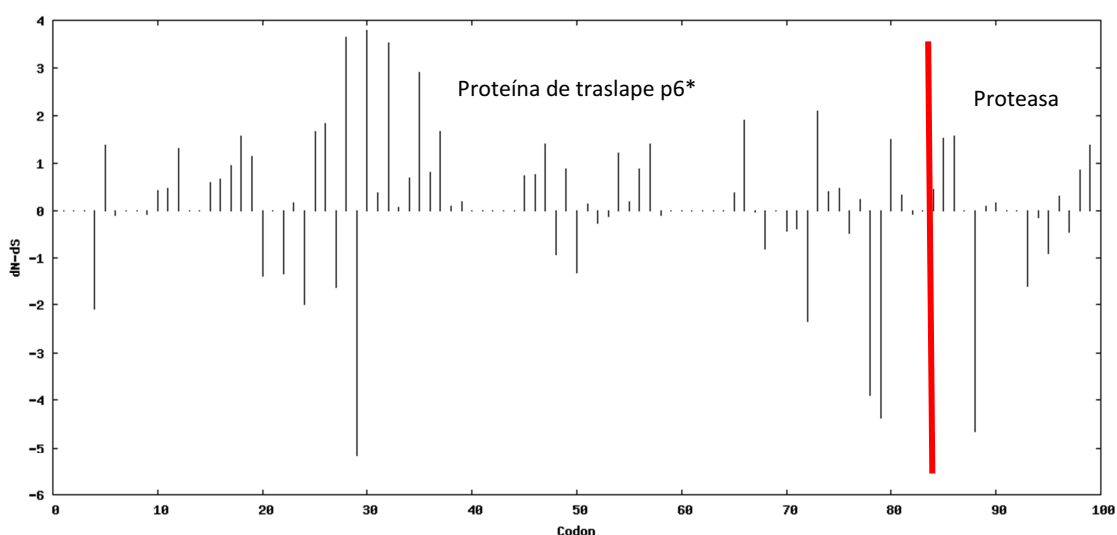


Figura 6.15. Selección positiva y negativa para la porción de traslape de las secuencias de los pacientes con resistencia a IPs. Cuando la diferencia entre la razón de sustituciones no sinónimas (dN) y sinónimas (dS) es positiva se considera que la posición se encuentra bajo presión selectiva positiva y que tiende a la no conservación del aminoácido presente. De manera contraria, cuando la diferencia es negativa, se considera que la posición se encuentra bajo presión selectiva negativa y que tiende a la conservación del aminoácido. Los valores dN-dS se obtuvieron con la herramienta en línea DataMonkey. Se muestran los sitios de corte para p6* y el inicio de proteasa.

Se observó una tendencia de selección positiva a lo largo de la proteína de traslape p6*, especialmente hacia la parte inicial y media de la proteína (Figura 6.15). El inicio de proteasa tiende a la conservación del aminoácido con un mayor número de posiciones con evidencia de selección negativa (Figura 6.15). Adicionalmente, se obtuvieron 19 posiciones con tasas de sustituciones no sinónimas significativamente mayores ($p < 0.1$) (Tabla 6.12).

Tabla 6.12. Posiciones bajo presión selectiva positiva por razón de sustituciones sinónimas y no sinónimas (dN/dS) para la porción de traslape de virus de pacientes con resistencia a IPs

Codón	dN-dS	Valor de p*
5	6.01907	0.01478
12	5.79658	0.01032
15	2.69862	0.07626
17	4.18217	0.04072
18	6.9124	0.01535
19	5.07706	0.00679
36	3.60331	0.02601
37	7.26118	0.00436
45	3.26981	0.03696
47	6.16636	0.01516
49	3.9314	0.04702
54	5.29994	0.0711
57	6.2165	0.01354
66	8.3119	0.00364
80	6.58143	0.05758
85	6.66187	0.04336
86	6.90799	0.01384
98	3.76387	0.04859
99	6.07296	0.05363

*Se muestran posiciones con valores $p < 0.1$, determinados con el servidor en línea DataMonkey (www.datamonkey.org).

Con la finalidad de establecer un mejor panorama de las posiciones seleccionadas positivamente para ambos marcos de lectura y conocer si es posible que esta presión selectiva afecte a ambos, se hizo un diagrama que muestra a todos los aminoácidos de la proteína de traslape p6* y a los aminoácidos correspondientes con el marco de lectura de *gag*. Figura 6.16

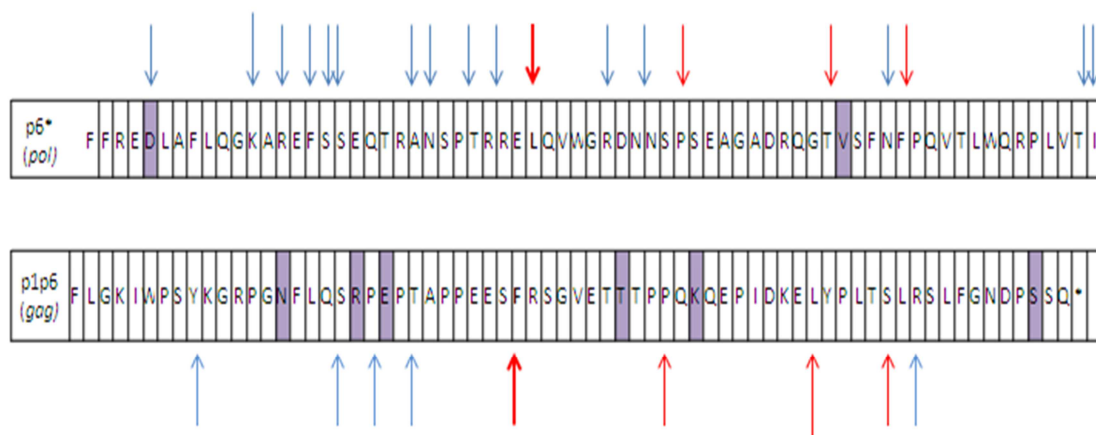


Figura 6.16 Diagrama de selección positiva mostrando los aminoácidos de la proteína de traslape p6* y los aminoácidos correspondientes al marco de lectura de gag. Se indican con flechas las posiciones seleccionadas positivamente en ambos marcos de lectura. En flechas rojas se marcan los aminoácidos que están seleccionados positivamente para ambos marcos de lectura, la flecha resaltada indica una posición bajo presión selectiva positiva que no se comparte con pacientes vírgenes a tratamiento. Las mutaciones asociadas al uso de IPs se identifican en color lila.

Interesantemente, la porción de traslape en el marco de lectura para *pol* mostró una mayor densidad de sitios seleccionados positivamente que para el marco de lectura de *gag* (Figura 6.16). Sólo cuatro de las posiciones seleccionadas coincidieron para ambos marcos de lectura y sólo una de ellas no se compartió con los pacientes vírgenes a tratamiento: F463 para *gag*, L463 para *pol*. Dentro de la proteína p6* sólo se han reportado dos mutaciones asociadas al uso de IPs: la mutación D437N [31] que también se encontró como posición bajo presión selectiva positiva (Figura 6.16) y la mutación V484G/I/P/S [31] sin evidencia de selección positiva. Adicionalmente, ninguna de las cuatro posiciones que se comparten para ambos marcos de lectura (flechas en rojo), han sido asociadas al uso de IPs.

En conjunto, estos resultados muestran que la presión selectiva múltiple en pacientes que han desarrollado resistencia a IPs es capaz de afectar diferentes marcos de lectura y que variantes en un marco de lectura pueden potencialmente afectar la variabilidad del virus en el otro marco de lectura.

CAPÍTULO VII. DISCUSIÓN.

El presente estudio representa un primer esfuerzo de análisis de la evolución del VIH en presencia de múltiples presiones selectivas y en el contexto inmunogenético de una cohorte mexicana. Para la realización de este trabajo se utilizaron muestras de plasma de 74 pacientes mexicanos infectados por VIH-1 de clado B que presentaban dentro del gen *pol*, mutaciones de resistencia mayores y menores a Inhibidores de Proteasa. El presente estudio logró identificar una mayor variabilidad en Gag, especialmente hacia la porción final p2p7p1p6, cuando el virus se encontraba sujeto a la presión selectiva adicional por IPs, con respecto a virus de pacientes vírgenes a tratamiento. Interesantemente, a pesar de ser una cohorte con limitaciones en número, se logró la identificación de posiciones bajo presión selectiva y con variabilidad significativamente mayor exclusivas para la cohorte de pacientes con resistencia a IPs que podrían surgir por efecto de la presión selectiva adicional que ejercen los fármacos. Así mismo, mediante la asociación de posiciones seleccionadas positivamente con alelos HLA-I específicos, se logró la identificación de posiciones que evidencian la posibilidad de convergencia entre las presiones selectivas inmune y farmacológica. Algunas de estas posiciones sugirieron posibles efectos de acorralamiento para el virus, observándose casos en los que la variante resistente podría ser blanco de la respuesta inmune en el contexto inmunogenético de una cohorte mexicana, limitando así la posibilidad de variación del virus. Por otro lado, también se observaron situaciones de doble ventaja para el virus, en las cuales una mutación asociada al uso de IPs pudo asociarse también a escape de la respuesta inmune restringida por HLA en mexicanos.

