



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

ANÁLISIS GENOTÍPICO DE RESISTENCIA A INHIBIDORES DE  
FUSIÓN EN VIH CIRCULANTE EN LAS POBLACIONES  
MEXICANA Y GUATEMALTECA

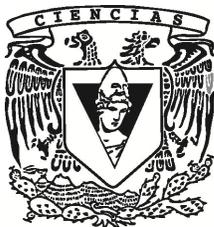
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

MARÍA ELENA PACHECO MARTÍNEZ



DIRECTOR DE TESIS:  
DR. SANTIAGO ÁVILA RÍOS  
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.



# **ANÁLISIS GENOTÍPICO DE RESISTENCIA A INHIBIDORES DE FUSIÓN EN VIH CIRCULANTE EN LAS POBLACIONES MEXICANA Y GUATEMALTECA**

TESIS  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
BIÓLOGA  
PRESENTA:

**María Elena Pacheco Martínez**

Director de Tesis:  
**Dr. Santiago Ávila Ríos**

Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIENI)  
Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INER)

Facultad de Ciencias  
Universidad Nacional Autónoma de México  
2013



Quiero agradecer a mis padres por la formación que me han dado y por todo su apoyo a lo largo de mi vida. A mi hermana por su presencia incondicional, a mis amigos por aligerar momentos pesados y por las incontables risas, a mi tutor el Dr. Santiago Ávila Ríos y a Maribel Soto por todo lo que me enseñaron, al CIENI-INER y al Dr. Gustavo Reyes Terán por permitirme realizar el presente trabajo y a Frida Sommer por su ayuda y compañía durante la realización de esta tesis.

Este proyecto recibió financiamiento del gobierno mexicano (Comisión de Equidad y Género de la H. Cámara de Diputados), Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICyTDF, PIRIVE09-18) y Fundación México Vivo.

# Índice

0. Resumen.....	9
1. Introducción.....	9
1.1 El origen de la pandemia.....	9
1.2 El VIH en el mundo.....	10
1.3 El VIH en México y Guatemala.....	12
1.3.1 El VIH en México.....	12
1.3.2 El VIH en Guatemala.....	16
1.4 Naturaleza del VIH.....	18
1.4.1 Ciclo de replicación.....	23
1.4.2 Progresión de la infección por VIH y respuesta inmune.....	28
1.5 gp41 y la respuesta inmune humoral.....	31
1.6 gp41 y la respuesta inmune celular.....	33
1.7 Fármacos antirretrovirales.....	35
1.7.1 Inhibidores de la fusión.....	36
1.8 Resistencia transmitida.....	38
2. Planteamiento del problema.....	39
3. Objetivos.....	40
3.1 Objetivos generales.....	40
3.2 Objetivos particulares.....	40
4. Hipótesis.....	41
5. Métodos.....	41
5.1 Selección de pacientes.....	41
5.2 Extracción de RNA.....	42

5.3 Amplificación de DNA.....	42
5.4 Secuenciación.....	44
5.5 Alineamiento de secuencias.....	45
5.6 Análisis de resistencia.....	46
5.7 Análisis de variabilidad.....	46
5.8 Análisis filogenético.....	48
5.9 Análisis de presión selectiva.....	48
<b>6. Resultados.....</b>	<b>49</b>
6.1 Cohorte.....	49
6.2 Análisis de resistencia.....	52
6.2.1 Resistencia transmitida a inhibidores de fusión en México.....	53
6.2.2 Resistencia transmitida a inhibidores de fusión en Guatemala.....	54
6.2.3 Relaciones filogenéticas entre virus con polimorfismos en posiciones asociadas a resistencia.....	56
6.2.4 Impacto de los polimorfismos en posiciones asociadas a resistencia en la capacidad replicativa viral.....	59
6.3 Análisis de variabilidad en la proteína gp41.....	61
6.3.1 Análisis de variabilidad en gp41 de VIH circulante en México.....	61
6.3.2 Análisis de variabilidad en gp41 de VIH circulante en Guatemala.....	62
6.3.3 Comparación de variabilidad en gp41 de VIH circulante en México y Guatemala.....	63
6.4 Análisis de presión de selección por modelo de codones.....	64
6.4.1 Obtención de secuencias consenso de gp41 para VIH circulante en México y Guatemala.....	67
6.5 Posibles asociaciones entre la presión selectiva inmune y los sitios bajo presión selectiva positiva en gp41 en las secuencias consenso de gp41 para VIH circulante en México y Guatemala.....	69

6.6 Análisis filogenético de las secuencias de gp41 de virus circulantes en México y Guatemala.....71

7. Discusión.....73

8. Conclusión.....78

9. Literatura citada.....79

## 0. Resumen

La descripción de la prevalencia de resistencia transmitida a inhibidores de fusión y la descripción de la variabilidad genética de gp41 del virus de inmunodeficiencia humana (VIH), blanco importante para posibles estrategias antirretrovirales, son importantes para el manejo de la epidemia de VIH actual, en especial para pacientes con resistencia a múltiples familias de fármacos antirretrovirales. En este trabajo se determinó la prevalencia de resistencia a inhibidores de fusión en VIH circulante en las poblaciones mexicana y guatemalteca; también se analizó el impacto que el contexto inmunogenético de las poblaciones ejerce sobre el gen *gp41* del virus y finalmente se compararon ambas cohortes evolutivamente en un árbol filogenético. Éste es el primer trabajo que describe a este gen en cualquiera de estas poblaciones y es esencial para evaluar la posibilidad del uso de inhibidores de fusión en las anteriores. Se obtuvieron muestras de RNA de pacientes del protocolo de epidemiología del Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIENI) y del proyecto mesoamericano del CIENI que recibe muestras del Hospital Roosevelt de Guatemala, la región correspondiente al gen *gp41* de éstas fue amplificada por reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR), secuenciadas y analizadas. Se encontró una prevalencia de resistencia del 2% en México y 3.8% en Guatemala. En todos los casos la mutación de resistencia fue G36D.

## 1. Introducción

### 1.1 El origen de la pandemia

En 1981 comenzaron a registrarse en EUA casos de inmunosupresión profunda manifestada por neumonía (por *Pneumocistis carinii* y *jiroveci*), también se reportaron casos de sarcoma de Kaposi, todos en hombres jóvenes homosexuales y se definió a éste como un grupo de riesgo. Ese año se registraron más de 20 casos en EUA. Para fines de 1983 la Organización Mundial de la Salud (OMS) registró la presencia de este síndrome en 15 países de Europa y en 1984 se

reportaron más de 12 mil casos a nivel mundial. Debido al cuadro clínico que presentaban los pacientes, caracterizado por un bajo conteo de linfocitos T CD4+, aún sin saber cuál era el agente causal de la patología, se decidió llamar a esta enfermedad "Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida" (SIDA). A causa de que los principales grupos de riesgo que manifestaban SIDA eran hombres jóvenes homosexuales sexualmente activos, hemofílicos y personas que habían recibido transfusiones de sangre, se determinó que la enfermedad era infecciosa y sus medios de transmisión eran la vía sexual y sanguínea [1].

En 1983 el grupo de Luc Montagnier del Instituto Pasteur en París encontró en sobrenadantes de células de pacientes con SIDA evidencia de la presencia de la enzima transcriptasa reversa, característica de la familia viral *Retroviridae*. Este descubrimiento lo llevó a describir un nuevo retrovirus que en un inicio llamó LAV (Virus Asociado a Linfadenopatía). Con la colaboración de otros investigadores se clasificó al nuevo patógeno dentro del grupo de los lentivirus y fue rebautizado como Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), agente causal del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) [1]. En 2008 Montagnier, en compañía de Françoise Barré-Sinoussi y Harald zur Hausen recibieron el premio nobel de medicina por este descubrimiento.

## 1.2 El VIH en el mundo

ONUSIDA (Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre VIH/SIDA), división de la Organización Mundial de la Salud (OMS), estima que para finales de 2011 había aproximadamente 34 millones de personas en el mundo viviendo con VIH/SIDA; de estos, 2.5 millones son niños. La proporción global total de género arroja que un poco menos del 52% son mujeres y la región más afectada por la epidemia es África sub-sahariana con el 68% de los casos totales. En la Figura 1.2.1 se esquematiza por país la prevalencia de VIH a nivel global en 2011. A pesar de que un poco más de la mitad de los casos de VIH en el mundo ocurren en mujeres, en las regiones donde la epidemia está concentrada en grupos de riesgo (Europa, Asia, América, Oceanía) la infección es primordialmente masculina. En África sub-sahariana y el Caribe

se reportan una mayor cantidad de casos femeninos a causa de la desigualdad de género y trata de personas [2].

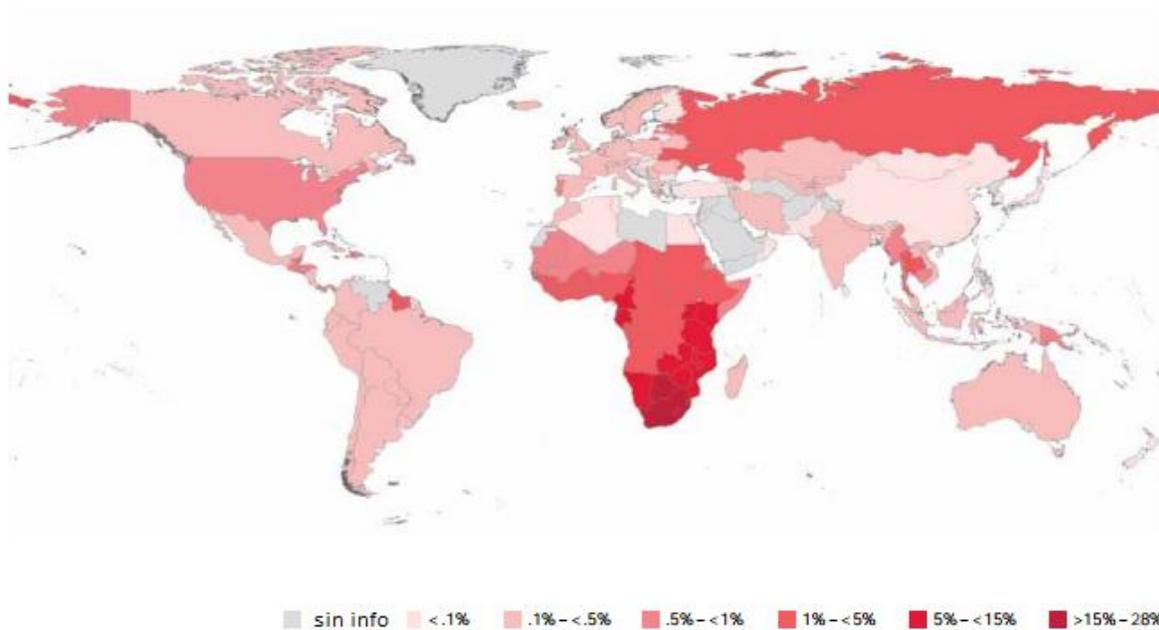


Figura 1.2.1 Prevalencia mundial de VIH/SIDA. Se muestran los niveles de incidencia de VIH a nivel global hasta 2011. ONUSIDA [2].

El número anual de nuevas infecciones a nivel mundial ha disminuido a 2.6 millones en 2009 a comparación de 3.2 millones en 1997, año en que llegó a su máximo mundial la cantidad de nuevas infecciones (figura 1.2.2); a finales de 2011 este número disminuyó a 2.5 millones [2].

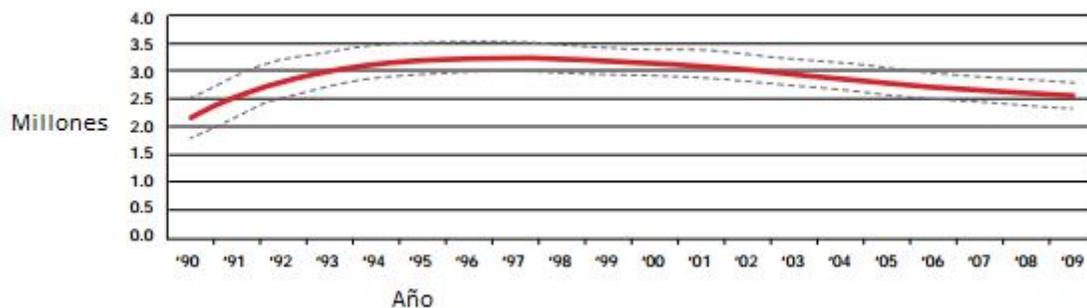


Figura 1.2.2 Número de nuevas infecciones globales por año. Se muestran los números totales a nivel mundial de infecciones por VIH, se aprecia que 1997 fue el año con mayor incidencia de nuevas infecciones. Las líneas punteadas indican el mayor y menor estimado. ONUSIDA [2].

El acceso a terapia antirretroviral y cuidado médico han logrado disminuir las muertes asociadas a SIDA de 2.1 millones en 2004 (año en el que comenzó a expandirse el uso de la terapia antirretroviral) a 1.8 millones en 2009 (figura 1.2.3); para finales de 2011 hubo un estimado de 1.7 millones de muertes relacionadas a SIDA a nivel global.

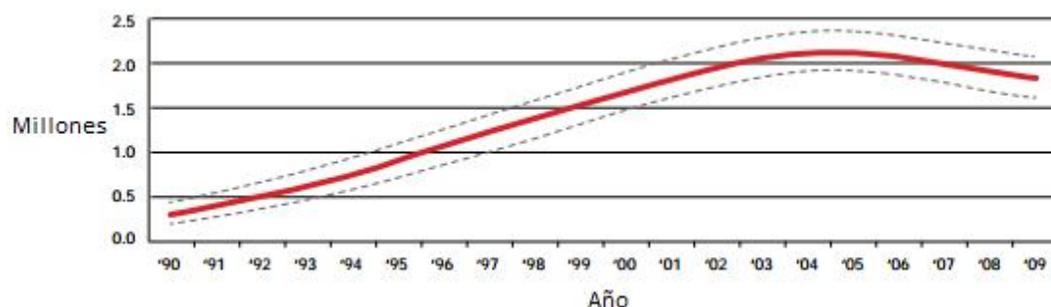


Figura 1.2.3 Muertes asociadas a VIH. Números totales de muertes causadas por VIH a nivel mundial, a partir de 2004 comenzaron a disminuir las fatalidades gracias a la expansión del uso de la terapia antirretroviral. ONUSIDA [2].

## 1.3 VIH en México y Guatemala

### 1.3.1 El VIH en México

Desde la aparición del primer caso en México en el año de 1983, el VIH ha tenido una prevalencia relativamente baja en comparación con la de otros países (0.3% en la población adulta de 15 a 49 años) [1]. El patrón de transmisión del virus en México es dominado por la vía sexual entre hombres, aunque el uso de drogas intravenosas y sexo sin protección con trabajadores sexuales también figuran como vías de transmisión importantes. En el país la epidemia se encuentra concentrada en estos grupos.

Según ONUSIDA hasta el año 2011 había entre 169,443-213,363 personas viviendo con VIH/SIDA en el país, de las cuales 32,000 eran mujeres adultas (mayores de 15 años). En 2011 se reportaron 4,900 muertes relacionadas con VIH/SIDA como se esquematiza en la Figura 1.3.1.1.

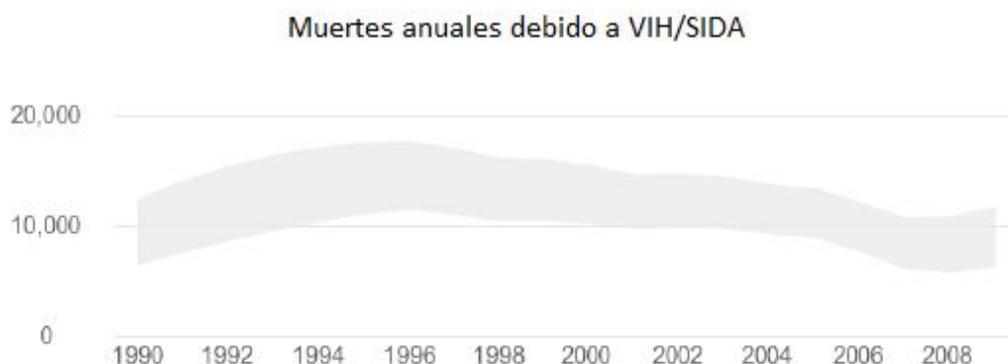


Figura 1.3.1.1 Número de muertes causadas por VIH/SIDA en México. Se muestra desde la década de los 90 la tendencia en muertes por VIH/SIDA en el país. Datos ONUSIDA [3].

En las poblaciones de alto riesgo en 2011 la prevalencia de la infección se distribuyó según las siguientes tendencias (Tabla 1.3.1): Hombres que tienen Sexo con Hombres (HSH) presentando una prevalencia del 16.99%, seguidos de Hombres Trabajadores Sexuales (HTS) con 18.24 %, los Usuarios de Drogas Intravenosas (UDI) con 7% y las Mujeres Trabajadoras Sexuales (MTS) con 0.63% [3]

Tabla 1.3.1 Prevalencia de VIH en poblaciones de riesgo en el país en 2011.

<b>Población</b>	<b>Todos</b>	<b>Hombre</b>	<b>Mujer</b>
<b>Trabajadores sexuales</b>	<b>1.06%</b>	<b>18.24%</b>	<b>0.63%</b>
<b>HSH</b>	<b>16.99%</b>		
<b>UDI</b>	<b>7.02%</b>	<b>6.46%</b>	<b>8.31%</b>

HSH=Hombres que tienen sexo con hombres. UDI=Usuarios de drogas intravenosas. Datos tomados de [3].

Existen focos rojos de la infección en la frontera México-Estados Unidos. Se ha reportado una prevalencia del 12% en trabajadoras sexuales que utilizan drogas intravenosas en Ciudad Juárez y Tijuana. Estos puntos epidémicos tienen un alto potencial de crecimiento. En un estudio realizado en Tijuana entre mujeres embarazadas se encontró que la prevalencia del VIH era del 1%, mientras que en aquellas que utilizaban drogas intravenosas la prevalencia era del 6% [3].

En 1997 se estimaba la presencia de 13,000 personas con VIH en el país; de estos sólo la mitad tenía acceso a terapia antirretroviral gratuita (la mayoría a través de instituciones de Seguridad Social). Un año después, la Secretaría de Salud amplió la cobertura a mujeres embarazadas y personas menores de 18 años sin seguridad social. En 1999 comenzó el plan para el acceso universal a fármacos antirretrovirales, y para 2008 27,474 personas sin seguridad social recibían gratuitamente los fármacos mediante un programa gubernamental y el 59% de las 47,000 personas que utilizaban terapia antirretroviral obtenían sus fármacos facilitados por el gobierno. Actualmente todos los estados del país cuentan con un Programa Estatal de VIH/SIDA [1]. En la Figura 1.3.1.2 se muestra el número de personas en México hasta 2008 con acceso libre a fármacos antirretrovirales y se indica si éstos son derechohabientes de seguridad social. El número total de personas utilizando terapia antirretroviral aumentó a 72,000 en 2011 [2].

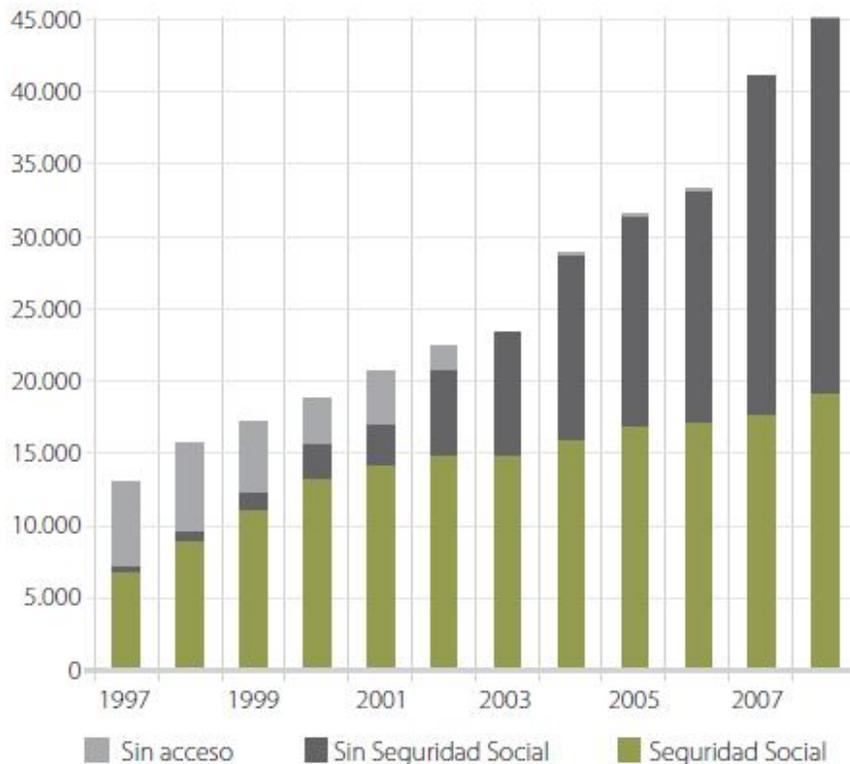


Figura 1.3.1.2 Número de personas con acceso libre a antirretrovirales en México. Se muestra la cantidad acumulada de personas con acceso libre a antirretrovirales en México hasta 2008 y se indica si son o no derechohabientes de seguridad social [1].

El gasto en terapia antirretroviral con recursos federales también ha aumentado drásticamente, de 40.5 mdp (millones de pesos, moneda nacional) en el año 2000 a 1,558 mdp en 2008. En la Figura 1.3.1.3 se muestran los antirretrovirales adquiridos por la Secretaría de Salud en 2008 y el número de pacientes que los utilizan [1].

ANTIRRETROVIRAL (ES)	NÚMERO DE PACIENTES RECIBIENDO EL FÁRMACO (CORTE EL 31 DE DICIEMBRE DEL 2008)	COMPAÑÍA FARMACÉUTICA
Abacavir 300mg	2 536	genérico
Abacavir Solucion	183	genérico
Abacavir + Lamivudina	1 307	Glaxo Smith Kline
Atazanavir 150 Mg	2 833	Bristol-Myers Squibb
Zidovudina + Lamivudina 150/300 Mg	6 732	Glaxo Smith Kline
Darunavir	75	Janssen-Cilag
Didanosina 100mg	94	genérico
Didanosina 250 Mg	336	Bristol-Myers Squibb
Didanosina 400 Mg	1 746	Bristol
Efavirenz 600 Mg	11 799	Merck Sharp and Dohme
Emtricitabina 200 Mg	1 811	Stendhal
Enfuvirtida	54	Roche
Estavudina 15mg	87	genérico
Estavudina 40mg	678	genérico
Fosamprenavir	343	Glaxo Smith Kline
Lopinavir/Ritonavir 200/50 Mg	5 244	Abbott
Lopinavir/Ritonavir Solucion	479	Abbott
Lamivudina 150 Mgs	1 048	Glaxo Smith Kline
Lamivudina Solucion	880	Glaxo Smith Kline
Nevirapina 200 Mg	2 713	Promeco
Nevirapina Solucion	119	Promeco
Raltegravir	60	Merck Sharp and Dohme
Ritonavir	2 055	Abbott
Saquinavir 500 Mg	2 565	Roche
Tenofovir	1 413	Stendhal
Tenofovir + Emtricitabina 300/200 Mg	12 678	Stendhal
Tipranavir	339	Promeco
Zidovudina 100mg	236	genérico
Zidovudina 250mg	963	genérico
Zidovudina Solución	1 108	genérico

Figura 1.3.1.3 Fármacos antirretrovirales adquiridos por la secretaría de salud y número de pacientes empleándolos. En azul se resalta el inhibidor de la fusión enfuvirtida [1].

A partir de 2007 el Fondo de Protección Contra Gastos Catastróficos subministra la totalidad de los fondos. En la Figura 1.3.1.4 se esquematiza desde 2009 el porcentaje de cobertura de terapia antirretroviral en pacientes con un conteo de linfocitos T CD4+ menor a 350 [3].



Figura 1.3.1.4 Porcentaje de pacientes con acceso a antirretrovirales con CD4 < 350. Porcentaje de cobertura de terapia antirretroviral en pacientes con un conteo de linfocitos T CD4+ menor a 350 de 2009 a 2011 [3].

Gracias al acceso universal a fármacos antirretrovirales y a estrategias del gobierno en materia de prevención y de combate a la discriminación y homofobia se han logrado reducir en los últimos años las muertes asociadas a SIDA, las cuales disminuyeron en un 7.8% entre 2008 y 2010; en la figura 1.3.1.5 se muestra la correlación negativa entre la cobertura de terapia antirretroviral y las muertes debidas a VIH/SIDA [3].



Figura 1.3.1.5 Acceso de antirretrovirales vs. muertes por VIH/SIDA. Correlación negativa entre el número de pacientes en terapia antirretroviral y las muertes relacionadas a VIH/SIDA por año desde 1990 [3].

### 1.3.2 El VIH en Guatemala

En Guatemala se han reportado 27,474 casos de VIH desde 1984 hasta 2011, la transmisión es por vía sexual en el 93.84% de los casos, de madre a hijo en 5.08% y el resto representa el 0.99%

de los casos totales; dos tercios de todos los casos se reportan en personas de entre 20 a 39 años de edad y la prevalencia en la población general es de 0.8%. La infección se encuentra concentrada en las poblaciones de alto riesgo, para el 2012 la prevalencia en HSH fue de 18%, en jóvenes en riesgo social fue de 3.3% y entre trabajadoras sexuales fue de 1.09%; a su vez la prevalencia de la infección se relaciona negativamente con el nivel educativo como se muestra en la figura 1.3.2.

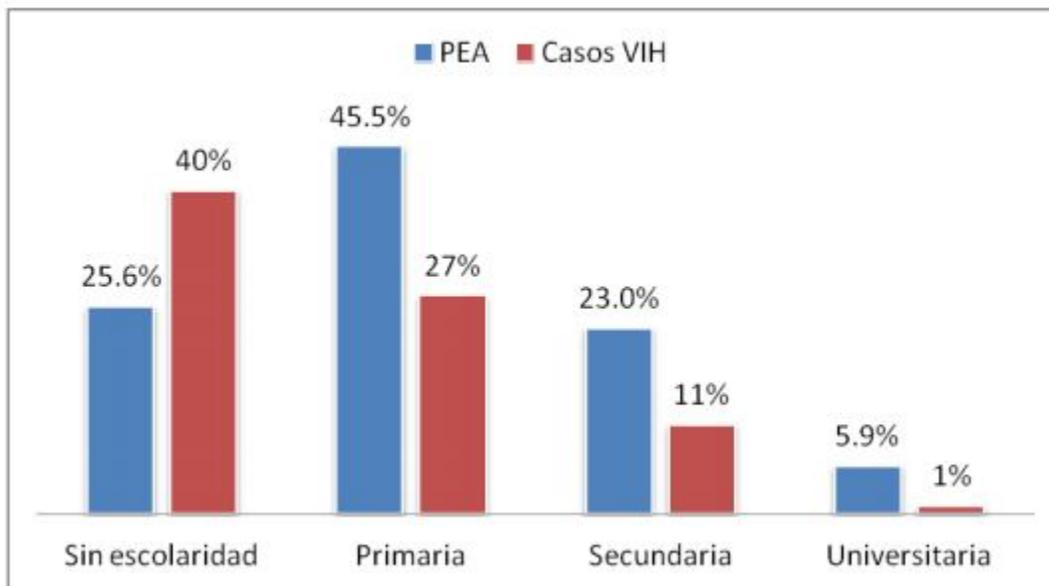


Figura 1.3.2 Aportación de los casos totales de VIH de la PEA (Población Económicamente Activa) en Guatemala. Se muestra la correlación negativa entre el nivel educativo y el porcentaje de casos totales de VIH en el país, se observa que el grupo sin escolaridad aporta el mayor porcentaje de casos de VIH mientras que la población con educación universitaria aporta el porcentaje más pequeño [3].

A partir de 2004 Guatemala cuenta con una subvención del Fondo Mundial para uso en la lucha contra el VIH/SIDA, aunado a esto el país emplea recursos gubernamentales y privados que se emplean primordialmente en la compra de fármacos antirretrovirales, las cantidades en millones de dólares se muestran en la tabla 1.3.2.

Tabla 1.3.2 Gasto en SIDA por fuente de financiamiento de 2004 a 2010 (millones de dólares). Tomada de [3].

SECTOR	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Público	\$13.9	\$12.7	\$15.6	\$29.0	\$32.5	\$26.3	\$28.8
Internacion	\$3.1	\$6.4	\$10.1	\$11.7	\$15.0	\$14.5	\$12.9
Privado	\$2.4	\$2.7	\$3.8	\$2.9	\$3.8	\$4.2	\$4.4
TOTAL	\$19.4	\$21,8	\$29,5	\$43,6	\$51,3	\$45	\$46,1

## 1.4 Naturaleza del VIH

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es un lentivirus de la familia *Retroviridae*, cuyo genoma está conformado por dos hebras sencillas de RNA+. Estos virus presentan típicamente tres genes [4]:

1. *env*: codifica para la proteína gp160 que es posteriormente cortada en el retículo endoplásmico de la célula y origina dos proteínas: gp120, implicada en el reconocimiento y unión al receptor CD4 y al correceptor, y gp41, encargada de mediar la fusión de la membrana viral y celular.
2. *gag*: codifica para una poliproteína que es procesada por la proteasa viral y que forma las proteínas estructurales.
3. *pol*: codifica para las enzimas virales proteasa, transcriptasa reversa (RT) e integrasa.

Además de estos genes el VIH-1 posee dos regiones promotoras LTR (*Long Terminal Repeat*) para la transcripción y seis marcos de lectura abiertos (ORF) que codifican para seis proteínas accesorias [4]:

1. *vif*: factor de infectividad viral.
2. *vpu*: proteína viral U.
3. *nef*: efector negativo.
4. *tat*: activador transcripcional.
5. *rev*: regulador de la expresión génica viral.
6. *vpr*: proteína viral R.

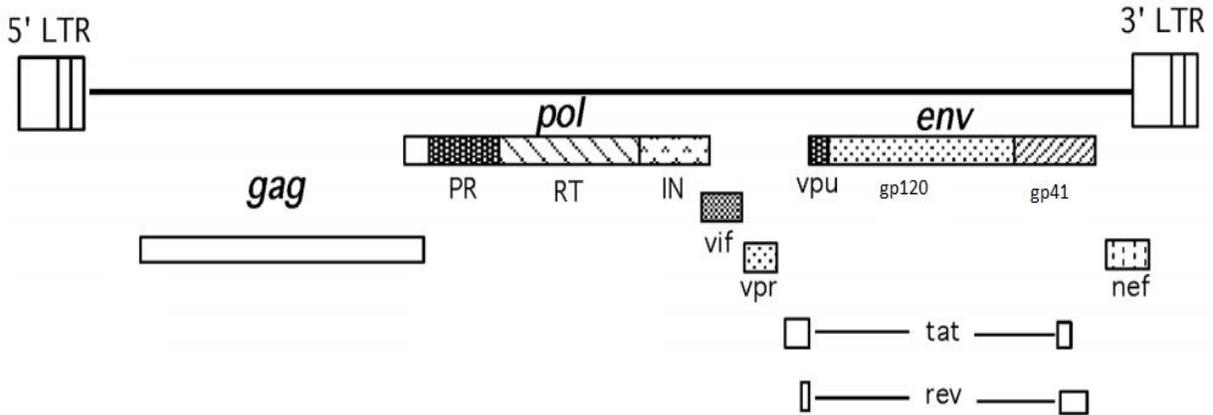


Figura 1.4.1 Genoma del VIH-1. Se esquematizan los genes del VIH. Modificado de [5].

### *Env:*

La proteína de la envoltura consta de 856 aminoácidos y es la única que se encuentra expuesta en la superficie del virus lo cual la hace susceptible al ataque por anticuerpos. El gen *env* codifica la formación de una sola proteína llamada gp160, ésta es procesada por las proteasas celulares y origina dos proteínas maduras, la proteína de superficie gp120 y la proteína transmembranal gp41. Durante el ensamblaje de las partículas virales el complejo gp120/gp41 es incorporado como espículas heterotriméricas en la membrana (tomada de la célula durante la gemación del virión) de los nuevos virus. Este complejo gp120/gp41 es el encargado de iniciar el proceso de infección mediante la unión de gp120 al receptor CD4 y al correceptor CCR5 o CXCR4 en la superficie de la célula blanco y posteriormente el trímero gp41 es el encargado de mediar el proceso de fusión de las membranas celular y viral. El mecanismo mediante el cual Env es incorporado a las partículas virales no está completamente descrito, sin embargo se presume que la cola citoplasmática de gp41 y el dominio de matriz de Gag juegan un papel crucial en el proceso de incorporación de Env. Aún no se han definido cuáles son los factores celulares que promueven la incorporación de Env ni el papel de microdominios membranales específicos [6].

### *Gag:*

Las proteínas codificadas por el gen *gag* tienen una naturaleza estructural y son necesarias para el ensamble de las partículas virales, sin embargo también son cruciales en la maduración de los viriones y durante la replicación del virus. Cada uno de los dominios en Gag desempeña diversas

funciones y por lo tanto deben interactuar con otras proteínas de Gag, otras proteínas virales, consigo mismas, lípidos, ácidos nucleicos y proteínas de la célula hospedera. Durante el proceso de maduración del virión la proteasa viral (codificada por el gen *pol*) procesa a la poliproteína Gag y la corta en distintas proteínas: la proteína de la matriz p17, la proteína de la cápside p24, la proteína de la nucleocápside p7 y p6 que es necesaria para la gemación del virus de la célula [5].

#### *Pol:*

El gen *pol* es el encargado de codificar las enzimas virales y es transcrito en conjunto con *gag*. Las proteínas de *pol* son: la transcriptasa reversa o retrotranscriptasa que se encarga de retrotranscribir el genoma del virus de RNA a DNA para que este pueda insertarse en el genoma del hospedero, la proteasa que procesa las poliproteínas formadas por los genes *gag* y *pol* permitiendo así la maduración y funcionamiento adecuado de las nuevas partículas virales, y la integrasa cuya función es integrar el genoma retrotranscrito del virus en el genoma nuclear del hospedero [7].

#### *Vif:*

El factor de infectividad viral (Vif) tiene el efecto de contrarrestar la respuesta antiviral del hospedero mediada por la familia de desaminasas APOBEC3 y consecuentemente es esencial en la replicación viral. La manera en que las contrarresta es mediante poliubiquitinación, la cual lleva a APOBEC3 a la vía de degradación del proteosoma [8].

#### *Vpu:*

La proteína viral U sólo se encuentra en el VIH-1, su función es contrarrestar a la teterina celular, la cual retiene a los viriones recién gemados en la superficie de la célula e impide su liberación. Vpu elimina a la teterina mediante una co-precipitación con ésta e induce la degradación proteosomal, también utiliza la vía de degradación asociada al retículo endoplásmico (ERAD), ésta media la dislocación de proteínas de membrana del retículo endoplásmico al citoplasma para una subsecuente degradación proteosomal. La identificación

de la unión entre teterina y Vpu provee un blanco potencial para una nueva estrategia antirretroviral [9].

#### *Nef:*

El efector negativo (Nef) protege a las células infectadas de ser lisadas por las células T citotóxicas (CTLs), para esto Nef interfiere con la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC-I, el cual es necesario para el reconocimiento de las células infectadas por parte de las CTLs), otra de las funciones de Nef es la de interrumpir la expresión de múltiples receptores celulares, esto lo logra mediante distintos mecanismos y no se ha aclarado en qué manera Nef causa ésta gran cantidad de alteraciones. Se ha encontrado evidencia de que Nef es una proteína adaptable y es capaz de unirse a distintos dominios según el blanco celular al que está unida [10].

#### *Tat:*

El activador transcripcional (Tat) es un factor que induce un amplio espectro de reacciones en distintos tipos celulares. En el promotor LTR actúa como un potente transactivador de expresión génica mediante la inducción de una remodelación de la cromatina y por el reclutamiento de complejos transcripcionales competentes para la elongación al LTR. Aunada a estas actividades Tat también es liberada al exterior de la célula e interactúa con receptores de membrana de distintas células, Tat también puede ser internalizada por las células a través de un proceso de endocitosis [11].

#### *Rev:*

El regulador de la expresión génica viral (Rev) es una proteína de 116 aminoácidos, su principal función es controlar la expresión génica del virus y para esto necesita controlar la tasa de exportación de mRNA, para lograrlo la proteína incluye una secuencia de localización nuclear y una secuencia de exportación nuclear, cuando la proteína se sintetiza en el citoplasma ésta se une a importinas que la transportan al núcleo; una vez dentro del núcleo Rev se une a mRNA y es posteriormente exportado al citoplasma como un complejo Rev/mRNA [12].