La cohorte utilizada en este estudio provenía en su mayoría, de la zona centro del país, mayoritariamente del Distrito Federal, que de acuerdo a datos oficiales es donde se concentra el mayor número de personas infectadas por VIH en México [7, 12]. Este factor es importante tenerlo en mente al realizar estudios de variabilidad viral y asociaciones con características inmunogenéticas de la población ya que podrían presentarse sesgos geográficos en los resultados. Sin embargo, en este sentido, estudios previos han reportado una alta homogeneidad en los virus circulantes en México a nivel nacional. Por otro lado,

es conocida la variabilidad y riqueza genética de nuestra población que muestra diferencias importantes en la distribución de genes HLA incluso dentro de la población mestiza mexicana [67]. Reconociendo esta limitación del estudio, nuestros análisis muestran por primera vez datos de la evolución del VIH que son válidos al menos para la población del centro del país. La inclusión de más pacientes provenientes de distintas partes del país resultaría conveniente para mostrar datos más representativos a nivel nacional con un panorama más completo de la evolución viral en población mexicana cuando se presenta resistencia a IPs.[6]

En cuanto a la proporción de género, la cohorte refleja lo hasta ahora reportado oficialmente para México, en donde el sexo masculino supera el 80% de los casos de infección [7, 12], con un 82.4% en la cohorte. Es conocido que los parámetros de carga viral y cuenta de linfocitos T CD4+ en sangre periférica son útiles para establecer la etapa de infección en los pacientes y ayudan a establecer la susceptibilidad a enfermedades oportunistas, riesgo de transmisión o eficacia del tratamiento antirretroviral [5]. El rango tanto de carga viral [833-793,286] copias/mL de sangre, como de cuenta de Linfocitos T CD4+ [12-984] células/ μ L de sangre, resultaron bastante amplios en la cohorte del presente estudio. Al tratarse de una cohorte de pacientes con falla virológica conocida hacia la terapia antirretroviral, esto refleja heterogeneidad en los tiempos de evolución de la enfermedad (y del virus) en presencia de falla al tratamiento antirretroviral, así como posibles diferencias en los tiempos de inicio del tratamiento antirretroviral y los nadirs de cuentas de linfocitos T CD4+ en sangre periférica de los pacientes participantes. En el caso de nuestro país, es conocido que la mayoría de los pacientes son diagnosticados hacia etapas tardías de la infección [3, 5]. Interesantemente, aún con esta heterogeneidad en los tiempos de evolución del virus en presencia de falla a esquemas de tratamiento conteniendo IPs, nuestros análisis fueron capaces de evidenciar diferencias importantes en la evolución viral en la cohorte en estudio con respecto a pacientes vírgenes a tratamiento antirretroviral.

Es conocido que una vez que se desarrolla un fenotipo de resistencia en los pacientes, el curso de la infección, puede verse influenciado por el número de mutaciones de resistencia acumuladas en la progenie viral [68]. En la cohorte

no se observó una relación entre el número de mutaciones mayores de resistencia y los parámetros de carga viral y cuenta de linfocitos T CD4+, mostrando nuevamente la heterogeneidad de la cohorte aunado al desconocimiento de otros factores fuera de *pol* que pueden estar influenciando la evolución viral.

La obtención de un árbol filogenético con los criterios considerados, permitió apreciar a una cohorte homogéneamente distribuida en el árbol consenso, sin evidencia de agrupaciones por parámetros clínicos o de mutaciones de resistencia en *pol*. Resultados similares han sido observados en otros estudios, sugiriendo una alta homogeneidad de los virus circulantes a nivel nacional [16]. Se pudieron identificar algunos pares de secuencias con baja distancia genética que sin embargo, no se confirmaban con altos valores de bootstrap. Este análisis permitió la identificación de secuencias pertenecientes al mismo paciente así como la apreciación de posibles pares de transmisión, ello abrió paso a una búsqueda más profunda sobre las características genotípicas midiendo el impacto que puede tener la acumulación de mutaciones de resistencia en los parámetros clínicos del paciente y el curso de la enfermedad (Tabla 6.3). Una elección más específica de criterios alternativos para un análisis filogenético más detallado, que se adapte mejor a las características de la cohorte no se descarta y podría evidenciar mejor la evolución viral en las ramas mas externas del árbol y con ello permitir la apreciación de posibles clusters. En especial el uso de modelos que consideren la incorporación de la presión selectiva por fármacos antirretrovirales como un motor adicional de la evolución del virus, que podría resultar en un cambio en la velocidad de evolución viral.

Dado el conocimiento extenso sobre el desarrollo de mutaciones de resistencia en *pol* en pacientes con falla al tratamiento, varios estudios se han centrado en el análisis del impacto de la resistencia sobre otros genes virales y en el desarrollo de mutaciones que compensan los costos en capacidad replicativa inherentes a la aparición de mutaciones de resistencia [30, 40, 64]. Específicamente para el caso de Inhibidores de Proteasa existen estudios de adaptación viral dentro del gen *gag*, especialmente hacia la porción final del gen, p2p7p1p6 [59, 63, 65]. La poliproteína Gag resulta ser blanco directo de la

acción de la proteasa viral y es lógico pensar en una posible adaptación en este gen frente a la presión selectiva de los fármacos inhibidores de proteasa. En el presente estudio, para poder entender la respuesta adaptativa que caracteriza a la cohorte estudiada, resultó primordial la comparación con pacientes que no están sujetos a tratamiento antirretroviral. Como un primer acercamiento al análisis de una posible evolución diferencial en virus de pacientes con falla a IPs y virus de pacientes vírgenes a tratamiento se realizó una comparación de variabilidad en la secuencia de *gag* medida como entropía de Shannon. Tal como se muestra en la Figura 6.5, este análisis mostró que existe una mayor entropía en los pacientes con resistencia a IPs con el mayor número de diferencias significativas hacia la porción final p2p7p1p6 especialmente en la proteína p6, proteína que ha sido previamente caracterizada por presentar alta frecuencia de mutaciones compensatorias y/o de resistencia frente al uso de Inhibidores de Proteasa [59, 63, 65[45]]. Interesantemente, la mayor variabilidad no se limitó exclusivamente a los sitios de corte de la proteasa en la poliproteína Gag, sino que se observó a lo largo de la proteína, lo cual refleja una rápida evolución viral en presencia de falla al tratamiento antirretroviral y una posible red compleja de coevolución de codones para compensar costos en capacidad replicativa de las mutaciones de resistencia a IPs. Estos resultados en conjunto, fueron una primera evidencia de adaptación en *gag* tras el uso de IPs reflejada en una mayor variabilidad.

Previamente se ha reportado que los motivos de corte dentro de la proteína Gag no sólo presentan mayor polimorfismo bajo la presión ejercida por IPs, sino que polimorfismos en estos sitios pueden funcionar como mutaciones compensatorias y/o de resistencia a fármacos inhibidores de proteasa [59, 63, 65 [45] . Dado este panorama, se hizo un análisis sobre la variabilidad de los motivos de corte a lo largo del polipéptido. Se obtuvo una mayor variabilidad en la mayoría de las posiciones a lo largo de todos los motivos de corte en comparación con los pacientes vírgenes a tratamiento, e incluso un aumento considerable de variación en posiciones que han sido reportadas como altamente conservadas (Figura 6.6). Estos resultados apoyan todavía más la evidencia de que *gag* es punto esencial en la adaptación y evolución del VIH frente a la resistencia por el uso de IPs, reflejado en un mayor grado de

polimorfismo en posiciones específicas dentro de la proteína. Son estos motivos de reconocimiento puntos esenciales para compensar el efecto negativo en la capacidad replicativa por el efecto de una proteasa mutada y esta diferencia en variabilidad favorecida en la cohorte con resistencia a IPs, bien podría indicar una mejor afinidad de la proteasa mutada por el sustrato y con ello compensar las fallas replicativas ocasionadas por la resistencia [30].