*Vpr:*

La proteína viral R es una proteína accesoria multifuncional esencial para la infección efectiva de los linfocitos T CD4+ y macrófagos. Vpr es integrada a los viriones y funge como transporte para el complejo de preintegración (PIC) al núcleo. Esta actividad es particularmente relevante en la infección de macrófagos los cuales resultan más difíciles de infectar debido a su estado de no proliferación. Además de esto Vpr es la proteína encargada de activar la transcripción del LTR viral, detiene el ciclo celular, y otras contribuciones que promueven la disfuncionalidad de las células T. La interacción de Vpr en vías de señalización celular de macrófagos promueve la acumulación de reservorios virales en células de linaje mieloide. El papel de Vpr en el ciclo de replicación viral así como sus efectos en células del sistema inmune parece ser importante en la patogénesis del SIDA. Dadas sus múltiples funciones Vpr es un blanco interesante para el desarrollo de nuevas estrategias antirretrovirales [13].

En la figura 1.4.2 se muestra la manera en que las proteínas mencionadas se ensamblan para formar a la partícula viral.

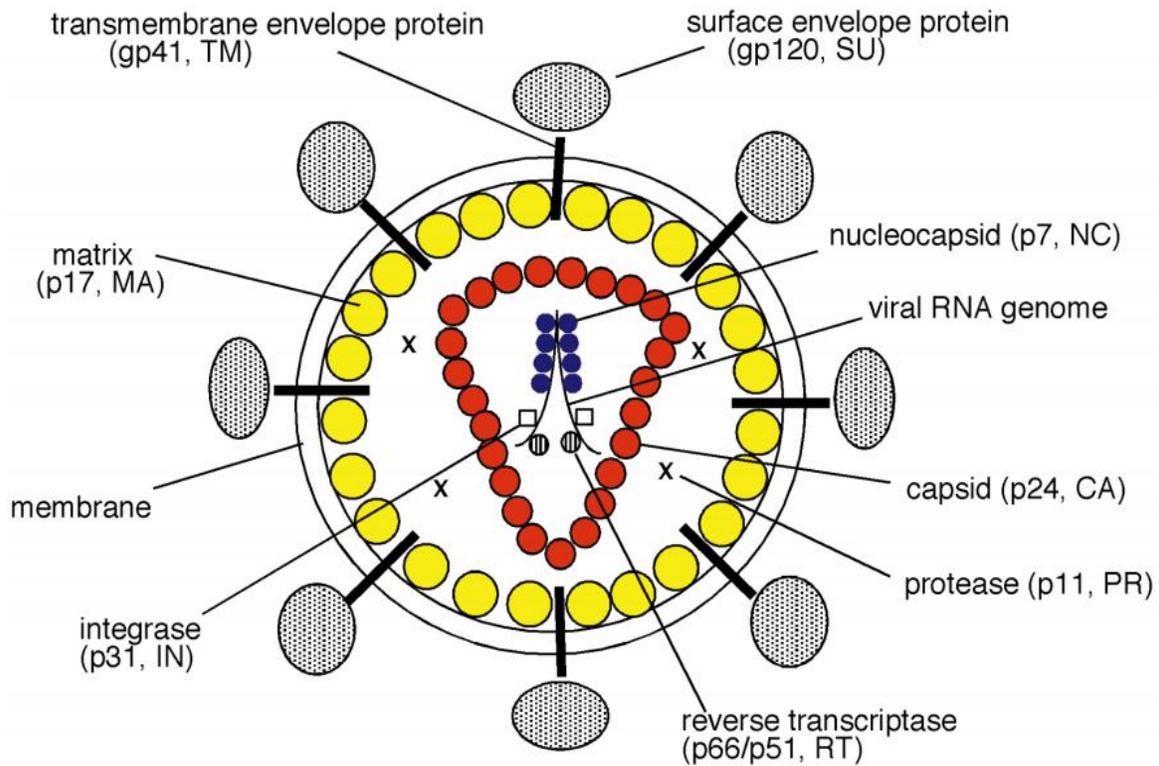


Figura 1.4.2. Partícula del virus de la inmunodeficiencia humana. Se señalan cada una de las proteínas producto de los genes principales del VIH (*env*, *gag* y *pol*) mencionadas en la sección 1.4 [5].

### 1.4.1 Ciclo de replicación.

Una vez dentro del organismo, la proteína de superficie gp120 del virus se une a su receptor CD4 en las células del hospedero. Esta unión conlleva una serie de modificaciones estructurales en las proteínas de la envoltura viral. Tras la unión con el receptor se producen ciertos cambios conformacionales que exponen la región V3 (variable 3) de gp120. Esta región se une a uno de los correceptores del virus (interacción necesaria para la infección) que típicamente son los receptores de quimiocinas CCR5 o CXCR4. La unión con el correceptor permite que gp120 se disocie de gp41 y comience propiamente el proceso de fusión de membranas [14].

La proteína gp41 es un trímero transmembranal en la superficie del virus, unido a gp120 de manera no covalente [14]. Su segmento externo está formado por un péptido de fusión hidrofóbico N-terminal, dos dominios heptaméricos N- y C- terminales HR1 y HR2

respectivamente, un dominio transmembranal y una cola citoplasmática [15]. En la figura 1.4.1.1 se esquematizan los dominios de la proteína.

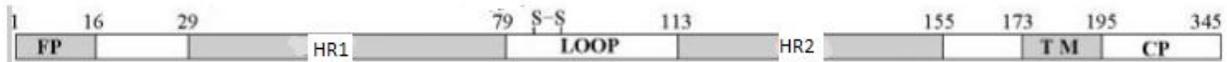


Figura 1.4.1.1 Dominios de gp41. Se muestran las regiones de la proteína gp41. Modificado de [16]. FP= péptido de fusión, HR1= región heptamérica 1, HR2= región heptamérica 2, TM= dominio transmembranal y CP= cola citoplasmática. Modificado de [16].

Los cambios conformacionales en gp120 causan la exposición de los péptidos de fusión de gp41 y la formación de los dominios heptaméricos HR1 y HR2. Después de la inserción del péptido de fusión a la membrana plasmática, HR2 se une a HR1 para formar una estructura estable de seis hélices, que facilita la unión de la membrana viral a la membrana celular y ultimadamente su fusión [17]. La entrada del virus a la célula se muestra en la figura 1.4.1.2.

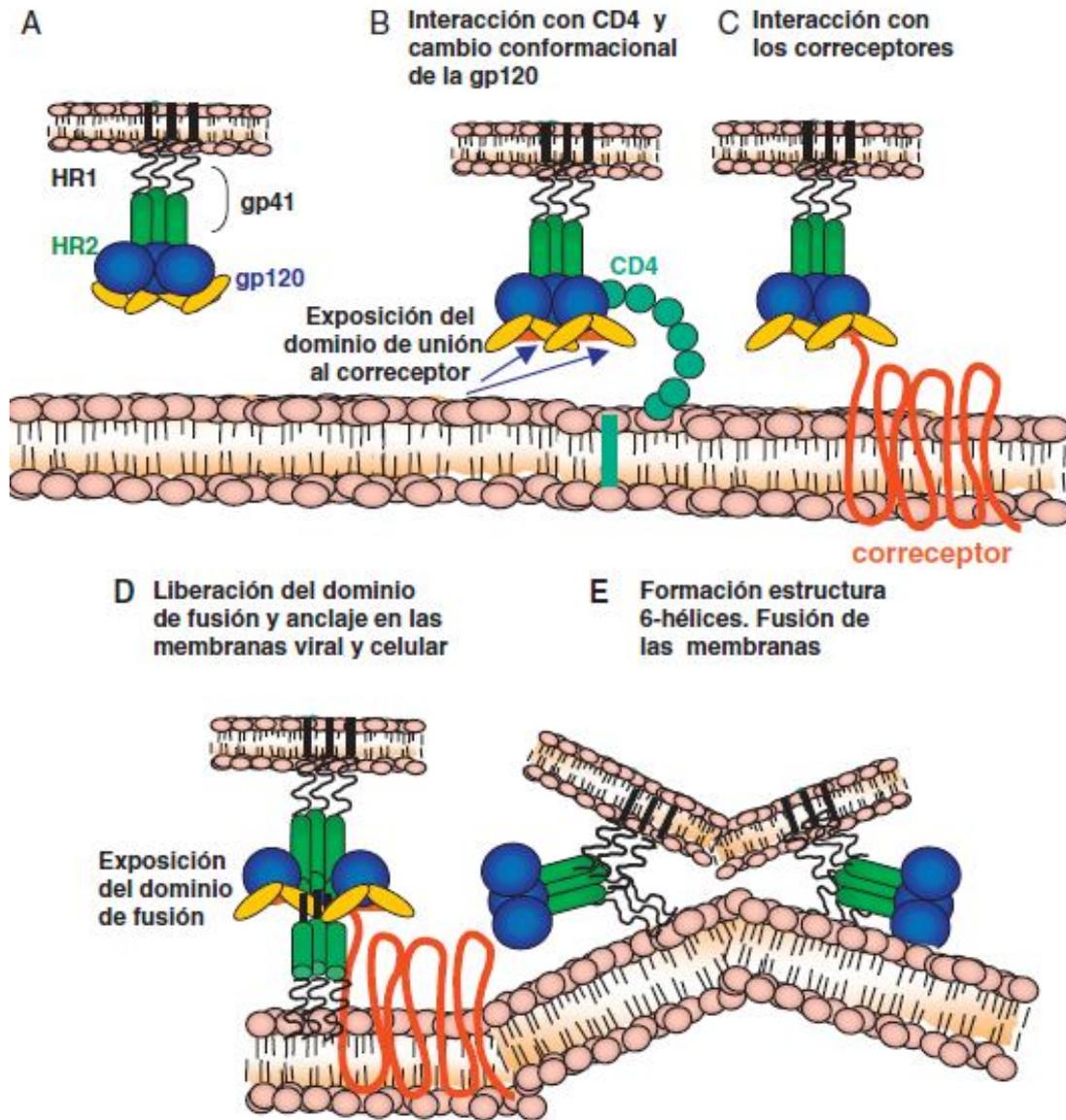


Figura 1.4.1.2 Entrada del VIH a la célula. En los pasos D y E se muestra el papel de la proteína gp41 en la fusión de las membranas viral y celular. Modificado de [18].

Una vez que las membranas se fusionaron se internaliza la cápside. La cápside interactúa con filamentos de actina (figura 1.4.1.3 paso 1) para después acoplarse a microtúbulos del citoesqueleto para ser transportada rápidamente al núcleo celular (figura 1.4.1.3 paso 2), una vez en la proximidad del núcleo, la cápside vuelve a acoplarse a filamentos de actina (figura 1.4.1.3 paso 3) que la llevan hasta el poro nuclear (figura 1.4.1.3 paso 4) y la cápside se acopla en éste (figura 1.4.1.3 paso 5). En ese momento ocurre la retrotranscripción del genoma viral

mediada por la RT, formándose una estructura llamada ala de DNA (figura 1.4.1.3 paso 6), que consta de una triple cadena de DNA que surge de la interacción del tracto central de polipurina y la secuencia central de terminación del cDNA (RNA retrotranscrito a DNA) viral. Esta ala central de DNA del virus promueve la desencapsidación, la cual permite que se organice el complejo de preintegración (PIC) [19] (figura 1.4.1.3 paso 7). El PIC comprende el cDNA viral de doble cadena, la RT, integrasa (IN), MA, NC y Vpr [20]. El PIC es transportado al interior del núcleo (figura 1.4.1.3 paso 8), en donde experimenta un transporte intranuclear no caracterizado (figura 1.4.1.3 paso 9). El cDNA del PIC puede circularizarse formando estructuras circulares no funcionales o se puede integrar al genoma del hospedero (figura 1.4.1.3 paso 10). La integración del genoma viral al genoma de la célula hospedera es catalizada por IN mediante la eliminación de dos nucleótidos en los extremos del cDNA y un corte en genoma celular [19].

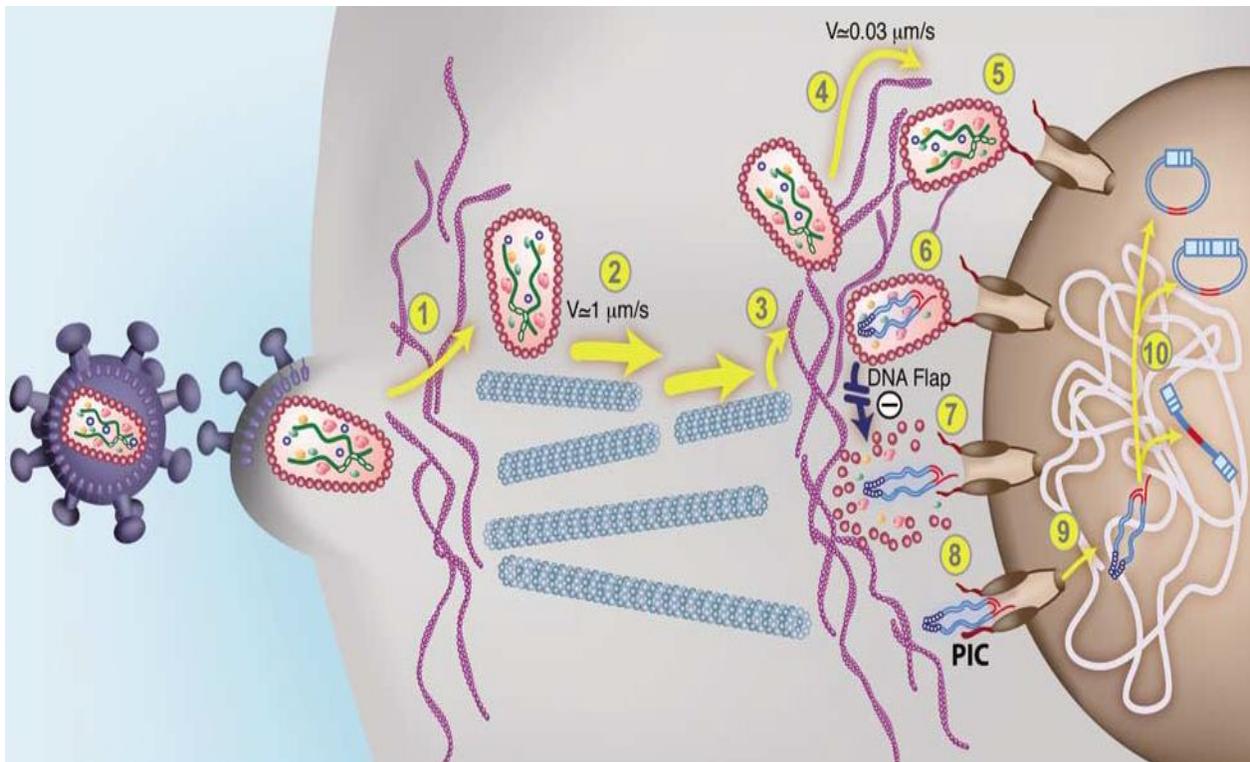


Figura 1.4.1.3 Retrotranscripción e inserción al genoma hospedero. Paso 1, los virus entran a la célula mediante un proceso de fusión de membranas generado por la interacción entre receptores y se acoplan a filamentos de actina debajo de la membrana plasmática. Paso 2, la cápside se une a microtúbulos del citoesqueleto que la transportan a la periferia del núcleo celular. Paso 3, la cápside es transferida de los microtúbulos a filamentos de actina cercanos al núcleo. Paso 4, los filamentos de actina transportan a la cápside hacia la membrana nuclear. Paso 5, la cápside se

acopla en la entrada del poro nuclear. Paso 6, se retrotranscribe el genoma del virus y se forma el ala de DNA. Paso 7, el contenido viral se desencapsida y forma el complejo de pre-integración (PIC). Paso 8, el PIC entra al núcleo mediante el poro nuclear. Paso 9, el PIC experimenta un transporte intranuclear no caracterizado. Paso 10, el cDNA puede integrarse al genoma del hospedero o circularizarse. Tomado de [19].

Una vez integrado, el LTR 5' funciona como cualquier otra unidad transcripcional de la célula. El LTR viral posee regiones que facilitan el posicionamiento de la RNA polimerasa II (RNAPII) en el sitio de inicio de la transcripción [19]. A su vez, el LTR posee una región reguladora llamada elemento de respuesta de transactivación (TAR). Esta estructura de RNA está presente en los mensajeros virales y se une a la proteína transactivadora Tat. Tat tiene un cofactor celular P-TEFb cuya función es fosforilar la región C-terminal de la RNAPII para activar a la enzima. P-TEFb y Tat se unen a TAR permitiendo que la RNAPII produzca mensajeros largos, sin esta unión la RNAPII es incapaz de sintetizar mensajeros largos [21].

Tras la síntesis de RNA mensajero los eventos de corte y empalme son esenciales para la producción de proteínas virales, los mRNA con pocos eventos de corte y empalme son los que originarán proteínas estructurales del virus mientras que aquellos mRNA con múltiples eventos de corte y empalme generarán proteínas accesorias [1]. La cantidad de estos mRNA con múltiples y escasos cortes es regulada por la proteína Rev. Rev es una proteína pequeña que se une a RRE (Elemento de Respuesta a Rev) que es un asa de RNA en el gen env, lo cual permite la exportación del núcleo de los mRNA con pocos eventos de corte y empalme destinados a formar proteínas estructurales para la formación de nuevos viriones [5]. La salida del núcleo es mediada por una señal de localización nuclear (NLS) en Rev y una secuencia de exportación nuclear rica en leucina (NES). La exportación ocurre por la interacción de NES con CRM1/exportina-1 y es mediada por RanGTP [4].

El ensamblaje de viriones ocurre generalmente en la membrana plasmática donde posteriormente ocurre la gemación. Sin embargo, en monocitos/macrófagos sucede en endosomas tardíos. Este proceso es orquestado principalmente por las poliproteínas Gag, Gag-Pol, aunque también es influenciado por Env e involucra el reclutamiento de dos copias de RNA

viral y de la proteína accesoria Vpr[4]. En un principio, la proteína precursora Pr55<sup>Gag</sup> sintetizada a partir de mRNA con pocos eventos de corte y empalme se dirige a la membrana debido a un dominio miristilado en un residuo de glicina en el extremo N- terminal, correspondiente a la proteína de matriz MA, que tiene una alta afinidad por la membrana. Debido a la miristilación, el ensamble ocurre en microdominios membranales ricos en colesterol (balsas lipídicas), los cuales favorecen la estabilidad, liberación y fusión de los viriones [22].