El surgimiento de mutaciones de resistencia en proteasa ocurre en respuesta al inhibidor de proteasa específico que se utiliza, y existen numerosos estudios que han descrito los patrones de mutaciones que se seleccionan con el uso de cada uno de los fármacos empleados [30, 37]. En la cohorte pudo observarse una relación entre el patrón de mutaciones de mayor incidencia (M46I/L, V82A/S, I54V) con el uso del inhibidor más frecuentemente prescrito en el CIENI: LPV/r. Se ha descrito que mutaciones en la posición 82 disminuyen la susceptibilidad a LPV dos veces, y que cuando se seleccionan adicionalmente mutaciones en la posición 54 disminuye la susceptibilidad hasta 10 veces. Finalmente, con la adición de cambios en la posición 46 se disminuye la susceptibilidad hasta 50 veces [37]. Este patrón de mutaciones, al ser el más común en la cohorte, podría explicar la falta de control virológico de los pacientes en estudio. Interesantemente, a pesar de que la mutación de mayor frecuencia L90M, no se ha descrito como una mutación que se seleccione tras el uso de lopinavir [37], sino como una mutación que solo contribuye a un fenotipo resistente, aparece en gran porcentaje en la cohorte. Al estar seleccionada con una alta frecuencia, podría hablarnos de una vía en la que esta mutación se selecciona de manera importante para dar un fenotipo de resistencia característico en la población o, alternativamente, de un evento fundador que aumente la presencia de esta mutación en virus circulantes en México.

Conocidas las mutaciones en proteasa y teniendo establecido que existe una variabilidad evidentemente mayor en *gag* en la cohorte de los pacientes con resistencia a IPs, se buscaron mutaciones específicas que ya han sido previamente reportadas y asociadas con el uso de IPs tanto en la cohorte de estudio como en pacientes vírgenes a tratamiento. Como se esperaba, no todas las mutaciones que se han reportado se encontraron en las cohortes ya

que la evolución viral no sigue el mismo camino en todas las poblaciones [18, 34, 69]. Adicionalmente, se espera que el uso de IPs específicos influya fuertemente en los patrones de mutaciones observados en los virus analizados. Teniendo el patrón de mutaciones de resistencia en *pol* previamente descrito, se esperaría una mayor frecuencia de las mutaciones en *gag* asociadas a este patrón.

Las cuatro posiciones que mostraron significativamente mayor frecuencia en los pacientes con resistencia a IPs, se han asociado en ensayos tanto *in vivo* como *in vitro* al uso de IPs (V128T, A431V, I437T/V, P453ALT) [31, 59, 65] (Fig 6.8). La mutación A431V representa una mutación bien investigada que aparece en concomitancia preferentemente con la mutación M46I/L en proteasa [31, 59, 65], mutación que en la cohorte representa la segunda en frecuencia y bien podría seleccionarse en respuesta al patrón de mutaciones de resistencia en *pol* tras el uso de lopinavir. A431V surge como una mutación compensatoria que favorece al virus incrementando su capacidad replicativa, y por sí misma es capaz de inducir resistencia aún en la ausencia de mutaciones en proteasa [31, 59, 65]. Interesantemente, la mutación V128T que también mostró diferencia significativa en frecuencia entre pacientes con falla a IPs y vírgenes a tratamiento, no se ha asociado con el uso de LPV; sin embargo, parece estarse seleccionando en la población con falla a IPs. La selección de esta mutación podría deberse al uso de fármacos alternos en esquemas con IPs, como atazanavir. Las mutaciones I437 y P453A/L/T también se han asociado con el uso de lopinavir y con las mutaciones en *pol* L90M, I54V, V82A/S [31, 59, 65], mutaciones que mostraron la mayor frecuencia en la cohorte. La mayoría de estas mutaciones en Gag se encontraron precisamente hacia la porción final de Gag p2p7p1p6 mostrando nuevamente evidencia de ser esta región la que presenta mayor respuesta adaptativa en la cohorte estudiada. La limitación en cuanto al número de pacientes, pudo bien impedir que se encontrara un mayor número de mutaciones con diferencia significativa y que aquellas que mostraron una clara tendencia a la significancia muestren valores de $p < 0.05$. La mutación A431V con una alta frecuencia (30%) muestra evidencia de ser la mutación compensatoria principal y que surge en primera

instancia en la población estudiada tras el uso de LPV/r, sin embargo, se requiere invariablemente la inclusión de más pacientes para aseverarlo.

Aunada a las mutaciones V218T, A431V, I437V y P453A/L/T, las mutaciones K436E/R y L449T/P/V, R452S/K, se han reportado como las mutaciones más comunes asociadas en *gag* por el uso de IPs [31, 59, 65]; sin embargo, en la cohorte no tienen porcentajes representativos o no existió una diferencia evidente con los pacientes vírgenes a tratamiento (Tabla 6.5). En particular la mutación L449T/P/V es una de las mutaciones más reportadas para población caucásica y que ha mostrado asociación con el uso de LPV [31, 70]. Dada la baja frecuencia de esta mutación en la cohorte, este es un ejemplo de que la selección de mutaciones es distinta entre poblaciones a pesar del uso del mismo IP. La mutación R452S/K se ha asociado preferentemente al uso de DRV y no LPV, de ahí que su presencia en la cohorte mexicana, donde el uso de DRV es muy poco frecuente, sea nula [31, 70].

El alto porcentaje basal de algunas mutaciones asociadas al uso de IPs en los pacientes vírgenes a tratamiento que se muestra en la Fig. 6.8, habla de polimorfismos que podrían seleccionarse en virus circulantes en población mexicana sin que esto implique una adaptación o respuesta compensatoria al uso de fármacos antirretrovirales, o bien hablándonos de una posible susceptibilidad aumentada al desarrollo de un fenotipo de resistencia una vez que se inicie con un esquema de tratamiento que incluya IPs. La existencia de efectos fundadores previos que pudieran explicar la presencia de dichas mutaciones en virus de pacientes vírgenes a tratamiento debe ser considerada. Así mismo, estas observaciones concuerdan con estudios recientes que muestran una frecuencia de resistencia transmitida de nivel intermedio en virus circulantes en México [16]. En particular la mutación T375N/S, significativamente más frecuente en virus de pacientes vírgenes a tratamiento antirretroviral, y previamente asociada por ensayos *in vivo* al uso de IPs [31] (Tabla 6.4), podría explicarse por eventos de resistencia transmitida, efectos fundadores previos o cambios que surgen por efecto de la presión ejercida por algún alelo HLA específico, que modificarían la susceptibilidad al uso de IPs. Alternativamente, no deben descartarse posibles sesgos geográficos de reclutamiento de los pacientes de ambas cohortes.

El siguiente análisis que se realizó para evaluar presión selectiva por el método de razón de sustituciones sinónimas y no sinónimas permitió observar un panorama general de la conservación de Gag, con una mayor conservación de p24 y una tendencia al cambio en especial en la porción final p2p7p1p6 (Figura 6.5). Dada su importancia funcional, estructural y antigénica, p24 no permite tantos cambios que pudieran impactar la capacidad replicativa del virus y por tanto, se mostró con poca selección positiva [49, 71]. La proteína p6 en cambio, con una mayor densidad de posiciones seleccionadas, reflejó la respuesta adaptativa tanto bajo la presión selectiva inmune, como por la ejercida por el uso de IPs. Este análisis permitió también identificar posiciones bajo presión selectiva que podrían asociarse exclusivamente a la evolución del virus bajo la presión adicional que ejerce el tratamiento. Más aún, este análisis permitió obtener un panorama sobre posiciones bajo presión selectiva compartida en virus bajo presión selectiva inmune y por exposición a IPs, que podrían representar sitios donde la presión por HLA continúa, aún después de la exposición al tratamiento antirretrovira. Interesantemente, los análisis también permitieron observar sitios con evidencia de convergencia entre la presión selectiva inmune y por el tratamiento que pudieran tener un efecto de acorralamiento o doble ventaja en el virus.

Así, para conocer cuántas y cuáles posiciones son exclusivas de la cohorte de pacientes con falla a IPs, se hizo la comparación con todas las posiciones seleccionadas positivamente en los pacientes vírgenes a tratamiento. Dada la diferencia de "N" de las cohortes con las que se obtuvieron las posiciones con evidencia de selección positiva en los pacientes vírgenes a tratamiento (n=500) y con falla a IPs (n=74), se esperaría que exista una mayor potencia para encontrar posiciones en la cohorte de pacientes vírgenes a tratamiento. Esto concuerda con el mayor número de posiciones bajo presión selectiva positiva exclusivas de dicha cohorte observadas en los análisis (Figura 6.11). Esta limitación se auna a un posible sesgo de reclutamiento ya que la cohorte de pacientes vírgenes a tratamiento incluye individuos de todas las regiones del país, mientras que la cohorte de pacientes con falla a IPs incluye individuos casi exclusivamente del centro, pudiéndose evidenciar posiciones con frecuencia de variantes distinta entre individuos de distintas partes del país. Sin

embargo, a pesar de éstas diferencias, el análisis permitió la identificación de posiciones exclusivas R58, A431, F463, Q476 que surgen por efecto de la presión exclusiva que ejerce el uso de IPs. Es probable que con el aumento en el número de secuencias aparezcan nuevas posiciones exclusivas que no se apreciaron por las limitaciones de número o zona geográfica, o que por otro lado, algunas de ellas se pierdan cuando se incluyan pacientes de otras regiones.

Interesantemente, no se encontraron reportes previos de asociación de las variantes exclusivas de la cohorte de pacientes con resistencia a IPs R58K/Q, F463I/L y Q476P/R/K y el uso de IPs, sugiriendo nuevas mutaciones que aparecen en respuesta a la presión exclusiva que ejerce el uso de IPs en nuestra población y que sin duda requieren de una mayor investigación y estudios con una cohorte mas grande. La visualización de las 4 posiciones exclusivas en el árbol filogenético construido no mostró evidencia de agrupación. Se observaron algunos pares de secuencias para las variaciones R58K/Q y F463I/L pero sin soporte de bootstrap (Figura 6.10).

Conjuntando todos los análisis, se obtuvo, un total de 7 posiciones que sugieren ser efecto de la presión exclusiva que ejerce el TAR, específicamente el uso de IPs en la cohorte de estudio. Las mutaciones V128/T, P453A/L/T, I437V, A431V se identificaron por su mayor frecuencia en virus de pacientes con falla a IPs en comparación con los de pacientes vírgenes a tratamiento y las posiciones R58K/Q, F463I/L y Q476P/R/K se identificaron como posiciones bajo presión selectiva positiva exclusivas de la cohorte de pacientes con falla a IPs. La inclusión de estas 7 posiciones exclusivas como parte del análisis conjunto, pretendía una visualización global de la respuesta adaptativa exclusiva a la fuerza que ejercen los IPs. Se estudió la factibilidad de una relación positiva entre el número de mutaciones de resistencia en proteasa y el número de mutaciones en Gag como respuesta de adaptación; sin embargo, no se observó una relación, incluso con los pacientes que en su genotipo presentaron un alto número de mutaciones de resistencia en *pol* (Figura 6.15). Esta apreciación, obliga a voltear la mirada para un estudio más profundo de éstas posiciones y obtener un mejor acercamiento sobre su impacto en la

capacidad replicativa como posibles mutaciones compensatorias que no han sido descritas.

Como ya se mencionó, el análisis por razón de sustituciones sinónimas y no sinónimas permitió encontrar posiciones con evidencia de confluencia de presiones selectivas múltiples en la cohorte mexicana. Era esperado que muchas de las posiciones bajo presión selectiva positiva que se encontraron en los pacientes con resistencia a IPs, se compartieran con los pacientes vírgenes a tratamiento (Figura. 6.11), esto debido a que la presión selectiva ejercida por el sistema inmune se mantiene en los pacientes con falla al tratamiento y es muestra de la alta inmunogenicidad de Gag y la alta concentración de epítomos reconocidos por CTLs en esta región del VIH-1 [49, 58]. La búsqueda de una asociación con alelos HLA-I específicos por el modelo PDN permitió establecer un mejor panorama sobre el papel del sistema inmune como fuerza selectora así como la interacción con la presión ejercida por IPs.

De las posiciones bajo presión selectiva positiva no compartidas entre las cohortes, se encontró asociación de 5 posiciones en pacientes vírgenes a tratamiento, un número pequeño que refleja en parte la falta de potencia del análisis por PDN para identificar nuevas asociaciones, por lo que nuevas secuencias deben ser incluidas en el análisis. En efecto, se ha reportado la necesidad de reunir cohortes de gran tamaño para incrementar la potencia de detección de las asociaciones HLA-polimorfismo de VIH mediante este modelo [60]. Por otro lado, ninguna de las posiciones exclusivas de la cohorte de pacientes con resistencia a IPs se asoció a algún alelo por el análisis de PDN, resultado esperado dado que sugiere que estas posiciones estarían seleccionadas por la presión adicional y exclusiva tras el uso de IPs (Figura 6.13).

De las posiciones que se comparten, solo se logró distinguir la asociación de 5 posiciones con alelos HLA específicos (Figura 6.13). K26 en p17 con el alelo B*15:01, que interesantemente es un alelo común en la población mexicana; la posición S54 también en p17, asociada igualmente al grupo alélico B*15; G248 en p24, asociada con C*04:01, alelo que también es común en nuestra población. Estas asociaciones son evidencia de que los cambios que se

presenten pueden deberse a la presencia del alelo selector y más aún, dentro del contexto inmunogenético mexicano [18]. Dentro del grupo alélico B*15 se han reportado algunos alelos de protección [18], y no se descarta que esta selección positiva por cierto alelo dentro del grupo B*15, pudiera tener impacto negativo en la replicación viral. Las otras dos posiciones T81 y V390 fueron asociadas al uso de IPs y se discutirán más adelante.

Cuando se analizaron las mutaciones que han sido asociadas al uso de IPs dentro de todas las posiciones seleccionadas positivamente para ambas cohortes (Figura 6.12), añadiendo el análisis de asociación con algún alelo HLA-I específico (Figura 6.13), se obtuvieron resultados bastante interesantes. Para este punto, se incluyeron asociaciones con alelos HLA reportadas en el mapa de epítopes confirmados experimentalmente de la Base de Datos de VIH de Los Álamos [61], como un análisis adicional que permitió establecer un panorama más completo sobre la convergencia de presiones selectivas múltiples al explorar posibles asociaciones con HLA adicionales, no detectadas mediante el modelo PDN. Cabe hacer mención, que estas asociaciones son menos específicas ya que a diferencia del análisis por PDN que incluyó exclusivamente secuencias mexicanas, la base de datos de los Álamos muestra alelos que se han reportado experimentalmente para diferentes cohortes, y que sin embargo mostraron coincidencias con alelos que son comunes en población mexicana.

En este contexto de análisis múltiple de posiciones bajo presión selectiva positiva que mostraron simultáneamente asociación con uso de IPs, y con alelos HLA específicos, destaca la mutación A431V exclusiva en los pacientes con resistencia a IPs (Figura. 6.13). Esta mutación no presentó asociación con HLA por el análisis de PDN, pero si presentó asociación con los alelos B*40:02 y B*48:01 por la base de epítopes confirmados de Los Álamos (Tabla 6.12). Interesantemente, este par de alelos son frecuentes en población mexicana [18] y pueden estar seleccionando cambios adicionales a la mutación A431V que pudieran tener un impacto en la susceptibilidad al uso de IPs. Esta posición se encuentra en el tercer sitio del epítope y aunque que se conoce que las posiciones 2 y 9 son las que tienen un mayor impacto en la unión del péptido viral al surco de la molécula HLA, no se descarta que esta tercera posición

podría tener un impacto en la unión del péptido a la molécula HLA o en el reconocimiento del complejo HLA-péptido por el TCR. Se requerirán estudios funcionales adicionales para comprobar esta posible interacción. Adicionalmente, la inclusión de más secuencias al análisis de PDN podría evidenciar esta asociación con HLA hasta ahora no identificada.

De manera inesperada, se observó la posición H219 como una posición con evidencia de presión selectiva exclusiva de la cohorte de pacientes vírgenes a tratamiento, asociada adicionalmente al uso de IPs (Figura 6.13). El polimorfismo específico asociado previamente al uso de IPs es H219Q/P [31]. Interesantemente, esta posición se asoció a los alelos B*35:01, B*39:10, B*40:06 y B*40:02 por la Base de Datos de Los Álamos (Tabla 6.9). Los alelos HLA B*35:01 y B*39:10 son muy frecuentes en población mexicana y esta mutación bien podría surgir por efecto de la respuesta por CTLs debida a la presencia de estos alelos [18]. Adicionalmente, este cambio podría afectar la susceptibilidad a inhibidores de proteasa, afectando por tanto la elección del esquema de tratamiento en los pacientes que presentasen los alelos HLA en cuestión. Por otro lado, H219 es una posición aleadaña a un eptílope restringido por el alelo B*40:02 que también es frecuente en nuestra población, pudiendo representar una mutación de procesamiento del péptido presentado por esta molécula HLA. Esta posición tampoco se encontró por el análisis por PDN, la inclusión de un mayor número de secuencias no descarta la posibilidad de identificarla posteriormente.