La proteasa viral procesa Pr55<sup>Gag</sup> permitiendo la maduración de las proteínas estructurales: La proteína de matriz MA; la proteína CA que forma la cápside viral; NC que forma la nucleocápside asociándose al genoma de RNA viral, que promueve la retrotranscripción mediante la desestabilización de estructuras secundarias que interfieren con la actividad de la RT y que coloca el *primer* de tRNA en el genoma viral y favorece la integración del cDNA viral en el cromosoma de la célula[5]; la proteína p6 que presenta secuencias en su dominio terminal [23] las cuales interactúan con proteínas reclutadoras de los complejos ESCRT (a través de su unión con las proteínas Tsg101 y Alix) de la vía de ordenamiento vacuolar de proteínas, jugando un papel esencial en la salida de los viriones de la célula [1]. Normalmente, Tsg101, parte del complejo ESCRT-1, y Alix se unen a las proteínas que serán incorporadas al cuerpo multivesicular (MVB)[24]. El MVB es producido cuando fragmentos de endosoma tardío geman hacia el lumen del endosoma y no hacia el citoplasma. Posteriormente el MVB libera su contenido en el lisosoma al fusionarse con éste. Aunque es necesario esclarecer algunos mecanismos moleculares en el proceso, es sabido que el VIH ha logrado de alguna manera secuestrar esta vía celular en su beneficio para la gemación desde el citoplasma hacia el medio extracelular [4].

#### 1.4.2 Progresión de la infección por VIH y respuesta inmune.

La progresión de la infección por VIH se evalúa midiendo dos parámetros: la carga viral por ml de plasma para medir la replicación viral en el hospedero y el conteo de linfocitos T CD4+ por  $\mu$ l de sangre como indicador del deterioro del sistema inmune (figura 1.4.2).

Durante la infección primaria el objetivo principal del virus es el GALT (tejido linfoide asociado al tracto intestinal), éste es el principal sistema de defensa contra los antígenos del tracto digestivo. Debido a su fenotipo de memoria activada los linfocitos en GALT son presa fácil del VIH que infecta preferentemente células activadas. A partir de ésta etapa ocurre la replicación y diseminación del virus a los linfocitos circundantes y posteriormente a ganglios linfáticos periféricos mediante células dendríticas y linfocitos T CD4+ infectados [25]. La etapa “mucosa” de la infección es corta y a partir de 48-72h es posible detectar virus en ganglios periféricos[20]. Tras la primera semana de infección se puede detectar la carga viral en sangre periférica, ésta aumenta exponencialmente debido a la carencia de una respuesta inmune específica. De 4-12 semanas tras la infección ocurre el periodo de ventana, en el cual no es posible detectar respuesta inmune humoral ni celular a pesar de que la carga viral es muy elevada. Durante este periodo el virus se propaga rápidamente, lo cual conlleva la destrucción masiva de los linfocitos T CD4+ activados (particularmente en GALT). Posteriormente en la etapa crónica se recuperan los niveles de linfocitos TCD4+, sin embargo los niveles en GALT no se reconstituyen permitiendo así una translocación bacteriana del lumen del intestino al resto del cuerpo, esto contribuye a la activación crónica y detrimento del sistema inmune [26]. Hacia el final de la infección primaria aparecen reacciones citotóxicas específicas por parte de los linfocitos T CD8+, esto se relaciona directamente con la disminución de la carga viral [27] (figura 1.4.2).

La latencia clínica o etapa crónica comienza aproximadamente a las 12 semanas post-infección después de que se establece la respuesta inmune humoral y celular, por lo tanto es posible encontrar anticuerpos y linfocitos citotóxicos específicos contra el virus. La aparición de esta respuesta logra controlar la carga viral que cae a un nivel semi-estable y permanece así por la mayor parte de la infección (figura 1.4.2). Este nivel de viremia basal varía entre los pacientes, pero puede ir de niveles indetectables (menos de 50 copias de VIH por ml de plasma) a más de cientos de miles de copias. La estabilidad de la carga viral es un reflejo del equilibrio entre la replicación del virus y el control inmunitario. A pesar del establecimiento de la reacción inmune el organismo es incapaz de erradicar completamente al virus que ya se ha almacenado en

reservorios celulares en los cuales se replica constantemente, por lo tanto se genera una presión inmunológica persistente que obliga al virus a producir mutantes de escape al sistema inmune, éste a su vez responde modificando su espectro de acción para neutralizar a las nuevas variantes virales [18]. Este proceso de escape-adaptación es característico de la etapa crónica y dura en promedio ocho años [28]. Durante esta etapa disminuye progresivamente la capacidad de respuesta del sistema inmune debido a la reducción numérica de los linfocitos T CD4+ y a la sobrecarga antigénica que conlleva una activación inmunológica constante que ocasiona alteraciones en la maduración y activación de los linfocitos T [18] (figura 1.4.2).

El estado final de la infección o SIDA (Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida) se caracteriza por el desbalance entre la replicación viral y el control inmune. Debido a la activación crónica de la respuesta inmune ésta es incapaz de seguir controlando la replicación viral, la carga viral comienza a aumentar mientras que los niveles de linfocitos T CD4+ disminuyen. La aparición de enfermedades oportunistas (como el sarcoma de Kaposi y candidiasis) es típica en el inicio de esta etapa (figura 1.4.2). También se presenta un deterioro en la respuesta humoral y celular, disminuyen los niveles de anticuerpos, la actividad y cantidad de los linfocitos T CD8+ [18].

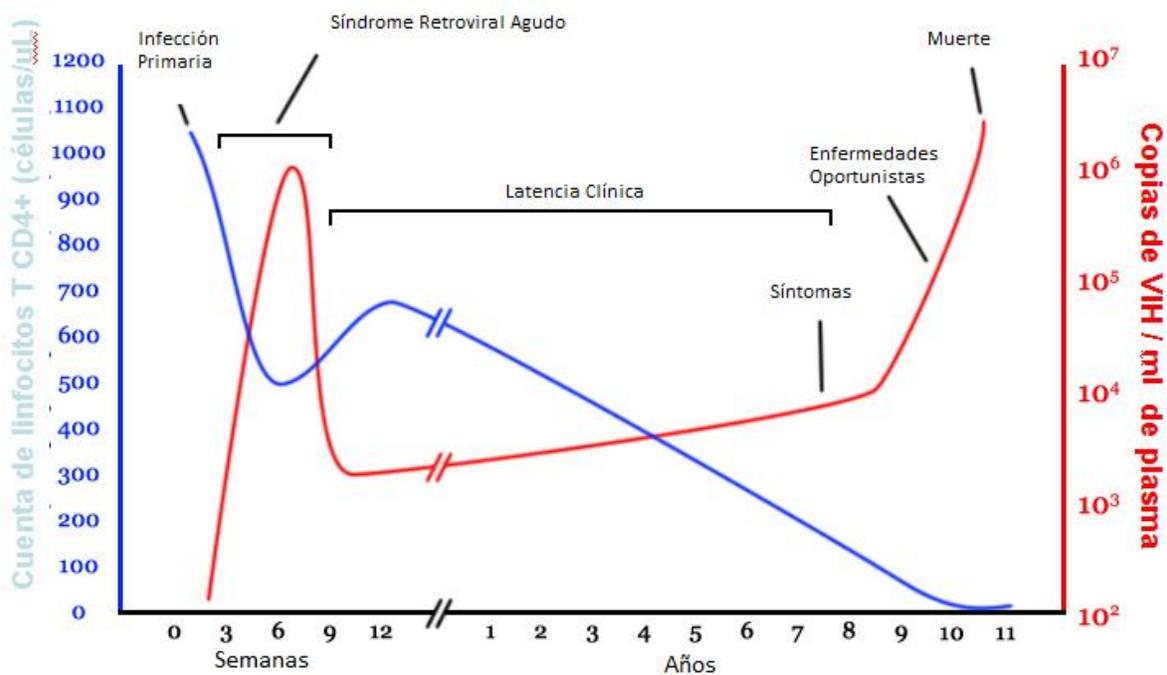


Figura 1.4.2 Progresión de la infección por VIH. Con base en los parámetros de cantidad de linfocitos T CD4+ por ul de sangre y el de copias de RNA viral por ml de plasma (carga viral) se muestra la progresión en semanas/años de la infección por VIH. La infección presenta tres etapas: infección primara en la que se presenta un pico en la carga viral que causa una caída en el conteo de linfocitos T CD4+ y el síndrome retroviral agudo, la latencia clínica o etapa crónica que se caracteriza por una estabilidad en el conteo de células y la carga viral, y por último la etapa de SIDA caracterizada por la aparición de enfermedades oportunistas, disminución en cantidad de los linfocitos T CD4+ y aumento de la carga viral. Modificado de [29].

A lo largo de la infección se presenta una gran cantidad de anticuerpos, sin embargo su actividad neutralizante es débil y son seguidos rápidamente por variedades del virus resistentes a la neutralización [30]. A pesar de que la actividad de los anticuerpos puede ejercer presión de selección los epítomos blanco pueden desarrollar mutaciones de escape [31]. Mientras tanto el sistema inmune humoral presenta un estado de hiperactivación y paradójicamente una baja respuesta. La hiperactivación crónica se refleja en hiperglobulinemia [32], plasmacitosis medular [33], expresión aumentada de moléculas de activación en linfocitos B [34] y presencia de anticuerpos autorreactivos [32].

## 1.5. gp41 y la respuesta inmune humoral.

Las proteínas de la envoltura viral son las únicas que se encuentran expuestas, debido a esto gp41 se encuentra sujeta a la reacción inmune humoral la cual es ejercida por anticuerpos.

Durante el proceso de fusión de membranas, la proteína gp41 presenta tres estados conformacionales [35]:

- Conformación pre-fusión: conformación que adquiere gp41 después de que gp160 ha sido procesada y origina a gp120 y a gp41.
- Intermediario pre-pasador: es la conformación extendida y expuesta de gp41 justo después de que el péptido de fusión N-terminal penetra la membrana celular.

- Conformación post-fusión: esta conformación es irreversible y es aquella en la que se encuentra el ramo de seis hélices que fuerza la fusión de las membranas viral y celular.

Las diferencias entre estas conformaciones son tales que cada una representa distintas superficies antigénicas para el sistema inmune. La glucosilación extensiva, enmascaramiento de epítomos, diversidad en la secuencia y los cambios conformacionales generados por la unión a receptores representan un gran obstáculo para la generación de anticuerpos neutralizantes efectivos [30]. Sin embargo se han aislado anticuerpos ampliamente neutralizantes en el plasma de algunos pacientes que tienen como blanco la región externa membrana-proximal (MPER, residuos 662-682 numeración de HXB2) de gp41 [36,37]. A su vez también se han encontrado otros anticuerpos ampliamente neutralizantes como 2F5 y 4E10 cuyo mecanismo de neutralización indica que sus epítomos se encuentran expuestos sólo en el estado de pre-pasador durante el proceso de fusión [38]. gp41 induce en mayor cantidad la formación de anticuerpos no neutralizantes que son comunes durante la infección por VIH, éstos han sido clasificados según la región en la que se encuentran sus epítomos como: grupo 1, aquellos que reaccionan con el asa C-C que es una región inmunodominante y del grupo 2, aquellos que reaccionan con residuos cercanos a la región MPER (residuos 590-600, numeración de HXB2) (figura 1.4.1.1). Los anticuerpos no neutralizantes han demostrado tener una efectividad pobre en el control de la viremia.

Durante el tratamiento con inhibidores de la fusión suelen surgir mutaciones de resistencia en la región HR1, las cuales retardan la cinética de fusión del virus lo cual mantiene a gp41 expuesta por más tiempo del usual. Debido a esto ha sido sugerido que la cinética de fusión retardada puede volver al virus más vulnerable a la neutralización por anticuerpos anti-MPER; sin embargo, se ha demostrado que las mutaciones surgidas *in vivo* en HR1 carecen de efecto en la neutralización por anticuerpos [39].

## 1.6 gp41 y la respuesta inmune celular.

Tras la infección inicial por VIH la actividad citolítica de los linfocitos T CD8+ como parte de la respuesta inmune celular se asocia con una disminución de la viremia plasmática [27]. Los linfocitos T CD8+ (CTL) ayudan a controlar la infección de distintas maneras, primeramente el reconocimiento por parte de los linfocitos T CD8+ de péptidos virales presentados por las moléculas HLA en la superficie de las células infectadas desencadena una respuesta citolítica que resulta en la destrucción de la célula infectada, evitando así que esta continúe produciendo nuevos viriones. Esta función citolítica es mediada por la producción de perforina y granzimas. La perforina genera perforaciones en la membrana de la célula blanco a través de las cuales pueden entrar moléculas de granzima que desencadenan apoptosis en la célula infectada. Debido a que los péptidos virales son presentados por las moléculas HLA, éstas son determinantes en la especificidad y eficacia de la respuesta inmune celular. Las moléculas HLA son componentes del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Los genes HLA son altamente polimórficos y poligénicos y los genes HLA de clase I clásicos codifican a las proteínas involucradas en la presentación de antígenos a las células T CD8+ a través de la unión HLA+TCR (receptor de células T). Una de las principales características de las moléculas HLA es su polimorfismo, el cual es de importancia crítica en el reconocimiento de antígenos por las células (o linfocitos) T CD8+. Los linfocitos T reconocen antígenos en forma de péptidos que están unidos a una variante alélica de las moléculas HLA y ese mismo péptido no será encontrado en unión a ningún otro alelo HLA, este comportamiento es denominado restricción por HLA. La mayoría de los alelos HLA varían entre ellos a causa de múltiples sustituciones de aminoácidos, estas diferencias se localizan en el sitio de unión al péptido que presentarán y en las zonas adyacentes a esta que entrarán en contacto directo con el TRC de los linfocitos T. El vasto espectro polimórfico de los HLA altera sus propiedades en al menos tres aspectos: el tamaño del péptido que presentarán, la conformación del péptido y la interacción directa del HLA con el TCR; de esta manera la naturaleza polimórfica de los HLA presenta repercusiones funcionales importantes para el combate de patógenos. Así mismo, la selección evolutiva de esta amplia variedad alélica refleja que los HLA tienen un papel crítico en la respuesta inmune [40].

Aunado a la actividad citolítica de las CTL estas células también expresan Fas ligando que se une a CD95 en la superficie de la célula blanco y subsecuentemente activa la vía apoptótica. Finalmente las CTLs pueden liberar una gran variedad de factores solubles con actividad antiviral como INF $\gamma$  el cual a través de una cascada de activación confiere a las células cercanas una cierta resistencia a la infección viral [27].

Las CTLs también son productoras de beta-quimiocinas como MIP-1 a y 1b (proteínas 1 alfa y 1 beta inflamatorias de macrófagos) y RANTES que se unen a CCR5, esto promueve la internalización del receptor y subsecuentemente disminuyen la posibilidad del virus de entrar a la célula [41]. La supresión de la infección por VIH se encuentra directamente relacionada a la reacción de las CTL, se ha reportado que ésta reacción se encuentra aumentada en personas infectadas no-progresoras (personas con conteos estables de linfocitos T CD4+ y niveles bajos de carga viral sostenidos en ausencia de tratamiento antirretroviral) [42].

Como resultado de la presión inmunológica que presentan las CTL el virus desarrolla variantes de resistencia para evadir el reconocimiento del sistema inmune del hospedero, a estas se les conoce como mutantes de escape. Una vez que la mutante de escape es reconocida por las CTL el virus genera una nueva variante para escapar de nuevo al sistema inmune y así sucesivamente a lo largo de toda la infección, contribuyendo de esta manera a la activación crónica del sistema inmune y al detrimento de éste. La evasión del virus a los ataques por parte de las CTL representa una de las mayores razones por las cuales el sistema inmune es incapaz de controlar la replicación viral efectivamente [43].

Dado que la expresión de moléculas HLA es específica en cada individuo las mutantes de escape a estos HLA determinados serán también específicas para ese conjunto de HLA, por lo tanto las mutantes de escape presentes en un individuo serán distintas a aquellas presentes en otro, sin embargo dependiendo del costo en infectividad viral algunas de estas mutantes de escape pueden ser transmitidas y mantenidas en un nuevo hospedero aun en ausencia de la presión del

alelo HLA selector. Ha sido observado que algunas de estas mutantes de escape pueden acumularse en un gran número de individuos y fijarse en la secuencia consenso del virus, lo cual impulsa la evolución viral a nivel poblacional; como consecuencia de este fenómeno, epítomos específicos para una molécula HLA pueden extinguirse en la población viral permitiendo de esta manera la adaptación del virus al control inmune mediado por HLA en una zona geográfica determinada. Los factores que intervienen en la fijación de mutantes de escape en una población son variados y su impacto en este fenómeno aun es vagamente entendido, algunos de estos factores son: la tasa de reversión de las mutantes de escape en ausencia del HLA selector, selección de mutaciones de compensación que restauran la infectividad viral, efectos fundadores, desarrollo de nuevas respuestas de CTL a las variantes de escape, jerarquías de inmunodominancia en las respuestas de CTL y la frecuencia de alelos HLA en las distintas poblaciones [44].

## 1.7 Fármacos antirretrovirales.

Actualmente existen tres grandes familias de fármacos antirretrovirales que se usan de manera rutinaria en la terapia antirretroviral: los inhibidores de proteasa, los inhibidores de RT análogos de nucleósidos y los inhibidores de RT no análogos de nucleósidos. Sin embargo, el surgimiento de mutantes de resistencia, la posibilidad de transmisión de estas variantes resistentes y la resistencia cruzada la cual es un fenómeno en donde la selección de mutaciones de resistencia por un fármaco antirretroviral en particular confiere resistencia no solo a uno, sino a varios de los fármacos de la misma familia, han demandado la búsqueda de nuevas estrategias para controlar la infección. Así, en la actualidad contamos ya con nuevas familias de fármacos antirretrovirales como los inhibidores de la integrasa, los antagonistas del correceptor CCR5 y los inhibidores de la fusión [45].

### 1.7.1 Inhibidores de la fusión.

Hasta ahora el único inhibidor de la fusión aprobado para su uso clínico es enfuvirtida (ENF). Este fármaco es un péptido de 36 aminoácidos que simula la región del aminoácido 127 a 162 de la secuencia HR2 de gp41. De esta manera, ENF se une a la región hidrofóbica de HR1 que se encuentra expuesta tras la unión de gp120 al receptor y correceptor. La interacción de ENF con HR1 (esquemática en la figura 1.5.1) inhibe la formación de la estructura de ramo de seis hélices necesaria para acercar la membrana viral a la membrana de la célula hospedera y por consiguiente la fusión de la membrana viral con la celular no puede completarse [45,46]. Debido a que ENF se une a HR1 y ésta región de gp41 sólo se encuentra expuesta durante el estado pre-pasador del proceso de fusión el fármaco tiene una ventana corta de tiempo en la cual puede actuar, o sea ENF tiene como blanco un estado conformacional de gp41 [39]. En la figura 1.7.1 se esquematiza cómo ENF actúa durante el proceso de fusión de las membranas viral y celular.

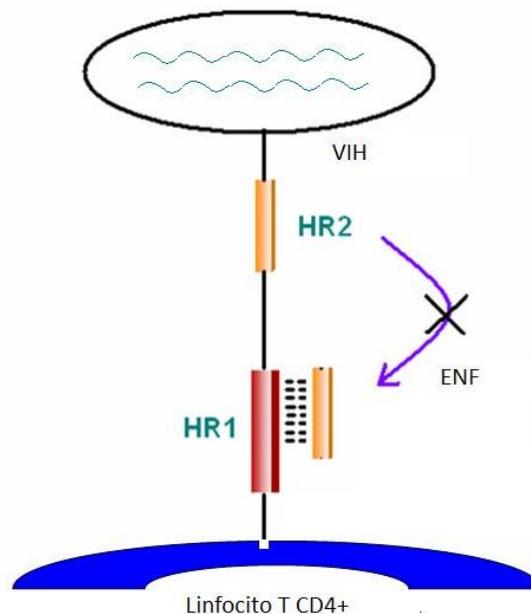


Figura 1.7.1. Inhibición de la fusión de las membranas gracias al efecto de enfuvirtida (ENF). ENF se une a HR1 durante el estado de pre-pasador durante el proceso de fusión de membranas y así HR2 no se puede unir a su región complementaria en HR1 evitando la formación del ramo de seis hélices. Modificado de [47].

ENF puede reducir la carga viral en individuos infectados con VIH-1 y es típicamente utilizado como terapia de salvamento en individuos que presentan falla virológica [39]. Sin embargo, mutaciones de resistencia por parte del virus suelen emerger rápidamente bajo la presión selectiva de ENF [48]; estas han sido reportadas por la Universidad de Stanford y se muestran en la tabla 1.7.1.1. Las mutaciones de resistencia a ENF se localizan dentro de la región HR1 entre los aminoácidos 36 y 45 [49] y la resistencia a éste normalmente se encuentra asociada a más de una mutación [50]. Al introducirse mutaciones en HR1 se ha encontrado que la infectividad viral se ve reducida como consecuencia de interacciones débiles entre HR1 y HR2 y una cinética de fusión retardada y el virus se vuelve más vulnerable a neutralización por anticuerpos que se unen a la región externa membrana-proximal (MPER) de gp41 [51] que se encuentra adyacente a la región HR2, al ocurrir esto la adecuación viral puede verse comprometida. Para minimizar el impacto que tiene en el virus la resistencia a ENF desarrollada en la región HR1, las partículas virales que presentan mutaciones compensatorias en la región HR2 que amortiguan a aquellas en HR1 se mantienen, permitiendo así una cinética de fusión adecuada [39]. Consistente con esto mutaciones en HR2 son comúnmente observadas en cepas de VIH resistentes a ENF [48], sin embargo estas mutaciones no confieren resistencia a ENF. Se ha encontrado que mientras las mutaciones en HR1 tienen un efecto negativo en la cinética de fusión, las mutaciones en HR2 (Mostradas en la tabla 1.7.1.2) la restauran mediante la aceleración de los cambios conformacionales que ocurren después de la unión al correceptor, probablemente este efecto involucra la formación del ramo de seis hélices [39].

Tabla 1.7.1.1 Mutaciones de resistencia a ENF según la base de datos de resistencia a antirretrovirales de la Universidad de Stanford. Existen mutaciones accesorias a estas como L44M y L45M que en combinación con las anteriores aumentan el nivel de resistencia.

<b>Posición</b>	<b>36</b>	<b>37</b>	<b>38</b>	<b>40</b>	<b>42</b>	<b>43</b>
<b>Consenso</b>	G	I	V	Q	N	N
<b>Resistencia</b>	DEVS	T	EAMG	H	T	DKS

Tabla 1.7.1.2 Mutaciones compensatorias en HR2 reportadas por la base de datos de resistencia a antirretrovirales de la Universidad de Stanford.

<b>Posición</b>	<b>126</b>	<b>137</b>	<b>138</b>
<b>Consenso</b>	N	N	S
<b>Mutación compensatoria</b>	K	K	A

## 1.8 Resistencia transmitida

El fenómeno de resistencia transmitida a un fármaco ocurre cuando en un paciente bajo algún régimen antirretroviral se selecciona una cepa del virus resistente a algún fármaco antirretroviral y ésta es a su vez transmitida a un nuevo hospedero [52]. Una vez establecida la infección en el nuevo hospedero el virus es resistente al fármaco antirretroviral al que era resistente en el hospedero inicial que transmitió la infección; cuando el nuevo hospedero inicia terapia antirretroviral ésta no es efectiva debido a que el virus circulante es resistente desde un inicio al fármaco. Se han reportado mutaciones de resistencia a todas las familias de antirretrovirales [53].

En México se han reportado niveles intermedios de resistencia transmitida en el gen *pol* según el umbral de resistencia de la OMS, para medirlo se utilizaron puntuaciones de la base de datos de resistencia a antirretrovirales de la universidad de Stanford y la lista de mutaciones de vigilancia de resistencia de la OMS [54].

Los estudios de vigilancia epidemiológica en Guatemala indican al igual que en México una prevalencia de resistencia transmitida con niveles intermedios en el gen *pol* según las puntuaciones de la base de datos de la universidad de Stanford y la lista de mutaciones de vigilancia de resistencia de la OMS. En la mayoría de los casos la resistencia se asoció con los inhibidores de la transcriptasa reversa no análogos de nucleósidos [55].

Hasta este momento no existen puntuaciones de resistencia para el gen *gp41* y no hay estudios en México ni en Guatemala respecto a resistencia transmitida involucrando a este gen.

A nivel global se ha reportado resistencia a enfuvirtida en pacientes vírgenes a este antirretroviral pero experimentados en otros regímenes antirretrovirales. En Brasil se encontró una prevalencia de al menos 1.3% [56], sin embargo en otras cohortes brasileñas se han reportado mutaciones asociadas a resistencia (L44M y N43K) en 3.8% de los pacientes de los que se contaba con muestras de DNA y 4.6% en pacientes con muestras de RNA. A su vez se reportaron otros polimorfismos frecuentes como E137K (con frecuencias de 10% en muestras de DNA y 13.8% en muestras de RNA), L130I (8.8% en DNA y 9.2% en RNA), S129N (6.3% en DNA y 10.8% en RNA), L44M (2.5% en DNA y 4.6% en RNA), S138A (2.5% en DNA y 1.5% en RNA) y N43K (1.3% en DNA) [57]. Otros estudios realizados en una cohorte francesa en pacientes vírgenes a cualquier tratamiento antirretroviral señalaron una prevalencia de resistencia a enfuvirtida de 20% en el grupo de estudio [58].

## 2. Planteamiento del problema.

Los inhibidores de la fusión son utilizados como terapia de salvamento en pacientes que presentan resistencia farmacológica a los regímenes antirretrovirales más comunes. Al ser una de las últimas opciones para los pacientes es de preponderante importancia conocer los niveles basales de resistencia a esta familia de antirretrovirales, *i.e.* cuáles son los niveles de resistencia transmitida a los inhibidores de la fusión. De esta manera es posible saber si el uso de inhibidores de la fusión es viable en una población; sin embargo no existen estudios al respecto en México ni en Guatemala.

A su vez debido al papel que juega *gp41* en la entrada del virus a la célula esta proteína ha sido objeto de estudio para el desarrollo de vacunas y otras estrategias de control para el VIH [35]. No obstante, no existen estudios dedicados a la caracterización de la variabilidad y relaciones filogenéticas de las secuencias de *gp41* de virus circulantes en México ni en Guatemala.

Así, en el presente proyecto se obtendrán secuencias de gp41 de virus circulantes en México y Guatemala a partir de individuos infectados vírgenes a tratamiento antirretroviral, con el fin de estimar por primera vez la prevalencia de resistencia a inhibidores de fusión en los virus circulantes y buscando caracterizar la variabilidad genética de gp41 y el posible papel de diversas presiones selectivas en la evolución del VIH en México y Guatemala.

### 3. Objetivos

#### 3.1 Objetivos generales.

- Estimar la prevalencia de resistencia transmitida a fármacos inhibidores de la fusión en virus circulantes en México y Guatemala.
- Analizar el efecto que el contexto inmunogenético de ambas poblaciones ha fijado sobre la proteína gp41 del VIH.
- Comparar poblacionalmente los virus de México y Guatemala para evaluar la divergencia genética entre ambas poblaciones.

#### 3.2 Objetivos particulares

- Extraer RNA a partir de plasma de sangre periférica.
- Amplificar el gen *gp41* mediante PCR.
- Cuantificar DNA.
- Secuenciar el gen *gp41*.
- Realizar alineamientos para determinar mutaciones de resistencia a inhibidores de fusión y buscar polimorfismos.
- Reconstruir filogenias.

## 4. Hipótesis

- Debido a que los inhibidores de fusión son suministrados como terapia de salvamento a pacientes con resistencia a los fármacos antirretrovirales recetados típicamente, se esperaría que la presencia de mutaciones de resistencia transmitida sea baja, tanto en México como en Guatemala, y en acuerdo con reportes previos para otros países.
- En cuanto al aspecto evolutivo mediado por las moléculas HLA de los linfocitos T CD8+ y anticuerpos se esperaría encontrar características inmunogenéticas únicas en las dos poblaciones, que dirijan la evolución del virus de manera distinta en México y en Guatemala. Sin embargo, se espera también observar un aspecto común en la evolución del virus en los dos países, dada la existencia de características inmunogenéticas comunes.

## 5. Métodos

### 5.1 Selección de pacientes.

Se seleccionaron aleatoriamente muestras de plasma de pacientes enrolados en la cohorte de Epidemiología del VIH en México y de la cohorte guatemalteca del Proyecto Mesoamericano del Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIENI) del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER). Todos los pacientes participantes reportaban infección por VIH y eran vírgenes a tratamiento antirretroviral. Todos los pacientes participantes firmaron un consentimiento escrito para la donación de muestras sanguíneas; el protocolo de investigación fue aprobado por el Comité de Ciencia y Bioética del INER.

El reclutamiento de pacientes en México para la cohorte de Epidemiología del VIH comenzó en 2005. Participan clínicas de 12 estados del país: Distrito Federal, Edo. de México, Puebla, Jalisco, Nuevo León, Oaxaca, Chiapas, Veracruz, Michoacán, Sonora, Guerrero y Baja California Norte.

Cada paciente donó una muestra de sangre periférica de la cual se determinó la carga viral plasmática y el conteo de linfocitos T CD4+, además de extraer plasma para estudios futuros.

El reclutamiento de pacientes en Guatemala comenzó en octubre de 2010. Se invita a participar a pacientes recientemente detectados, vírgenes a tratamiento, que se atienden en el Hospital Roosevelt, éste es un hospital centralizado de referencia en la Ciudad de Guatemala que recibe muestras de todo el país. La clínica de VIH dentro del hospital atiende a todo tipo de pacientes, pero puede existir un sesgo de mayor proporción de mujeres en la cohorte debido a que realizan reclutamiento de mujeres embarazadas con VIH rutinariamente en el hospital. Tras aceptar participar en el protocolo se programó la toma de muestra de sangre periférica y se envió al CIENI en donde fue procesada para extraer plasma y realizar análisis de conteo de carga viral plasmática y conteo de linfocitos T CD4+.

## 5.2 Extracción de RNA.

Utilizando las muestras de plasma de cada paciente se extrajo el RNA viral con el kit QIAmp® Viral RNA Mini (QIAGEN®, Valencia, CA) según las especificaciones del fabricante. En esencia el kit funciona de la siguiente manera: la muestra es lisada bajo condiciones desnaturalizantes para inactivar RNAsas en el medio, posteriormente se utilizan buffers para promover la unión del RNA a la membrana de la columna de separación. El RNA se une a la membrana y los contaminantes son desechados utilizando dos buffers distintos para lavados diferentes. El RNA obtenido es resuspendido en un buffer libre de RNAsas. El RNA recuperado se encuentra libre de proteínas, nucleasas y otros contaminantes [59] y está listo para ser utilizado en los análisis requeridos.

## 5.3 Amplificación de DNA.

A partir del RNA extraído con el kit QIAmp® Viral RNA Mini (QIAGEN®, Valencia, CA) se realizó RT-PCR, esta técnica permite retrotranscribir RNA del gen gp41, para obtener cDNA, seguido de

dos rondas de amplificación, las concentraciones de los reactivos fueron las recomendadas por el fabricante.

Las condiciones de amplificación por muestra para amplificar el gen gp41 de VIH son:

Transcripción inversa y primera ronda de amplificación:

➤ H <sub>2</sub> O	11.5 µL
➤ 5x Qiagen RT-PCR Buffer	5.0 µL
➤ Mix de dNTP (10mM)	1.0 µL
➤ <i>Primer</i> de inicio (20µM)	0.75 µL
➤ <i>Primer</i> de término (20µM)	0.75 µL
➤ Enzima RT/Taq	1.0 µL
➤ RNA	5.0 µL

El *primer* de inicio tiene una secuencia de 5' ATTGTGGAGGGGAATTTTCTACTG 3' y el de término es 3' TTGCTACTTGTGATTGCTCCATG 5'. La enzima empleada en esta ronda de amplificación fue la provista por el fabricante en el kit QIAGEN® *OneStep RT-PCR* (100) (QIAGEN®, Valencia, CA).

Condiciones de amplificación:

- 30 min 50 °C
- 15 min 95 °C
- 35 ciclos de :
  - 30 sec 94 °C
  - 30 sec 55 °C
  - 1.5 min 72 °C
- 10 min 72 °C

Segunda ronda de amplificación:

➤ H <sub>2</sub> O	18 µL
➤ 10x PCR Buffer	2.5 µL
➤ MgCl <sub>2</sub> (50mM)	0.75 µL
➤ dNTP (10mM)	0.5 µL
➤ <i>Primer</i> de inicio (20µM)	0.25 µL
➤ <i>Primer</i> de término (20µM)	0.25 µL
➤ Enzima	0.25 µL
➤ cDNA	2.5 µL

El *primer* de inicio de la segunda ronda tiene una secuencia de 5' AAGCAATGTATGCCCTCC 3' y el de término es 3' TCTCATTCTTCCCTTA 5'. La enzima empleada en esta ronda de amplificación fue la INVITROGEN® Platinum Taq 5 u/ µL.

Condiciones de amplificación:

- 2 min 94 °C
- 35 ciclos de
  - 30 sec 94 °C
  - 30 sec 54 °C
  - 1.5 min 72 °C
- 5 min 72 °C

Posteriormente se comprobó la amplificación del fragmento deseado (gp41) mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y se cuantificaron los productos de PCR por espectrofotometría usando un equipo Nanodrop (Thermo Scientific, Wilmington, DE).

#### 5.4 Secuenciación.

A partir de los amplicones de gp41 obtenidos por RT-PCR se realizó la secuenciación del gen mediante la técnica de terminador fluorescente empleando el kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Life Technologies, Carlsbad, CA); éste método usa una hebra sencilla de DNA a partir de la cual produce fragmentos de DNA de distintas longitudes. La formación de los fragmentos ocurre mediante la unión de desoxinucleótidos (dNTPs) con un enlace fosfodiéster entre el extremo 3' –OH de un dNTP y el extremo 5' –P de otro, a su vez se añaden las cuatro variantes (A, G, C, T) de dideoxinucleótidos (ddNTPs) marcados con un fluorocromo diferente, estos carecen del grupo –OH en el extremo 3' y por lo tanto inhiben la elongación de la cadena; cuando los fragmentos son analizados en un equipo automatizado mediante electroforesis capilar un láser incide sobre cada fragmento y detecta el fluorocromo al extremo de cada cadena y a partir de esto se reconstruye la secuencia del fragmento del fragmento original. Éste método es en esencia el método de secuenciación de Sanger automatizado.

Para esto se emplearon 7 *primers* que generan secuencias que cubran toda la región de interés. Las secuencias de los *primers* fueron las siguientes:

Tabla 5.4. Secuencias de los *primers* empleados en la secuenciación del gen *gp41*.

Primer	Secuencia
AV322	5' AAGCAATGTATGCCCTCC 3'
AV324	5' GGCAAAGAGAAGAGTGGT 3'
AV326	5' TTGGGGTTGCTCTGGAAAAC 3'
AV327rev	3' TTTTATATACCACAGCCA 5'
AV330	5' GGAGCCTGTGCCTCTTCA 3'
AV329rev	3' GTCCCAGAAGTTCCACA 5'
AV331rev	3' TCTCATTCTTTCCCTTA 5'
AV321rev	3' TTGCTACTTGTGATTGCTCCATG 5'

Las reacciones de secuenciación fueron las siguientes:

- Big Dye Terminator v3.1      1 µL
- Buffer 5x                              2 µL
- Primer (2 µM)                        2 µL
- DNA (15ng/ µL)                      2 µL
- H<sub>2</sub>O                                        3 µL

Las condiciones para la reacción de secuenciación fueron:

- 40 ciclos de
  - 10 sec 96 °C
  - 5 sec 50 °C
  - 1 min 60 °C

Se empleó un secuenciador capilar ABI Prism 3730xl Genetic Analyzer (Life Technologies, Carlsbad, CA). Los datos obtenidos fueron analizados con el software Sequencing Analysis, provisto por el fabricante, y se ensamblaron los fragmentos con base en la cepa de VIH de laboratorio HXB2 utilizando el software SeqScape, provisto por el fabricante.

## 5.5 Alineamiento

Utilizando las secuencias obtenidas con SeqScape se elaboró un alineamiento con *ClustalX* mediante el software MEGA 5.05 empleando como base la secuencia de *gp41* de la cepa de VIH HXB2. MEGA 5.05 permite el análisis comparativo de secuencias (nucleótidos o aminoácidos) y se utiliza para reconstruir la historia filogenética de éstas y crear alineamientos, a su vez es útil para el desarrollo de análisis de máxima verosimilitud, gracias a éste análisis es posible inferir

estados ancestrales, árboles evolutivos y permite seleccionar el modelo de sustitución más adecuado para el set de datos [60] (ver sección 5.8).

## 5.6 Análisis de resistencia.

Una vez alineadas las secuencias con *Clustal X* se buscaron manualmente las mutaciones de resistencia en los sitios conocidos de gp41 en donde los inhibidores de la fusión, en específico Enfuvirtida, actúan (región HR1) utilizando como guía la base de datos de resistencia a antirretrovirales de la Universidad de Stanford de mutaciones de resistencia a fármacos antirretrovirales de VIH y mutaciones compensatorias (región HR2) que se muestran en las tablas 1.7.1.1 (HR1) y 1.7.1.2 (HR2) (<http://hivdb.stanford.edu/>).