Por otro lado, las posiciones bajo presión selectiva positiva que resultaron compartidas para ambas cohortes son las que pueden dar evidencia de la confluencia entre presiones selectivas y de este análisis surgieron posiciones de interés para explorar esta posibilidad. En total, se encontró asociación con HLA de 5 de las 8 posiciones compartidas y asociadas al uso de IPs: T81 y V390 tanto por el análisis de PDN (Figura 6.13) como por la base de datos de Los Álamos (Tabla 6.9), y E12, I389 y S373 por la base de datos de Los Álamos (Tabla 6.9). La posición I389 tuvo asociación con el grupo alélico HLA A*11. En nuestra población el alelo que muestra mayor frecuencia dentro de este grupo es A*11:01 y podría ser el selector de cambios en esta posición [18]. Dado que la variante I389T se ha asociado a selección por uso de IPs, la

selección por HLA en esta posición bien podría afectar la susceptibilidad al tratamiento por IPs con posibles efectos de acorralamiento o doble ventaja para el virus [34]. Interesantemente, el porcentaje de la mutación I389T en las cohortes fue alto con un 17% en pacientes con resistencia a IPs y de un 20% en pacientes vírgenes a tratamiento (Tabla 6.5). El mismo panorama se observa con la posición S373 que mostró asociación con B*45:01, B*40:02 y A*02:01. Estos dos últimos alelos HLA son frecuentes en nuestra población [18] y bien podrían ser los selectores de variantes en esta posición incluyendo a S373P/Q/T, aparentemente asociadas a selección por IPs. Esta posición es de interés porque se encuentra en el motivo de corte p2/NC, y presentó un alto grado de polimorfismo que superó el 30% (Tabla 6.5). En específico, la asociación de la posición S373 con A*02:01 podría ser como una mutación de escape asociada al procesamiento del péptido viral presentado por este alelo HLA, al encontrarse la posición adyacente al epítipo.

La posición E12K mostró asociación con los alelos A*11 y B*40:02 que siendo comunes en nuestra población [18] no se descarta sean responsables del polimorfismo observado en dicha posición, pudiendo además impactar en la susceptibilidad a IPs. Es característico un alto porcentaje de esta mutación asociada al uso de IPs tanto en pacientes con resistencia a IPs (28.4%) como en pacientes vírgenes a tratamiento (32.0%) (Tabla 6.5). En la cohorte se observa además, el polimorfismo E12Q que podría ser seleccionado por dichos alelos con impacto en la susceptibilidad al uso de IPs y que no ha sido reportado hasta el momento.

Los resultados más interesantes se obtuvieron con las posiciones T81 y V390. La posición T81 mostró asociación con los alelos B*15:03 y el grupo alélico C*14 por el análisis de PDN (Figura 6.13) y con el alelo A*02:01 por la base de datos de Los Álamos (Tabla 6.9). Del grupo alélico C*14 se tiene como alelo frecuente en nuestra población el alelo C*14:02 [18]. El alelo B15:03 también es frecuente en México [18]. Dado que el análisis por PDN indica el tipo de asociación, se obtuvo que con B*15:03 la posición 81 presenta escape hacia el aminoácido T, la cual representa la variante no adaptada, es decir, que la presencia del alelo HLA hace que se tenga cualquier aminoácido excepto T. Por otro lado, con C*14 la posición 81 presenta escape hacia T, variante no

adaptada y atracción hacia A, variante adaptada; es decir, que la presencia de algún alelo perteneciente al grupo C*14 (posiblemente C*14:02 en el contexto inmunogenético mexicano), hace que se presente el cambio T81A, que es la mutación precisamente asociada al uso de IPs. Este escenario sugiere una fuerte evidencia de doble escape viral gracias a la confluencia de presiones selectivas múltiples. Ya que por un lado el uso de IPs origina la mutación T81A reportada y por otro lado, la presencia de ciertos alelos que son comunes en nuestra población orillan a la no presencia del aminoácido silvestre (T) y a la presencia de A. Aunque los porcentajes de la mutación de doble escape son bajos con un 5.41% en pacientes con resistencia a IPs y 2.67% en vírgenes a tratamiento no se descarta la presencia de otros cambios no reportados que igualmente tengan un efecto de doble ventaja para el virus [34] como el polimorfismo T81L que también se encuentra presente en la cohorte. Adicionalmente el alelo A*02:01, también frecuente en la población, podría ocasionar variaciones que también impacten la susceptibilidad al tratamiento y confieran doble ventaja al virus.

Dado que la base de datos de los Álamos no mostró asociación de T81 con los alelos B*15 y C*14, se buscó predecir con la herramienta Motifscan disponible en línea en la Base de Datos de Los Álamos [61] posibles epítopes previamente no reportados que pudieran asociarse con la posición en cuestión. La herramienta Motifscan se basa en motivos de reconocimiento principalmente definidos por las posiciones de anclaje 2 y 9 del péptido, para predecir epítopes en secuencias de distintas proteínas de VIH. Para el caso del alelo B*15:03 no se encontró ningún epítope, sin embargo para el grupo alélico C*14 se encontró el siguiente epítope: **lYn tvatlYc** [61], lo cual nos da evidencia que efectivamente puede haber un epítope hasta ahora no reportado para C*14, específicamente C*14:02 en nuestro contexto inmunogenético, que pudiera estar reconociendo a la posición T81. Debe mencionarse que el hecho de no encontrar epítopes predichos con la herramienta Motifscan, no implica que estos no existan ya que los algoritmos de predicción son limitados.

En el escenario contrario, la posición V390, mostró asociación con B*27:05 por PDN y con A*11 por la base de datos de Los Álamos. La asociación con B*27:05 mostró escape de I, variante no adaptada, es decir que la presencia del alelo tiende a la no presencia de I, o bien a la conservación del aminoácido V. Este escenario sugiere un posible acorralamiento viral ya que la presencia de IPs estaría orillando a un cambio V390I y el alelo HLA B*27:05 favorecería un cambio I390V. En este escenario, la variante resistente a IPs, sería blanco de la respuesta inmune, limitando la aparición de resistencia en el virus al acorralarlo entre las dos presiones selectivas opuestas [34]. Cabe aclarar que la mutación asociada a IPs V390A/D no se observó en ninguna de las dos cohortes y que el polimorfismo que se observó con una alta frecuencia en la cohorte estudiada fue precisamente V390I. No se descarta la posibilidad de que esta variante tenga un papel en la resistencia a IPs. De la misma manera, no se descarta que B*27:05, en conjunto con A*11 orillen a otros cambios que tiendan igualmente al no desarrollo de la mutación asociada a IPs. Tal como en el caso de la posición T81, utilizando la herramienta Motifscan de la base de datos de Los Álamos se predijo un epítipo de B*27:05, que podría explicar la asociación de este alelo HLA con la posición V390: $qRKivKcfn$ [61].

Dada esta evidencia, la inclusión de más pacientes resulta esencial para explorar más a profundidad estas asociaciones, así como la inclusión de estudios funcionales específicos para confirmar las asociaciones observadas, así como el efecto de acorralamiento o doble ventaja viral observadas en el presente estudio. Estos estudios podrían basarse en el desarrollo de péptidos que incluyan estas variaciones y medir la capacidad de respuesta por CTLs estimulados con dichos péptidos en pacientes con los alelos HLA-I específicos. Ensayos fenotípicos de resistencia que permitan conocer las mutaciones en Gag asociadas al uso de IPs que se van seleccionando también pueden considerarse. Debe reconocerse que una de las limitaciones importantes de este estudio es que se desconoce la tipificación de los alelos HLA para cada paciente con falla a IPs, la cual podría darnos una evidencia más específica de los análisis mostrados. La tipificación HLA a partir de plasma sanguíneo podría

incluirse en posteriores estudios para obtener resultados más completos y eliminar posibles sesgos geográficos. La Figura 7.1 resume los resultados de posiciones asociadas simultáneamente a presión selectiva por exposición a IPs y por presión selectiva por HLA.

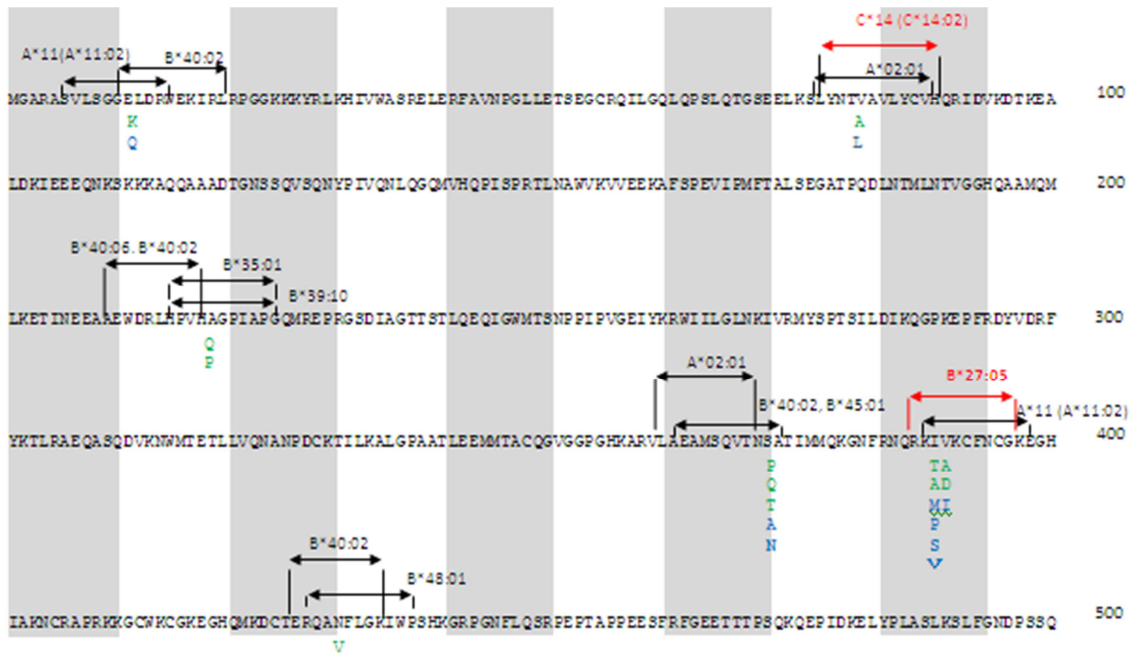


Figura 7.1. Mapa del gen gag mostrando posiciones asociadas simultáneamente a selección por IPs y a selección por HLA en la cohorte de pacientes mexicanos con resistencia a IPs. Se muestra un resumen de todas las posiciones asociadas a IPs con alelos HLA específicos, sobre la secuencia consenso de los virus de la cohorte de pacientes con resistencia a IPs. Se indican en verde las mutaciones asociadas a IPs y en azul otros polimorfismos que se presentan en las secuencias. Se muestran en negro posibles epítotos confirmados experimentalmente que podrían explicar las asociaciones observadas con alelos HLA específicos. Se muestran también en rojo epítotos predichos con la herramienta Motifscan de la Base de Datos de VIH de Los Alamos, que podrían explicar algunas de las asociaciones observadas con HLA. Para los grupos alélicos en los que existe la asociación, se muestra en paréntesis el alelo común en la población mexicana. El diagrama permite tener una apreciación más completa sobre la interacción entre presiones selectivas múltiples en el contexto inmunogenético mexicano.

Finalmente, una aportación interesante del presente estudio fue el estudio de presión selectiva en diferentes marcos de lectura en la región de traslape de los genes *gag* y *pol*. Al tomar en cuenta el marco de lectura para la proteína de traslape p6*, se obtuvieron resultados interesantes que permiten apreciar que el efecto de la presión selectiva, es capaz de afectar diferentes marcos de lectura. En los últimos años, se han realizado numerosos estudios sobre el funcionamiento de esta proteína de traslape, determinándose que las regiones N-terminal y C-terminal son las regiones conservadas y relevantes para la función principal de la proteína: la regulación a la baja de la actividad de proteasa y la modulación de la señal de corrimiento en el marco de lectura [26, 27, 66]. Mutaciones en la región N-terminal se asocian a la producción de viriones con menor infectividad por alteración en la señal de corrimiento en el marco de lectura, que conlleva a una producción exclusiva del precursor Pr55^{gag} sin la traducción de *pol*. Mutaciones dirigidas a la región C-terminal tienen como consecuencia directa el no auto-procesamiento de proteasa que se refleja en una actividad enzimática mermada, alterando el procesamiento global del precursor de Pr55^{gag}. Inserciones o deleciones incluso casi del 60% de la secuencia de aminoácidos en la región central, parecen no tener efecto en la infectividad y/o capacidad replicativa del virus [26, 27].

A pesar de que la funcionalidad de la proteína p6* está restringida a los extremos terminales, se han descrito dos mutaciones asociadas al uso de IPs D437N y V484G/I/P/S [31]. La mutación D437N se encuentra al inicio de la proteína, se encontró presente con un alto porcentaje (67.57%) en la cohorte de pacientes con resistencia a IPs (Tabla 6.5) y adicionalmente se encontró seleccionada positivamente. Esta posición, podría tener un impacto tanto en la eficiencia del corrimiento del marco de lectura como en el desarrollo de fenotipo de resistencia, y es una primera evidencia sobre el efecto de presiones selectivas múltiples en diferentes marcos de lectura. Adicionalmente, se encontraron 4 posiciones seleccionadas positivamente que coinciden en ambos marcos de lectura; sin embargo, sólo una de ellas no es coincidente entre los virus de los pacientes vírgenes a tratamiento y de los pacientes con resistencia a IPs: F463. La posición F463 se constituye entonces como una posición exclusiva de la cohorte de pacientes con resistencia a IPs con una frecuencia

de 17.6%, que se encuentra bajo presión selectiva positiva en ambos marcos de lectura y que además no ha sido reportada como mutación asociada al uso de IPs. Esta posición constituye un sitio importante para posteriores estudios. Si bien, las posiciones seleccionadas positivamente hacia la porción media de la proteína pueden no tener un impacto en cuanto a la funcionalidad de p6*, no se descarta un impacto que en conjunto con otras mutaciones dentro de *gag*, generen un fenotipo resistente.

Aunque es necesario aumentar el número de la cohorte estudiada para confirmar las asociaciones observadas y para incrementar la capacidad de detección de las asociaciones existentes, en su conjunto, el presente estudio logró mostrar características únicas evolutivas de virus bajo múltiples presiones selectivas, con la identificación de posiciones exclusivas bajo presión selectiva positiva que surgen por la presión adicional que ejerce el tratamiento antirretroviral, específicamente tras el uso de IPs. Fue característica una mayor variabilidad mostrada en las secuencias de virus de pacientes con resistencia a IPs en comparación con virus de pacientes vírgenes a tratamiento, especialmente hacia la porción final p2p7p1p6. Nuestro estudio mostró evidencia de que la selección positiva a lo largo de la poliproteína puede asociarse a alelos HLA-I específicos. Interesantemente, nuestros análisis mostraron evidencia de sitios en el genoma viral donde existe confluencia entre presiones selectivas. En particular, se demostró la factibilidad de existencia de posiciones bajo presiones selectivas opuestas, que limitarían la variabilidad del virus y posiciones asociadas con doble ventaja para el virus al permitirle escapar simultáneamente de la presión selectiva inmune y farmacológica. Las posiciones bajo presión selectiva compartidas entre pacientes con falla a IPs y pacientes vírgenes a tratamiento, son fuertes candidatas para la exploración de la interacción y confluencia de presiones selectivas múltiples con posibles efectos de acorralamiento viral o de doble ventaja en el virus, como las posiciones T81 y V390 hasta ahora no descritas. En este estudio se demuestra la factibilidad de interacción entre presiones selectivas en el contexto inmunogenético mexicano, al mostrar asociaciones con alelos HLA que son frecuentes en nuestra población y que podrían representar características únicas de la evolución de *gag* en población mexicana. Finalmente se mostró

evidencia que la presión selectiva en el ámbito de resistencia a IPs es capaz de afectar diferentes marcos de lectura y que la consideración de marcos de lectura múltiples en regiones específicas del genoma viral es relevante para el entendimiento de la adaptación viral y para la generación de posibles estrategias de control viral.

CAPÍTULO VIII. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.

1. Conclusiones.

A través de la metodología descrita se lograron obtener las secuencias para una cohorte de 74 pacientes mexicanos infectados por VIH-1 subtipo B con mutaciones de resistencia a IPs en *pol*, constituyendo una cohorte con una mayor representatividad de la zona centro del país enriquecida con pacientes en etapas crónicas de la enfermedad. Se logró la determinación de las distancias filogenéticas entre los pacientes, sin evidencia de clusters, lográndose identificar sólo algunos pares de secuencias aunque sin soporte de bootstrap.

Se identificaron a las mutaciones en *pol* de mayor frecuencia en la cohorte, mostrando un patrón de mutaciones en respuesta al inhibidor de Proteasa mayormente preescrito en el CIENI: lopinavir/ritonavir. Se logró demostrar una respuesta evolutiva en *gag* en respuesta al uso de IPs, reflejada en una mayor variabilidad en especial hacia la porción final p2p7p1p6 y la proteína p6, en comparación con pacientes vírgenes a tratamiento. Esta mayor variabilidad se logró demostrar también, en posiciones específicas en los motivos de corte a lo largo del polipéptido Pr55^{gag}.

Con los resultados obtenidos y en comparación con lo previamente reportado, se lograron identificar mutaciones exclusivas en Gag asociadas al uso de IPs con diferencia significativa en los pacientes con resistencia a IPs (V128/T, P453A/L/T, I437V, A431V), e interesantemente con pacientes vírgenes a tratamiento que pueden sugerir eventos fundadores previos o TDR.