## 5.7 Análisis de variabilidad.

Para analizar la frecuencia de polimorfismos se realizó un análisis de entropía de Shannon. Al utilizar esta medida de incertidumbre para cuantificar la variabilidad de las secuencias en una posición determinada esta herramienta incorpora las frecuencias encontradas en esa posición (por ejemplo, en una posición en la que se encontró que 50% de las secuencias presentaban el aminoácido A y el otro 50% presentaba el aminoácido V ésta posición contará con una entropía mayor que otra en la cual el 90% es A y 10% V) y el número de posibilidades (una posición en la que el conjunto de secuencias presenta 90% A, 5% V y 5% G tiene una mayor entropía que 90%A y 10% V). En una posición donde todas las secuencias presentan el mismo aminoácido la entropía es cero. La entropía máxima posible es dependiente del número de variables en el set, por ejemplo, si se están considerando secuencias de DNA, las variables posibles son A, T, G y C, y la entropía máxima ocurriría si estas variables se presentaran en frecuencias iguales, o sea 25% cada una [61].

Si se estuviera interesado en una posición particular en la cual una mutación puede conferir resistencia a algún fármaco el conocimiento de las frecuencias de distintos aminoácidos en esa

posición en el conjunto de datos a analizar permite calcular la entropía de Shannon, y esta a su vez permitiría inferir cuales aminoácidos pueden presentarse en esa posición en una secuencia tomada aleatoriamente de ese mismo conjunto.

En la entropía de Shannon se considera cada columna del alineamiento de secuencias independientemente y se le asigna un valor a cada columna, este valor refleja la variabilidad en esa columna. No se toma en cuenta la historia filogenética de las secuencias. La entropía de Shannon es útil en situaciones donde simplemente se busca evaluar la diversidad en el conjunto de datos de manera transversal y no como un estudio longitudinal.

Para calcular la entropía de Shannon se requiere una variable discreta X (bases nitrogenadas si se analiza DNA o aminoácidos si se analizan proteínas), la cual tiene un número finito de

posibles valores  $x_1, x_2, \dots, x_n$  con probabilidades  $p_1, p_2, \dots, p_n$ , las cuales  $p_i \geq 0, i = 1, 2, \dots, n \sum_{i=1}^n p_i = 1$ .

Tomando esto en cuenta la fórmula empleada para calcular la entropía es:

$$H_n(p_1, p_2, \dots, p_n) = - \sum_{i=1}^n p_i \log_b p_i$$

Donde b puede ser base 2, e ó 10 [61].

Posteriormente se compararon las entropías de las dos poblaciones, en éste análisis se mide la diferencia entre las entropías de cada conjunto de datos, por lo tanto un valor de cero no significa que la entropía en esa posición sea cero, sino que para esa posición las poblaciones presentan un mismo valor de entropía. El análisis fue realizado en línea en la base de datos de Los Alamos (<http://www.hiv.lanl.gov>) con la herramienta Entropy-Two que permite comparar dos sets de alineamientos.

## 5.8 Análisis Filogenético.

Para ahondar en la filogenia regional del virus se realizaron árboles filogenéticos de máxima verosimilitud utilizando el software MEGA 5.05. Se corrieron 1000 repeticiones de bootstrap, esto es un remuestreo de los datos del conjunto (en este caso 1000 remuestreos). Al finalizar los remuestreos el programa arroja un árbol consenso con base en las ramas que se repitieron más durante los remuestreos.

Se empleó la corrección de Tamura-Nei, éste es un modelo de sustitución que toma en cuenta las diferencias en la tasa de sustitución entre nucleótidos y la desigualdad de frecuencia de éstos [60]. Las poblaciones fueron analizadas por separado emitiendo un árbol filogenético para cada una de ellas y posteriormente se realizó un árbol filogenético conjunto para evaluar si el virus ha divergido evolutivamente entre ellas o si se mantienen homogéneas. En particular se seleccionó la corrección de Tamura-Nei debido a que es la más empleada en este tipo de análisis lo cual hace más plausible la comparación de éste análisis con otros ya publicados.

## 5.9 Análisis de presión selectiva.

Se realizó un análisis de razón de sustitución de mutaciones sinónimas (dS) y no sinónimas (dN) con el método SLAC (Single-Likelihood Ancestor Counting) para evaluar cuáles son las posiciones bajo presión de selección utilizando el servidor en línea [www.datamonkey.org](http://www.datamonkey.org). Este método construye secuencias ancestrales mediante máxima verosimilitud y estima los valores de variación en cada posición, finalmente arroja una lista de posiciones en las cuales la razón de sustituciones no sinónimas, en las que ocurre un cambio de aminoácido, es significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) a la de sustituciones sinónimas, en las que hay un cambio de nucleótido mas no de aminoácido ( $dN > dS$ ), esto indica la presencia de fuerzas de presión selectiva en esos sitios, por lo tanto el concepto de selección positiva se refiere a un incremento en la frecuencia de alelos mutantes que confieren ventajas de adecuación al virus en comparación al resto de la población viral [62].

Una vez determinadas las posiciones bajo presión selectiva positiva se generaron secuencias consenso para México y Guatemala utilizando la herramienta en línea Consensus Maker disponible en <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/CONSENSUS/consensus.html> la cual, a partir de un set de secuencias alineadas calcula la secuencia consenso para ese set empleando el aminoácido más común en esa posición (para éste análisis se determinó que el aminoácido debía presentarse en al menos el 30% de las secuencias). Las secuencias consenso fueron alineadas con el software MEGA 5.05 y comparadas con una secuencia de referencia proveniente de Estados Unidos de América del subtipo B, se decidió comparar las secuencias consenso con una referencia de Estados Unidos debido a la proximidad geográfica entre los países. Posteriormente se ubicaron las posiciones bajo presión de selección positiva en las secuencias consenso de aminoácidos de gp41 en México y Guatemala por separado y utilizando mapas de epítomos de HLA y de anticuerpos disponibles en línea en la base de datos de Los Alamos (<http://www.hiv.lanl.gov/>) se buscó si estas posiciones se encontraban bajo presión de selección por alguna de estas dos moléculas.

## 6. Resultados

### 6.1 Cohorte

Se utilizaron muestras de plasma de 53 pacientes de Guatemala enrolados en el proyecto Mesoamericano del CIENI procedentes del Hospital Roosevelt de la Ciudad de Guatemala provenientes de todos los departamentos del país, y 51 pacientes de México inscritos en la cohorte de Epidemiología Molecular del VIH en México del CIENI procedentes de clínicas de 12 estados del país. La mediana de edad de los pacientes de ambos países fue de 35 años y en su mayoría fueron hombres. El porcentaje de hombres en Guatemala fue menor que en México debido a que ahí se realiza reclutamiento de mujeres embarazadas y por lo tanto existe un ligero sesgo de género. Todos los pacientes eran vírgenes a tratamiento antirretroviral al momento de la toma de muestra y progresaban típicamente en la infección; la mediana de linfocitos T CD4+ fue de 209.5 células/  $\mu$ L para Guatemala y 235.5 células/  $\mu$ L para México, a su

vez la mediana de carga viral (CV) fue de 36,482 copias/ml para Guatemala y de 88,733 copias/ml para México, datos que reflejan una detección tardía de la infección característica de los países latinoamericanos (Tabla 6.1).

Tabla 6.1 Características generales de la cohorte.

<b>Parámetros</b>	<b>Guatemala</b>	<b>México</b>
n	53	51
Mediana de edad (min-max)	35 (18-57)	35 (18-58)
% Hombres	69.2%	83.7%
Mediana de CD4 (células/ μL)(min-max)	209.5 (13-1092) σ(259)	235.3 (2.1-667.5) σ(175)
Mediana de CV (copias/ml)	36,482 σ(213,611)	88,733 σ(184,021)

Para analizar posibles variaciones dentro de los países, se dividió por región geográfica a los pacientes de cada país. Para México las regiones definidas fueron norte, centro y sur y para Guatemala la división fue norte, sur y Ciudad de Guatemala.

En cuanto a procedencia la cohorte mexicana se describe de la siguiente manera: del norte del país se registraron 15 pacientes para un total de 29.4%, del centro se encontraron 17 pacientes para un porcentaje de 33.3% y provenientes de la región sur se obtuvieron 18 pacientes que equivalen al 35.3%, además de información de procedencia faltante de uno de los pacientes. En la figura 6.1.1 se muestra la división regional del país y la distribución de los pacientes.

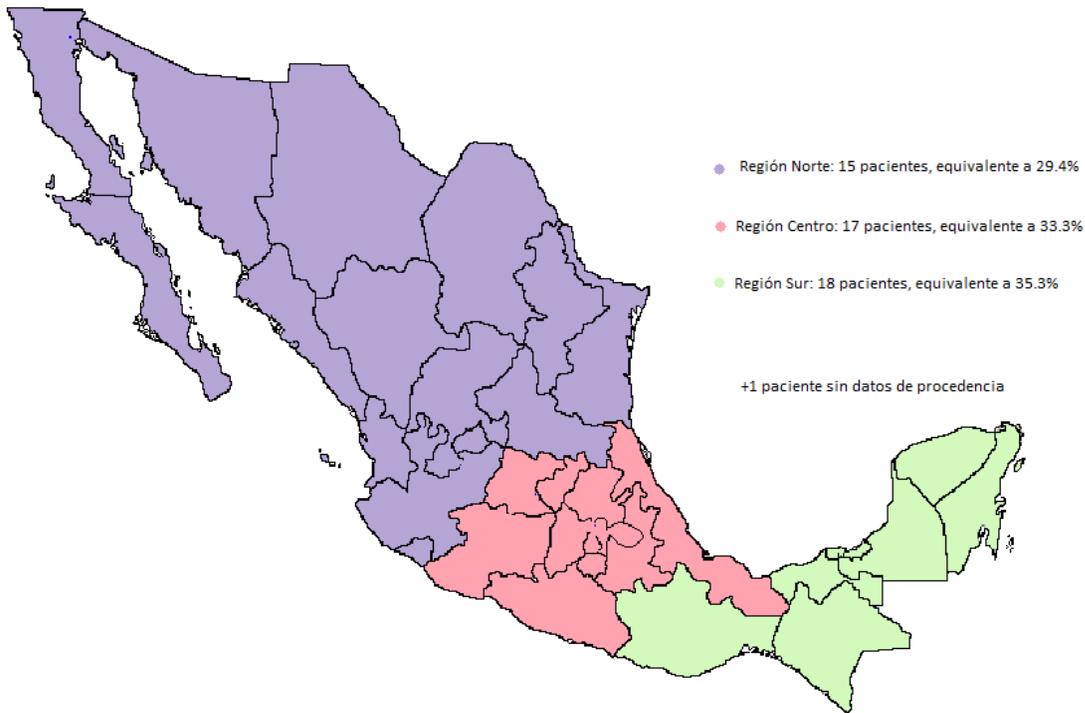


Figura 6.1.1 Distribución geográfica de la cohorte mexicana. Se realizó una división regional arbitraria del país, en morado se muestra la región norte de donde proceden 15 pacientes (29.4%), en rosado la región centro con 17 pacientes reportados (33.3%) y en verde la región sur con un total de 18 pacientes (35.3%). Aunado a estos los datos disponibles de uno de los pacientes carecían de información de procedencia.

Por otra parte la cohorte guatemalteca presentaba las siguientes características demográficas: de la zona norte se incluyeron seis pacientes los cuales representan al 11.3% del grupo de estudio, de la Ciudad de Guatemala provenían 29 de los pacientes que equivalen a 54.7%, del sur del país fueron registrados 16 pacientes o sea el 30.2%. Además, se reportaron dos pacientes que a pesar de ser guatemaltecos y haber sido diagnosticados en Guatemala residen en El Salvador, éstas dos muestras representan el 3.8% de los pacientes de la cohorte guatemalteca. Las distribuciones regionales están representadas en la figura 6.1.2.

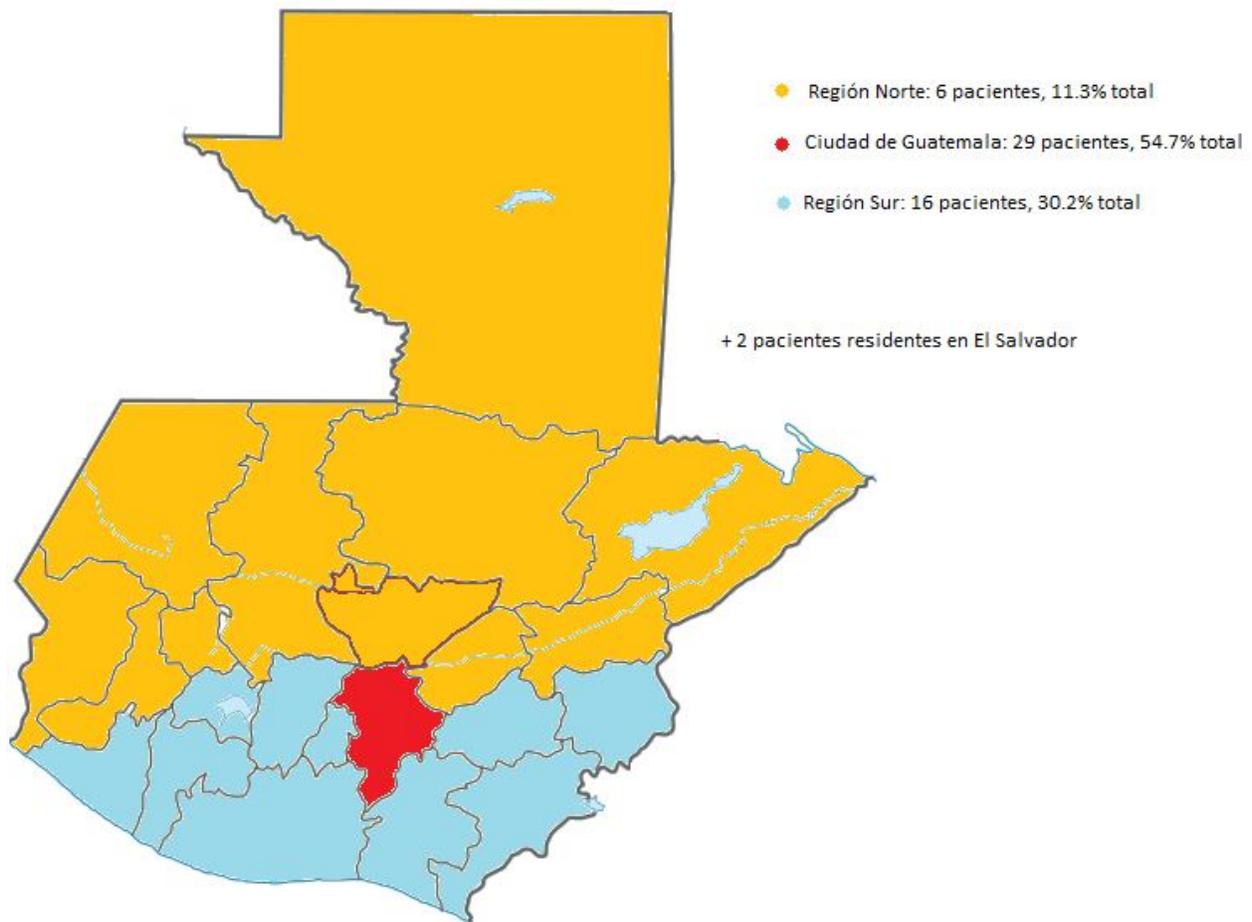


Figura 6.1.2 Distribución geográfica de la cohorte guatemalteca. Se realizó una división arbitraria del país, en anaranjado se muestra la región norte de donde provenían seis pacientes (11.3%) de la cohorte, en rojo se delimita la Ciudad de Guatemala con 29 pacientes (54.7%) y en azul se marca la región sur con 16 pacientes (30.2%), además de estos se reportaron dos pacientes (3.8%) que residen en El Salvador.

Una vez descritas las características de la cohorte se procedió a realizar el análisis de resistencia de gp41 a inhibidores de la fusión.

## 6.2 Análisis de resistencia

Se evaluó la incidencia de mutaciones de resistencia reportadas por la base de datos de resistencia a antirretrovirales de la Universidad de Stanford en la región HR1 (tabla 1.7.1.1) y las

mutaciones de compensación en la región HR2 (1.7.1.2) de gp41 en las cohortes mexicana y guatemalteca, y se obtuvieron los siguientes datos:

#### 6.2.1 Resistencia transmitida a inhibidores de fusión en México.

Se determinó una prevalencia de resistencia de 2% (1/51) (tabla 6.2.1). En rojo se muestran las mutaciones en HR1 que por sí mismas generan resistencia y en negro se muestran aquéllas que son polimórficas en esa región. De acuerdo a la base de datos de resistencia a antirretrovirales de la Universidad de Stanford, se consideraron como posibles mutaciones de resistencia a aquéllas presentes en los codones 36, 37, 38, 40, 42 y 43 en la región HR1. A su vez, mutaciones en las posiciones 44 y 45 se reportan como accesorias para la región HR1. Para HR2, las posiciones de las mutaciones compensatorias son 126, 137 y 138 (<http://hivdb.stanford.edu/>). La mutación G36D explicó el único caso de resistencia transmitida observado en la cohorte mexicana. De manera interesante se observaron los polimorfismos N42D e I37M en posiciones asociadas a resistencia, que *per se* no han sido asociados con disminución de la susceptibilidad a enfuvirtida, así como la mutación L44M, que funciona como accesorio y por sí sola no produce resistencia a inhibidores de fusión. Adicionalmente, se observaron mutaciones compensatorias en HR2 en 17.6% (9/51) pacientes de la cohorte.

Tabla 6.2.1 Pacientes de México que presentaron mutaciones asociadas a resistencia a inhibidores de fusión en las regiones HR1 y HR2.

Paciente	Mutaciones HR1	Mutaciones HR2
347	G36D*	
348	L44M	N126K
373		S138A
375		S138A
383		N126K S138A
395	N42D	
410		N126Q S138A
1025		S138A
1085		S138A
1229		S138A
E130		S138A
E143	I37M	

\*En rojo se muestran las mutaciones que confieren resistencia a enfuvirtida reportadas en la base de datos de resistencia a antirretrovirales de la Universidad de Stanford. Los espacios en blanco indican mutaciones no encontradas en la región correspondiente.

### 6.2.2 Resistencia transmitida a inhibidores de fusión en Guatemala.

Se determinó una prevalencia de resistencia de 3.8% (2/53) (tabla 6.2.2). En rojo se muestran las mutaciones en HR1 que por si mismas generan resistencia y en negro se muestran aquéllas que son polimórficas en esa región. La mutación G36D explicó los dos casos de resistencia transmitida observados en la cohorte guatemalteca. Adicionalmente, se encontraron polimorfismos en la posición 42 previamente no asociados a resistencia a enfuvirtida en 15.1% (8/53) de los virus y el polimorfismo L44M, identificado como mutación accesoria en 1.8% (1/53) de los virus. Además, se identificaron mutaciones compensatorias en HR2 en 20.8% (11/53) de los virus analizados.