Mediante la obtención de posiciones con evidencia de selección positiva, se pudo encontrar posiciones que son exclusivas de la cohorte y que surgen en respuesta exclusiva a la presión selectiva ejercida por IPs. Estas posiciones no se han descrito previamente en otras cohortes ni con asociación con el uso de IPs (R58K/Q, F463I/L, Q476P/R/K).

Este primer acercamiento de la evolución de *gag* bajo presión selectiva múltiple, logró la identificación de posiciones que muestran ser evidencia de la confluencia entre presiones selectivas, obteniéndose un primer mapa de

posiciones candidatas a efectos de acorralamiento viral o doble escape en el contexto inmunogenético mexicano. Finalmente se pudo demostrar que la presión selectiva múltiple es capaz de afectar diferentes marcos de lectura.

2. Perspectivas.

A pesar de que el presente estudio muestra ya evidencia de la respuesta evolutiva de *gag* en virus bajo presiones selectivas múltiples con la identificación de posiciones exclusivas que surgen por efecto de la presión ejercida por IPs, así como posiciones en las que convergen dichas presiones; el estudio debe llevarse a cabo con un mayor número de pacientes. La obtención de una cohorte más grande que incluya además otras regiones del país, podría ayudar a encontrar posiciones adicionales que caractericen mejor a los virus en este contexto de presión selectiva múltiple.

Así mismo, con la inclusión de un mayor número de secuencias para mejorar la potencia del análisis por PDN hace viable encontrar nuevas asociaciones con alelos HLA-I específicos. Una de las perspectivas importantes incluye la tipificación de alelos HLA-I en los pacientes, para encontrar resultados más específicos en cuanto a la confluencia de presión selectiva múltiple y que además considere sesgos geográficos. Así, los resultados encontrados pueden extrapolarse a la población de una manera más representativa considerando el contexto inmunogenético mexicano.

El presente estudio se verá enriquecido, con la inclusión de ensayos de capacidad replicativa que evalúen el posible impacto compensatorio y/o de resistencia de las posiciones exclusivas que se encontraron y que además no han sido previamente asociadas al uso de IPs. Así mismo, estos ensayos pueden medir el impacto de las posiciones candidatas que mostraron evidencia de confluencia entre presiones selectivas con efecto de doble ventaja o acorralamiento viral. El desarrollo de péptidos para medir la respuesta por CTLs de HLA-I específicos a través de metodologías como Elispot ayudarán a tener un panorama más completo de la evolución viral en este contexto. Estos estudios se están llevando a cabo actualmente en el grupo de Evolución y Epidemiología del CIENI.

Este tipo de estudios en los que se muestre evidencia de la evolución viral bajo presiones selectivas múltiples, debe llevarse a cabo en otras poblaciones con contextos inmunogenéticos diferentes. Esto permitirá incrementar el conocimiento para la optimización en la elección del tratamiento antirretroviral que considere la individualización de los esquemas, considerando la evolución de genes específicos en el virus en cierto contexto inmunogenético y con ello llegar a un éxito terapéutico en los pacientes.

CAPÍTULO IX. BIBLIOGRAFÍA.

1. Hoffmann-Rockstroh-Kamps, *HIV Medicine*. 14 ed2006: Amedeo. 825.
2. Bernard N. Fields, D.M.K., Peter M. Howley, *Virology Fields*. Quinta edición ed. Vol. volume 2. 2007, USA. 3177.
3. Córdoba Villalobos, J.A.P.d.L.R.S., Valdespino, J. L. , *25 años de SIDA en México. Logros, desaciertos y retos*. Segunda edición ed2009, México: México: Instituto Nacional de Salud Pública. 450.
4. Freed, E.O., *HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle*. *Virology*, 1998. **251**(1): p. 1-15.
5. Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas, C., *30 AÑOS DEL VIH-SIDA PERSPECTIVAS DESDE MÉXICO*. Primera edición ed2011, México. 240.
6. VIH/SIDA, C.N.p.I.P.y.C.d. and (CENSIDA). *INFORME NACIONAL DE AVANCES EN LA LUCHA CONTRA EL SIDA*. 2012.
7. Centro Nacional para la Prevención y el Control del VIH y el SIDA, C., *Vigilancia Epidemiológica de casos de VIH/SIDA en México Registro Nacional de Casos de SIDA. Actualización al 30 de Junio del 2012*, 2012: México. p. 50.
8. Infomed, *Resumen mundial de la epidemia de VIH/sida 2010*, 2012.
9. Sida, C.N.p.I.P.y.C.d., *Guía de Manejo Antirretroviral de las Personas con VIH*, 2012: México. p. 285.
10. del, C.N.p.I.P.y.C. and VIH/SIDA, *El VIH/SIDA en México 2011* 2011: México. p. 38.
11. Rowland-Jones, S.L., *Timeline: AIDS pathogenesis: what have two decades of HIV research taught us?* *Nat Rev Immunol*, 2003. **3**(4): p. 343-8.
12. Centro Nacional para la Prevención y el Control del VIH y el SIDA, C., *PANORAMA EPIDEMIOLÓGICO DEL VIH/SIDA E ITS EN MÉXICO. REGISTRO NACIONAL DE CASOS DE SIDA - ACTUALIZACIÓN PRELIMINAR HASTA LA SEMANA 52 DEL 2012*, 2012: México. p. 50.
13. SIDA, C.N.p.I.P.y.C.d.V., *El VIH/SIDA en México 2011 Numeralia*. 2011.
14. Van Heuverswyn, F. and M. Peeters, *The origins of HIV and implications for the global epidemic*. *Curr Infect Dis Rep*, 2007. **9**(4): p. 338-46.
15. Geretti, A.M., *HIV-1 subtypes: epidemiology and significance for HIV management*. *Curr Opin Infect Dis*, 2006. **19**(1): p. 1-7.
16. Avila-Rios, S., et al., *National prevalence and trends of HIV transmitted drug resistance in Mexico*. *PLoS One*, 2011. **6**(11): p. e27812.
17. McCutchan, F.E., *Global distribution of HIV-1 recombinants and subtypes. IAVA report*, 2003.
18. Avila-Rios, S., et al., *Unique features of HLA-mediated HIV evolution in a Mexican cohort: a comparative study*. *Retrovirology*, 2009. **6**: p. 72.
19. Gómez -Carrillo M.; Salomon, H.P., M.A.; Kijak, G.; Avila *Distribución de subtipos y recombinantes del HIV situación en la Argentina*. 2001. **61**, 881-889.
20. Spira, S., et al., *Impact of clade diversity on HIV-1 virulence, antiretroviral drug sensitivity and drug resistance*. *J Antimicrob Chemother*, 2003. **51**(2): p. 229-40.
21. Fauci, A.S.K., D.L.; Braunvald, E.; Hauser S.L.; Longo, D.L.; Jameson, J.L.; Loscalzo, J, *Harrison principios de medicina interna*. 17 edición ed2006.
22. Freed, E.O., *HIV-1 and the host cell: an intimate association*. *Trends Microbiol*, 2004. **12**(4): p. 170-7.
23. Gottlinger, H.G., et al., *Effect of mutations affecting the p6 gag protein on human immunodeficiency virus particle release*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(8): p. 3195-9.
24. Fujii, K., J.H. Hurley, and E.O. Freed, *Beyond Tsg101: the role of Alix in 'ESCRTing' HIV-1*. *Nat Rev Microbiol*, 2007. **5**(12): p. 912-6.