Tabla 6.2.2 Pacientes de Guatemala que presentaron mutaciones asociadas a resistencia a inhibidores de fusión en las regiones HR1 y HR2.

Paciente	Mutaciones HR1	Mutaciones HR2
G005	G36D(G)*	N126K
G007	G36D	
G286		S138A
G553		S138A
G566	N42S(N)	S138A
G572		S138A
G232	N42H	
G283	N42S	
G235		N126Q(R)
G209		S138N(S)
G229	N42S(N)	
G231	N42S	
G282	N42S	
G290		N126S
G292	N42S	
G565		S138A
G567	N42S	
G080		N126K
G216	L44M	
G223		S138A

\*Entre paréntesis se indican aminoácidos adicionales encontrados entre las variantes de la población viral. Los espacios en blanco indican mutaciones no encontradas en la región correspondiente. En rojo se muestran las mutaciones que confieren resistencia reportadas en la base de datos de resistencia a antirretrovirales de la Universidad de Stanford.

Aunque se observaron mutaciones asociadas a resistencia a enfuvirtida en baja cantidad en ambas cohortes, es interesante que los virus circulantes mostraron polimorfismos no asociados a resistencia en posiciones de gp41 asociadas con resistencia, así como mutaciones accesorias y compensatorias (Tabla 6.2.3). En especial, los polimorfismos N42S y S138A fueron más frecuentes en Guatemala en las regiones HR1 y HR2 respectivamente, y S138A en HR2 en México.

Tabla 6.2.3 Frecuencia de los polimorfismos en posiciones asociadas a resistencia en HR1 o posiciones de mutaciones compensatorias en HR2 en VIH circulante en México y Guatemala.

<b>Población</b>	<b>N42S/H/D</b>	<b>L44M</b>	<b>N126S/K/Q/R</b>	<b>S138A/N</b>
México	2.0% (1/51)	2.0% (1/51)	5.9% (3/51)	15.7% (8/51)
Guatemala	15.1% (8/53)	1.9% (1/53)	7.5% (4/53)	13.2% (7/53)

### 6.2.3 Relaciones filogenéticas entre virus con polimorfismos en posiciones asociadas a resistencia.

Para explorar la existencia de posibles eventos fundadores que pudieran explicar la transmisión y diseminación de polimorfismos en posiciones asociadas a resistencia en virus circulantes en las regiones geográficas de interés, se estudiaron las relaciones filogenéticas de los virus con los polimorfismos más frecuentes: N42S y S138A en Guatemala y S138A en México. Se buscó determinar si los polimorfismos tenían alguna relación evolutiva en cada una de las poblaciones por separado y se analizó su posición en un árbol filogenético de máxima verosimilitud con el modelo de Tamura-Nei con 1000 repeticiones de Bootstrap. Se utilizó la secuencia gp41 de la cepa de referencia de VIH HXB2 como secuencia enraizadora para cada uno de los árboles.

En el caso de las secuencias mexicanas, se observó que el polimorfismo S138A aparecía independientemente en los pacientes 410 y 373; sin embargo, se observó también un



mutación de resistencia G36D, G007 y G005 no formaron ningún agrupamiento con las secuencias que presentaron los polimorfismos N42S o S138A y tampoco se agruparon entre ellas.

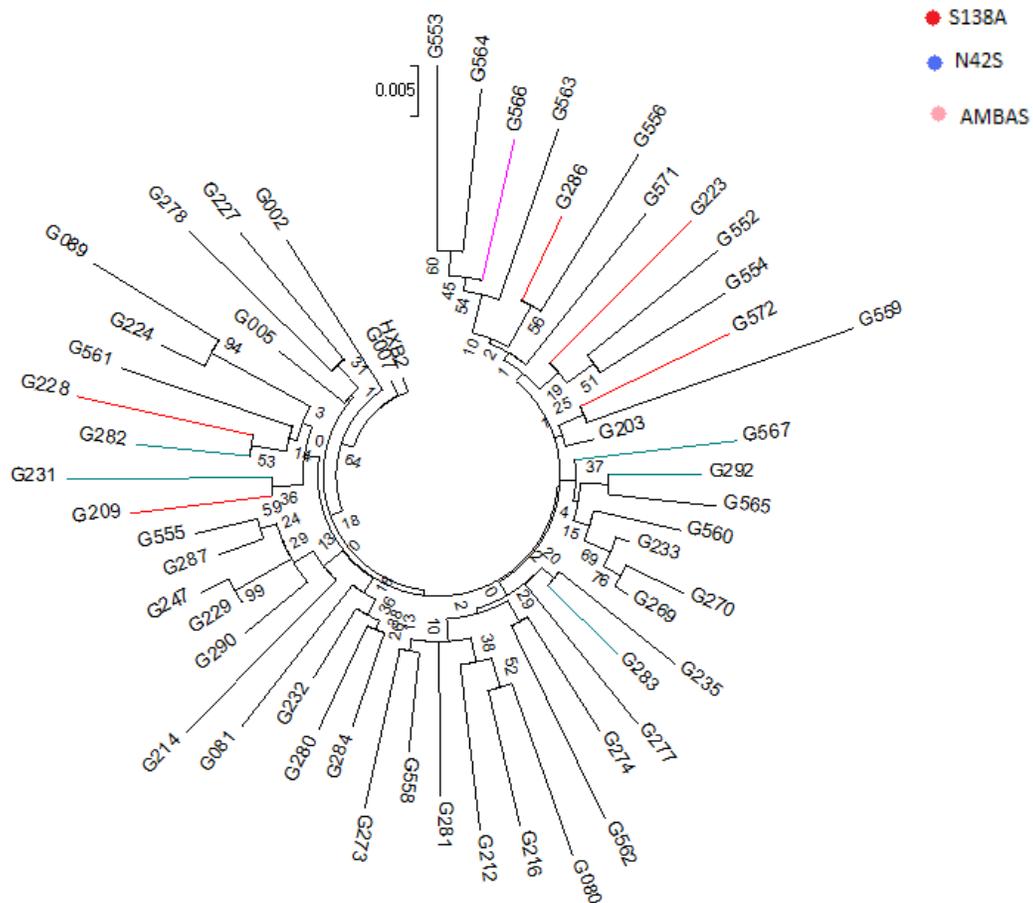


Figura 6.2.2 Árbol filogenético de las secuencias guatemaltecas. Se forman tres agrupamientos y una secuencia con el polimorfismo aislado. Las ramas en rojo muestran el polimorfismo S138A, en azul se muestra N42S y en rosa se muestra la secuencia que presenta ambos polimorfismos. El árbol se realizó con el software MEGA 5.05 disponible en línea con el método de máxima verosimilitud con 1000 repeticiones de Bootstrap empleando la corrección de Tamura-Nei.

6.2.4 Impacto de polimorfismos en posiciones asociadas a resistencia en la capacidad replicativa viral.

Para estudiar el impacto de polimorfismos en posiciones asociadas a resistencia a inhibidores de fusión en la capacidad replicativa del VIH se analizó si la presencia de estos polimorfismos se correlaciona con la carga viral y el conteo de linfocitos T CD4+.

Tabla 6.2.4. Carga Viral y conteo de Linfocitos T CD4+ en los pacientes con polimorfismos más comunes en México (S138A).

<b>Paciente</b>	<b>Polimorfismos</b>	<b>Carga Viral(copias por ml de plasma)</b>	<b>CD4+ (células por µl de sangre)</b>
373	S138A	322,655	138.8
375	S138A	40,810	6
383	S138A, N126K	777,000	6.74
410	S138A, N126Q	124,000	411
1025	S138A	283,107	62.68
1085	S138A	85,366	328.06
1229	S138A	66,497	613.46
E130	S138A	42,392	314

Tabla 6.2.5. Carga Viral y conteo de Linfocitos T CD4+ en los pacientes con polimorfismos más comunes en Guatemala (N42S y S138A).

<b>Paciente</b>	<b>Polimorfismos</b>	<b>Carga Viral</b> (copias por ml de plasma)	<b>CD4+</b> (células por $\mu$ l de sangre)
G209	S138A	64,770	62
G223	S138A	13,583	210
G286	S138A	27,993	213
G553	S138A	2,065	476
G565	S138A	7,332	13
G572	S138A	89,317	209
G229	N42S	127,674	386
G231	N42S	2,217	541
G282	N42S	1,004,300	94
G283	N42S	51,728	332
G292	N42S	25,640	392
G567	N42S	345	101
G566	S138A, N42S	176,620	No Disponible

Tabla 6.2.6. Comparación de las medianas de Carga Viral (CV) en el total de pacientes de México y Guatemala y las medianas de los pacientes que presentan los polimorfismos más comunes N42S, S138A y la mutación de resistencia G36D para Guatemala y S138A y G36D para México; en la mediana de CV de secuencias con polimorfismos se incluyen los datos de los pacientes con la mutación G36D.

<b>Cohorte</b>	<b>Mediana CV total</b>	<b>Mediana CV polimorfismos</b>	<b>Mediana CV S138A</b>	<b>Mediana CV N42S</b>	<b>Mediana CV G36D</b>
<b>México</b>	88,733 (n=51)	124,000 (n=9)	104,683(n=8)	No Aplica	133,423 (n=1)
<b>Guatemala</b>	36,482 (n=53)	34,507 (n=15)	27,993 (n=7)	51,428 (7)	69,612 (n=2)

A partir de la comparación de medianas de carga viral se encontró que en la cohorte mexicana las diferencias son considerables, en todos los casos en los que se presentan polimorfismos la mediana del conteo de carga viral es mayor que el de la mediana total por más de 30,000 copias y como se esperaba la carga viral en el paciente con la mutación G36D es mayor que en todos

los casos. En la cohorte guatemalteca contrariamente a lo encontrado en la mexicana la mediana de carga viral de pacientes con polimorfismos totales y la de pacientes con el polimorfismo S138A es más baja que la mediana de carga viral de pacientes totales, sin embargo en las medianas de carga viral de pacientes con el polimorfismo N42S y con la mutación de resistencia G36D siguen el patrón esperado con conteos considerablemente más altos que los del resto de la cohorte (51,428 y 69,612 copias respectivamente).

El aumento tan notorio en la carga viral de pacientes con la mutación de resistencia G36D y el hecho de que estos pacientes sean a su vez vírgenes a tratamiento antirretroviral sugiere no solo que esta mutación es relativamente común en ambas poblaciones independientemente de presión por fármacos antirretrovirales, sino que su presencia tiene un impacto positivo en la capacidad replicativa viral.

### 6.3 Análisis de variabilidad en gp41.

Se realizó un análisis de entropía de Shannon en ambas poblaciones por separado para evaluar la variabilidad de las secuencias dentro del gen gp41 del VIH circulante para cada país. Posteriormente se compararon las entropías de cada posición de gp41 de los virus de ambos países para evaluar posibles diferencias geográficas en la variabilidad del VIH. Como medida de incertidumbre para cada posición en un alineamiento de secuencias, la entropía de Shannon es un parámetro matemático útil para comparar la variabilidad genética dentro de un gen en una población determinada, así como para comparar la variabilidad de un gen entre secuencias de dos cohortes.

#### 6.3.1 Análisis de variabilidad de gp41 en VIH circulante en México.

El análisis de entropía de Shannon de las secuencias de gp41 de virus circulantes en México se muestra en la Figura 6.3.1. De acuerdo a lo esperado, la región HR1 mostró una alta

conservación con respecto al resto de la proteína gp41, concentrando posiciones con bajos valores de entropía de Shannon. Sin embargo, la región HR2 mostró una alta variabilidad, sugiriendo una alta plasticidad de la proteína en la zona.

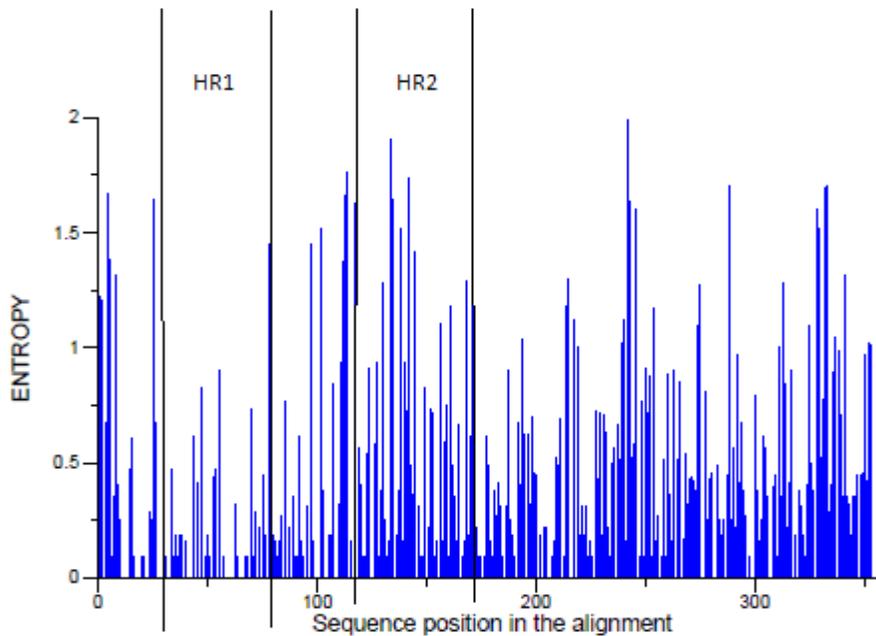


Figura 6.3.1 Análisis de entropía de Shannon en las secuencias de gp41 de VIH circulante en México. Se muestra el valor de entropía de Shannon para cada posición del alineamiento de 51 secuencias de gp41 de virus circulantes en México. Los valores de entropía de Shannon se calcularon con la herramienta disponible en línea en la base de datos de VIH de Los Alamos (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/ENTROPY/entropy.html>). Se muestran entre barras negras las regiones HR1 y HR2 de la proteína gp41.

### 6.3.2 Análisis de variabilidad de gp41 de VIH circulante en Guatemala.

El análisis de entropía de Shannon de las secuencias de gp41 de virus circulantes en Guatemala se muestra en la Figura 6.3.2. Similarmente al caso de México, la región HR1 de los virus circulantes en Guatemala presentó una alta conservación al concentrar posiciones con bajos valores de entropía de Shannon, mientras que la región HR2 presentó una mayor variabilidad, al concentrar posiciones con altos valores de entropía de Shannon.

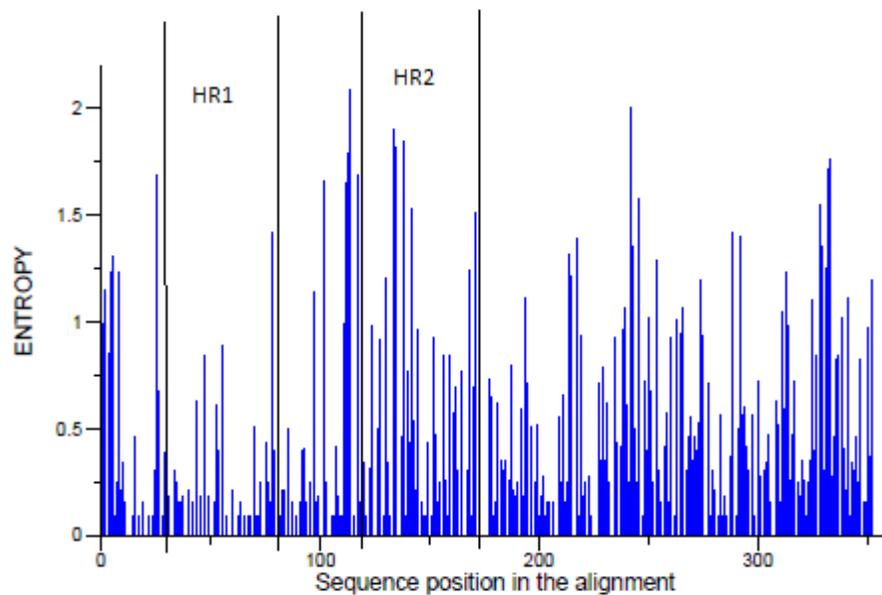


Figura 6.3.2 Análisis de entropía de Shannon en las secuencias de Guatemala. Se muestra el valor de entropía de Shannon para cada posición del alineamiento de 53 secuencias de gp41 de virus circulantes en Guatemala. Los valores de entropía de Shannon se calcularon con la herramienta disponible en línea en la base de datos de VIH de Los Alamos (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/ENTROPY/entropy.html>). Se muestran entre barras negras las regiones HR1 y HR2 de la proteína gp41.

### 6.3.3 Comparación de variabilidad en gp41 de VIH circulante en México y Guatemala.

Posteriormente se analizó la diferencia de entropía de Shannon para cada posición del alineamiento de secuencias de gp41 de los virus de México y Guatemala, con el objeto de comparar la variabilidad de los virus circulantes en cada país (Figura 6.3.3).

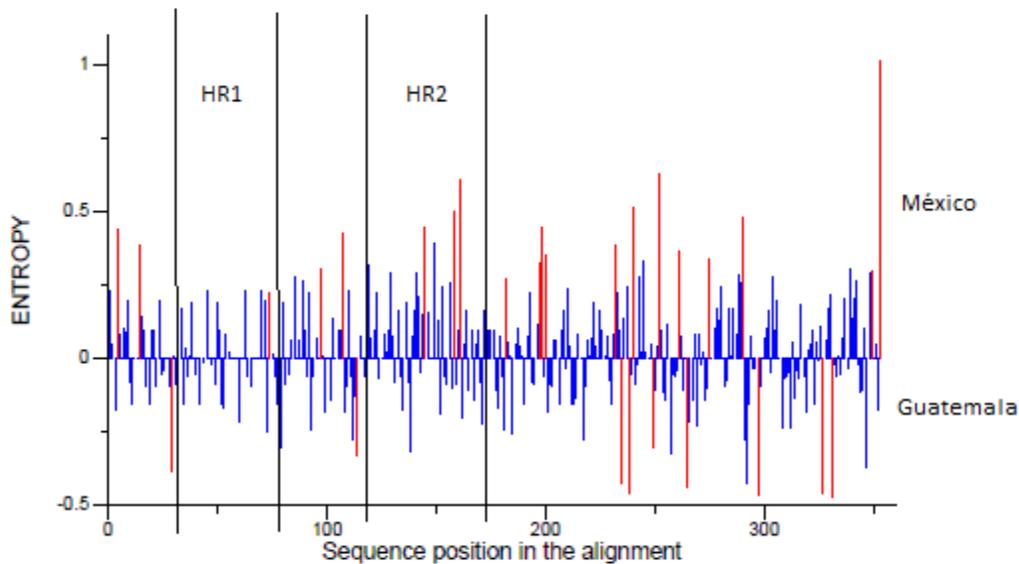


Figura 6.3.3 Comparación de variabilidad en gp41 de VIH circulante en México y Guatemala. Se muestran diferencias de entropía para cada posición del alineamiento de gp41 de VIH de México y Guatemala. Las diferencias de entropía fueron calculadas con la herramienta en línea de la base de datos de VIH de Los Alamos (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/ENTROPY/entropy.html>). Las barras hacia la parte superior de la gráfica se muestran posiciones para las cuales la diferencia de entropía de Shannon fue mayor en las secuencias de México; las barras hacia la parte inferior de la gráfica muestran posiciones donde la diferencia de entropía de Shannon fue mayor para las secuencias de Guatemala. En rojo se muestran las posiciones para las cuales la diferencia de entropía de Shannon fue estadísticamente significativa ( $p=0.05$ ). Entre barras negras se delimitan las regiones HR1 y HR2 de gp41.