25. Garrus, J.E., et al., *Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding*. Cell, 2001. **107**(1): p. 55-65.
26. Chiu, H.C., et al., *Effects of human immunodeficiency virus type 1 transframe protein p6* mutations on viral protease-mediated Gag processing*. J Gen Virol, 2006. **87**(Pt 7): p. 2041-6.
27. Paulus, C., C. Ludwig, and R. Wagner, *Contribution of the Gag-Pol transframe domain p6* and its coding sequence to morphogenesis and replication of human immunodeficiency virus type 1*. Virology, 2004. **330**(1): p. 271-83.
28. Girnary, R., et al., *Structure-function analysis of the ribosomal frameshifting signal of two human immunodeficiency virus type 1 isolates with increased resistance to viral protease inhibitors*. J Gen Virol, 2007. **88**(Pt 1): p. 226-35.
29. Peng, C., et al., *Role of human immunodeficiency virus type 1-specific protease in core protein maturation and viral infectivity*. J Virol, 1989. **63**(6): p. 2550-6.
30. Shafer, R.W. and J.M. Schapiro, *HIV-1 drug resistance mutations: an updated framework for the second decade of HAART*. AIDS Rev, 2008. **10**(2): p. 67-84.
31. Fun, A., et al., *Human Immunodeficiency Virus Gag and protease: partners in resistance*. Retrovirology, 2012. **9**: p. 63.
32. Fun, A., *Determinants of the development and evolution of HIV-1 drug resistance*, 2012: Netherlands. p. 152.
33. Shafer, R.W., R. Kantor, and M.J. Gonzales, *The Genetic Basis of HIV-1 Resistance to Reverse Transcriptase and Protease Inhibitors*. AIDS Rev, 2000. **2**(4): p. 211-228.
34. Avila-Rios, S., G. Reyes-Teran, and E. Espinosa, *Cornering HIV: taking advantage of interactions between selective pressures*. Med Hypotheses, 2007. **69**(2): p. 422-31.
35. Valle-Bahena, O.M., et al., *Frequency of protease and reverse transcriptase drug resistance mutations in naive HIV-infected patients*. Arch Med Res, 2006. **37**(8): p. 1022-7.
36. Clavel, F. and A.J. Hance, *HIV drug resistance*. N Engl J Med, 2004. **350**(10): p. 1023-35.
37. University, H.D.R.D.-S., *HIV Drug Resistance Database - Stanford University*, 2012.
38. Aoki, M., et al., *Non-cleavage site gag mutations in amprenavir-resistant human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) predispose HIV-1 to rapid acquisition of amprenavir resistance but delay development of resistance to other protease inhibitors*. J Virol, 2009. **83**(7): p. 3059-68.
39. Larrouy, L., et al., *Gag mutations can impact virological response to dual-boosted protease inhibitor combinations in antiretroviral-naive HIV-infected patients*. Antimicrob Agents Chemother, 2010. **54**(7): p. 2910-9.
40. Mammano, F., C. Petit, and F. Clavel, *Resistance-associated loss of viral fitness in human immunodeficiency virus type 1: phenotypic analysis of protease and gag coevolution in protease inhibitor-treated patients*. J Virol, 1998. **72**(9): p. 7632-7.
41. Barrie, K.A., et al., *Natural variation in HIV-1 protease, Gag p7 and p6, and protease cleavage sites within gag/pol polyproteins: amino acid substitutions in the absence of protease inhibitors in mothers and children infected by human immunodeficiency virus type 1*. Virology, 1996. **219**(2): p. 407-16.
42. Zhang, Y.M., et al., *Drug resistance during indinavir therapy is caused by mutations in the protease gene and in its Gag substrate cleavage sites*. J Virol, 1997. **71**(9): p. 6662-70.
43. Ho, S.K., et al., *Drug-associated changes in amino acid residues in Gag p2, p7(NC), and p6(Gag)/p6(Pol) in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) display a dominant effect on replicative fitness and drug response*. Virology, 2008. **378**(2): p. 272-81.
44. Verheyen, J., et al., *Compensatory mutations at the HIV cleavage sites p7/p1 and p1/p6-gag in therapy-naive and therapy-experienced patients*. Antivir Ther, 2006. **11**(7): p. 879-87.
45. Dam, E., et al., *Gag mutations strongly contribute to HIV-1 resistance to protease inhibitors in highly drug-experienced patients besides compensating for fitness loss*. PLoS Pathog, 2009. **5**(3): p. e1000345.

46. Nijhuis, M., et al., *Increased fitness of drug resistant HIV-1 protease as a result of acquisition of compensatory mutations during suboptimal therapy*. AIDS, 1999. **13**(17): p. 2349-59.
47. Kawashima, Y., et al., *Adaptation of HIV-1 to human leukocyte antigen class I*. Nature, 2009. **458**(7238): p. 641-5.
48. Goepfert, P.A., et al., *Transmission of HIV-1 Gag immune escape mutations is associated with reduced viral load in linked recipients*. J Exp Med, 2008. **205**(5): p. 1009-17.
49. Brumme, Z.L., et al., *Human leukocyte antigen-specific polymorphisms in HIV-1 Gag and their association with viral load in chronic untreated infection*. AIDS, 2008. **22**(11): p. 1277-86.
50. Frahm, N., et al., *Consistent cytotoxic-T-lymphocyte targeting of immunodominant regions in human immunodeficiency virus across multiple ethnicities*. J Virol, 2004. **78**(5): p. 2187-200.
51. Leslie, A., et al., *Additive contribution of HLA class I alleles in the immune control of HIV-1 infection*. J Virol, 2010. **84**(19): p. 9879-88.
52. 1. Abbas, A.K.L., A.H.; Pillai, S. , *Cellular and Molecular Immunology*. seventh ed2012, United States: Elsevier. 513.
53. Goulder, P.J. and D.I. Watkins, *Impact of MHC class I diversity on immune control of immunodeficiency virus replication*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(8): p. 619-30.
54. Espinosa, E., *[Finding the traces of the HIV selection]*. Rev Latinoam Microbiol, 2006. **48**(2): p. 84-90.
55. Karlsson, A.C., et al., *Dual pressure from antiretroviral therapy and cell-mediated immune response on the human immunodeficiency virus type 1 protease gene*. J Virol, 2003. **77**(12): p. 6743-52.
56. Bezemer, D., et al., *Evolution of transmitted HIV-1 with drug-resistance mutations in the absence of therapy: effects on CD4+ T-cell count and HIV-1 RNA load*. Antivir Ther, 2006. **11**(2): p. 173-8.
57. Kiepiela, P., et al., *Dominant influence of HLA-B in mediating the potential co-evolution of HIV and HLA*. Nature, 2004. **432**(7018): p. 769-75.
58. Mueller, S.M., et al., *Dual selection pressure by drugs and HLA class I-restricted immune responses on human immunodeficiency virus type 1 protease*. J Virol, 2007. **81**(6): p. 2887-98.
59. Bally, F., et al., *Polymorphism of HIV type 1 gag p7/p1 and p1/p6 cleavage sites: clinical significance and implications for resistance to protease inhibitors*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2000. **16**(13): p. 1209-13.
60. Carlson, J.M., et al., *Phylogenetic dependency networks: inferring patterns of CTL escape and codon covariation in HIV-1 Gag*. PLoS Comput Biol, 2008. **4**(11): p. e1000225.
61. Inmunología, L.Á.B.d.D.d., *Los Álamos Base de Datos de Inmunología 2012*.
62. Parry, C.M., et al., *Gag determinants of fitness and drug susceptibility in protease inhibitor-resistant human immunodeficiency virus type 1*. J Virol, 2009. **83**(18): p. 9094-101.
63. van Maarseveen, N.M., et al., *Modulation of HIV-1 Gag NC/p1 cleavage efficiency affects protease inhibitor resistance and viral replicative capacity*. Retrovirology, 2012. **9**: p. 29.
64. Zennou, V., et al., *Loss of viral fitness associated with multiple Gag and Gag-Pol processing defects in human immunodeficiency virus type 1 variants selected for resistance to protease inhibitors in vivo*. J Virol, 1998. **72**(4): p. 3300-6.
65. Cote, H.C., Z.L. Brumme, and P.R. Harrigan, *Human immunodeficiency virus type 1 protease cleavage site mutations associated with protease inhibitor cross-resistance selected by indinavir, ritonavir, and/or saquinavir*. J Virol, 2001. **75**(2): p. 589-94.

66. Leiherer, A., C. Ludwig, and R. Wagner, *Uncoupling human immunodeficiency virus type 1 Gag and Pol reading frames: role of the transframe protein p6* in viral replication*. J Virol, 2009. **83**(14): p. 7210-20.
67. Barquera, R., et al., *HLA class I and class II haplotypes in admixed families from several regions of Mexico*. Mol Immunol, 2008. **45**(4): p. 1171-8.
68. Mammano, F., et al., *Retracing the evolutionary pathways of human immunodeficiency virus type 1 resistance to protease inhibitors: virus fitness in the absence and in the presence of drug*. J Virol, 2000. **74**(18): p. 8524-31.
69. Kolli, M., S. Lastere, and C.A. Schiffer, *Co-evolution of nelfinavir-resistant HIV-1 protease and the p1-p6 substrate*. Virology, 2006. **347**(2): p. 405-9.
70. Maguire, M.F., et al., *Changes in human immunodeficiency virus type 1 Gag at positions L449 and P453 are linked to I50V protease mutants in vivo and cause reduction of sensitivity to amprenavir and improved viral fitness in vitro*. J Virol, 2002. **76**(15): p. 7398-406.
71. Martinez-Picado, J., et al., *Fitness cost of escape mutations in p24 Gag in association with control of human immunodeficiency virus type 1*. J Virol, 2006. **80**(7): p. 3617-23.
72. Alva-Selma, trabajo de tesis "Impacto de mutaciones en el gen gag en la capacidad replicativa del VIH en el contexto inmunogenético de la población mexicana