El análisis de diferencia de entropía de Shannon mostró que la población viral mexicana es en general más polimórfica que la guatemalteca, observándose más posiciones con mayor entropía en los virus de México. La mayor parte de las posiciones con entropías de Shannon distintas entre los virus de México y Guatemala se observaron hacia la porción terminal de gp41. Es interesante observar que la región HR2 de los virus de México mostró mayor variabilidad que la de los virus de Guatemala.

#### 6.4 Análisis de Presión de Selección por Modelo de Codones.

Con el objeto de estudiar el posible papel de presiones selectivas en las diferencias en la variabilidad observadas en las secuencias de gp41 de los virus circulantes en Guatemala y

México, se realizaron análisis de búsqueda de posiciones bajo selección positiva por razón de sustituciones sinónimas y no sinónimas (dN/dS) dentro del gen utilizando un modelo de codones del programa DataMonkey (<http://www.datamonkey.org/>) con el método SLAC.

En el caso de los virus de México se identificaron dos posiciones bajo presión selectiva en HR1 y tres en HR2 ( $p < 0.05$ , Tabla 6.4.1).

Tabla 6.4.1. Posiciones bajo presión selectiva positiva en HR1 y HR2 de VIH de la cohorte mexicana\*.

Posición del codón en el alineamiento	dN-dS Normalizado	Valor p
55	1.74635	0.003565
78	2.0831	0.0173803
97	2.80963	4.49E-05
102	2.28665	0.0065442
135	3.03564	0.0014381
140	1.20647	0.0431825
142	2.09666	0.0398007
194	1.51515	0.0114839
215	2.31747	0.0004803
240	2.0339	0.0017405
275	2.34365	0.0019777
288	2.64529	0.0067073
317	1.24457	0.0112448
328	2.22278	0.0036335
329	1.93751	0.0195419
332	2.07116	0.0097593
333	2.56078	0.0165223
341	1.61135	0.0366827
350	2.05715	0.0007184

\*Se muestran posiciones significativas ( $p < 0.05$ ) con mayor tasa de sustituciones no sinónimas (dN) que de sustituciones sinónimas (dS), de acuerdo al modelo SLAC del servidor en línea DataMonkey (<http://www.datamonkey.org/>). En rojo se muestran las posiciones dentro de la región HR1 y en azul aquellas dentro de HR2.

En el caso de Guatemala se encontró tan sólo una posición bajo presión de selección positiva en la región HR1, mientras que siete posiciones presentaron evidencia de estar bajo presión de selección positiva en la región HR2 ( $p < 0.05$ , Tabla 6.4.2).

Tabla 6.4.2. Posiciones bajo presión selectiva positiva en HR1 y HR2 de VIH de la cohorte guatemalteca\*.

Posición del codón en el alineamiento	dN-dS Normalizado	Valor p
26	0.699026	0.0434725
55	0.942948	0.0350167
97	1.86799	0.0002081
102	2.42127	0.000153
117	1.58221	0.0389676
127	1.18546	0.0289246
134	1.86396	0.0311314
135	2.89898	0.0007988
140	1.06038	0.0234537
156	0.904584	0.0477087
170	1.09957	0.0066214
194	1.18051	0.0214671
214	1.356	0.0082643
215	1.48981	0.0015579
227	0.976605	0.0360893
238	0.898283	0.0330422
239	1.00079	0.0396243
244	0.782907	0.0431573
317	0.741071	0.0332574
328	1.98078	0.0006878
329	1.36102	0.0176652
332	2.34118	0.001708
341	1.31498	0.0124974
352	1.11426	0.0317532

\*Se muestran posiciones significativas ( $p < 0.05$ ) con mayor tasa de sustituciones no sinónimas (dN) que de sustituciones sinónimas (dS), de acuerdo al modelo SLAC del servidor en línea DataMonkey (<http://www.datamonkey.org/>). En rojo se muestran las posiciones dentro de la región HR1 y en azul aquellas dentro de HR2.

Interesantemente, tres de las posiciones bajo presión selectiva fueron observadas tanto para México como para Guatemala: la posición 55 en HR1 y las posiciones 135 y 140 en HR2. Esto sugiere la existencia de un componente común en las presiones selectivas que actúan sobre los virus circulantes en ambos países, pero también de un componente único actuando sobre los virus de México o de Guatemala exclusivamente.

#### 6.4.1 Obtención de secuencias consenso de gp41 para VIH circulante en México y Guatemala.

Una vez delimitadas las posiciones bajo presión de selección en las secuencias se determinó que para explorar posibles diferencias en el gp41 que pudieran reflejarse a nivel poblacional en la mayoría de los virus circulantes en México y Guatemala se obtendrían secuencias consenso para cada una de las poblaciones. Las secuencias consenso fueron obtenidas utilizando la herramienta *Consensus Maker* disponible en línea en la página web de la base de datos de Los Alamos (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/CONSENSUS/consensus.html>), posteriormente fueron alineadas empleando el software MEGA 5.05 y comparadas con una secuencia de referencia de gp41 subtipo B de Estados Unidos tomada de la base de datos de Los Alamos. Las secuencias consenso fueron comparadas entre sí con el fin de determinar diferencias propias de cada cohorte que se hayan fijado a nivel poblacional.

Tras el análisis se encontraron un total de 31 posiciones distintas entre las tres secuencias del gen, 10 posiciones diferentes en los consensos de México y Guatemala, 28 posiciones distintas entre el consenso de México y la referencia de Estados Unidos y 25 entre la secuencia consenso de Guatemala y la referencia estadounidense (Tabla 6.4.3. y Figura 6.4.3). Se seleccionó una secuencia de Estados Unidos debido a la cercanía geográfica entre los tres países en cuestión. La presencia de estas posiciones indica presiones de selección únicas en cada población que pueden deberse a sus características inmunogenéticas; estos resultados a su vez reflejan una mayor similitud entre las secuencias de México y Guatemala lo cual era esperado a causa de las características amerindias de las poblaciones, sorprendentemente la secuencia consenso guatemalteca fue más similar a la estadounidense que la mexicana.

Tabla 6.4.3. Diferencias en las posiciones entre las secuencias consenso de México y Guatemala y un virus de referencia del subtipo B de Estados Unidos tomado de la base de datos de Los Alamos.

Diferencias	Número de posiciones
Totales	31
México-Guatemala	10
México-USA	28
Guatemala-USA	25

USA	AVGTIGAMFL	GFLGAAGSTM	GAGSITLIVQ	ARHLLSGIVQ	QQNNLLRAIE	AQQHLLQLTV	WGIKQLQARV	LAVERYLRDQ
México	AVG-IGAMFL	GFLGAAGSTM	GAASVTLTVQ	ARQLLSGIVQ	QQNNLLRAIE	AQQHLLQLTV	WGIKQLQARV	LAVERYLKDQ
Guatemala	AVGTLGAMFL	GFLGAAGSTM	GAASITLTVQ	ARQLLSGIVQ	QQNNLLRAIE	AQQHLLQLTV	WGIKQLQARV	LAVERYLRDQ
USA	QLLGIWGCSSG	KLICITTVPW	NASWSNKSIN	MIWNNMTWMQ	WEREIDNYTG	IIYNLLEESQ	NQQEKNEQEL	LELDKWANLW
México	QLLGIWGCSSG	KLICITAVPW	NTSWSNKSID	EIWDNMTWMQ	WEKEIDNYTG	LIYTLIEESQ	NQQEKNEQEL	LELDKWASLW
Guatemala	QLLGIWGCSSG	KLICITAVPW	NTSWSNKSID	QIWNMTWMQ	WEREIDNYTG	LIYTLIEESQ	NQQEKNEQEL	LELDKWASLW
USA	NWFDITQWLW	YIRIFIMIVG	GLVGLKIVFA	VLSIVNRVRQ	GYSPLSFQTH	LPAPRGPDRP	EGIEEGGER	DRDRSGGAVN
México	NWFDITNWLW	YIKIFIMIVG	GLIGLRIVFA	VLSIVNRVRQ	GYSPLSFQTH	LPAPRGPDRP	EGIEEGGER	DRDRSGRLVN
Guatemala	NWFDITNWLW	YIKIFIMIVG	GLIGLRIVFA	VLSIVNRVRQ	GYSPLSFQTH	LPAPRGPDRP	EGIEEGGER	DRDRSGRLVD
USA	GFLTLIWDDL	WTLCSFSYHR	LRDLLLIVVR	IVELLGRRGW	EALKYWNLL	QYWSQELKNS	AVSLNNTAI	AVAEGTDRII
México	GFLALIWDDL	RSLCLFSYHR	LRDLLLIVAR	IVELLGRRGW	EALKYWNLL	QYWSQELKNS	AVSLLNATAI	AVAEGTDRII
Guatemala	GFLALIWDDL	RSLCLFSYHR	LRDLLLIAAR	IVELLGRRGW	EALKYWNLL	QYWSQELKNS	AVSLLNATAI	AVAEGTDRII
USA	EVAQRILRAF	LHIPRRIRQG	LERALL					
México	EVAQRIGRAI	LHIPRRIRQG	LERALL					
Guatemala	EVAQRIGRAI	LHIPRRIRQG	LERALL					

Figura 6.4.3. Comparación de la proteína gp41 de VIH circulante en México, Guatemala y una referencia del subtipo B proveniente de Estados Unidos. En la figura se muestran las secuencias consenso de las poblaciones analizadas (México en verde y Guatemala en rojo) y se comparan entre ellas mismas y con un subtipo b circulante en Estados Unidos (azul). Las posiciones distintas se marcan en el color correspondiente a cada país. Las secuencias consenso fueron obtenidas utilizando la herramienta en línea Consensus Maker disponible en la base de datos de Los Alamos (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/CONSENSUS/consensus.html>) y la secuencia de referencia estadounidense fue tomada de la base de datos de Los Alamos.

## 6.5 Posibles asociaciones entre la presión selectiva inmune y los sitios bajo presión selectiva positiva en gp41 en las secuencias consenso de gp41 para VIH circulante en México y Guatemala.

A continuación, se ubicaron en cada una de las secuencias consenso obtenidas para gp41, las posiciones bajo presión selectiva positiva determinadas por razones de sustituciones sinónimas y no sinónimas. Para tratar de explorar la posible asociación de estas posiciones con presión selectiva inmune por parte de HLA o de anticuerpos se procedió a buscar en mapas de epítomos. Los mapas consultados se encuentran en la base de datos de Los Alamos (<http://www.hiv.lanl.gov/content/immunology/maps/maps.html>). Se encontraron 31 posiciones bajo presión selectiva en total, de las cuales 10 coincidían en ambas poblaciones. Se marcaron los epítomos de HLA que coincidían con las posiciones bajo presión de selección o con aquellas que son distintas en las secuencias consenso y se determinaron las regiones con mayor presión de selección por anticuerpos (regiones reconocidas por al menos cinco anticuerpos humanos). Las posiciones ubicadas en la secuencia consenso son aquellas bajo presión de selección, sin embargo la numeración no coincide con la correspondiente a las tablas 6.4.1 y 6.4.2 debido a que el modelo de codones toma en cuenta los gaps en las secuencias como posiciones. Las secuencias consenso obtenidas carecen de gaps sin embargo las posiciones entre las tablas y las secuencias consenso son equivalentes.

10 de las 31 posiciones bajo presión de selección coinciden con posiciones en las cuales los consensos difieren; 16 de las 31 posiciones bajo presión de selección se encontraron dentro de epítomos de reconocimiento de HLA lo cual indica una presión inmune lo suficientemente grande para lograr cambios a nivel poblacional. Al menos tres posiciones bajo presión de selección se encuentran dentro de epítomos de HLA y regiones de reconocimiento de anticuerpos. De las 15 posiciones bajo presión de selección que no se encuentran dentro de epítomos de HLA, cinco se encuentran dentro de regiones de reconocimiento de anticuerpos.

Se encontraron 10 posiciones bajo presión de selección y 17 posiciones distintas al consenso que no entran dentro de las regiones de reconocimiento inmunológico reportadas en la base de datos de Los Alamos.

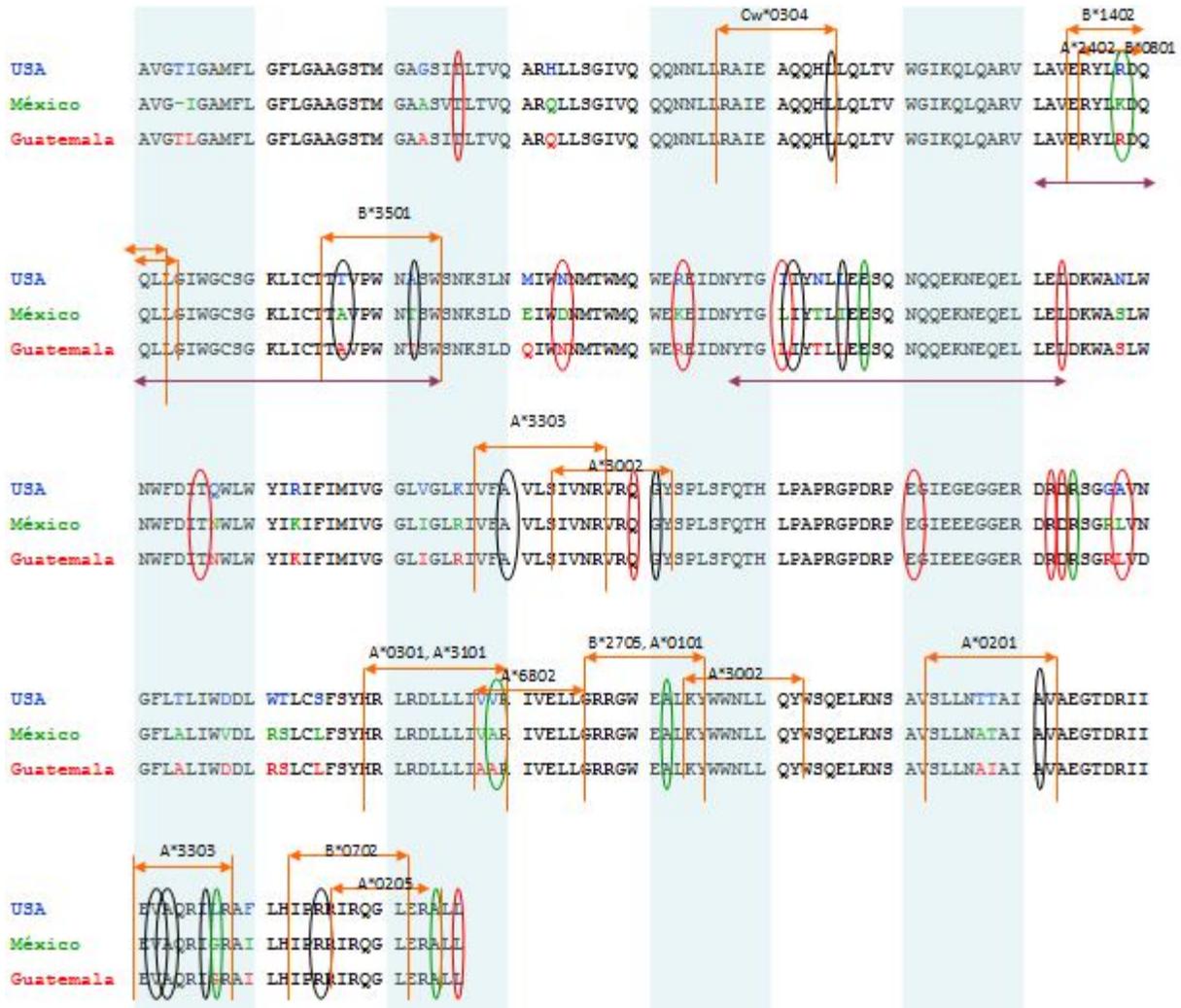


Figura 6.5. Presión de selección en gp41 de VIH circulante en México y Guatemala comparados con una secuencia estadounidense de referencia. Los aminoácidos en colores azul verde y rojo representan las posiciones en las cuales los consensos y la referencia difieren. Los óvalos representan las posiciones bajo presión de selección positiva determinadas por el modelo de codones (Sección 6.4), los óvalos verdes son las posiciones bajo presión de selección en la cohorte mexicana, los rojos representan las posiciones bajo presión de selección en la cohorte guatemalteca y los óvalos negros son las posiciones que coinciden en ambas poblaciones. Las flechas anaranjadas muestran los epitopos de linfocitos T citotóxicos (CTL) así como la molécula HLA que lo reconoce, presentes en base de datos de epitopos de CTLs definidos de manera óptima de la Base de Datos de Los Alamos (<http://www.hiv.lanl.gov/content/immunology/maps/maps.html>). Las flechas moradas indican regiones

inmunogénicas que son reconocidas por más de cinco anticuerpos humanos reportados en la base de datos de Los Alamos (<http://www.hiv.lanl.gov/content/immunology/maps/maps.html>).

## 6.6 Análisis filogenético de las secuencias de gp41 de virus circulantes en México y Guatemala.

Para comparar la variabilidad genética de gp41 de los virus circulantes en México y Guatemala se construyó un árbol filogenético incluyendo todas las secuencias obtenidas para los virus de ambos países. En general, algunas secuencias de México y de Guatemala formaron pequeñas agrupaciones por país, indicando que existen características particulares entre los virus dentro de Guatemala y otras características entre los virus de México. Sin embargo, algunas secuencias se agrupan entre países, lo cual sugiere una diversificación similar del VIH circulante en ambas poblaciones, no se observó una polarización del árbol entre secuencias de México y Guatemala, como se ha observado previamente por nuestro grupo para otros genes como *gag* y *pol* (datos no publicados, García-Morales *et al.*, CROI 2013). Estos datos sugieren una mayor similitud en gp41 en VIH circulante en México y Guatemala que en otros genes como *gag* y *pol*.

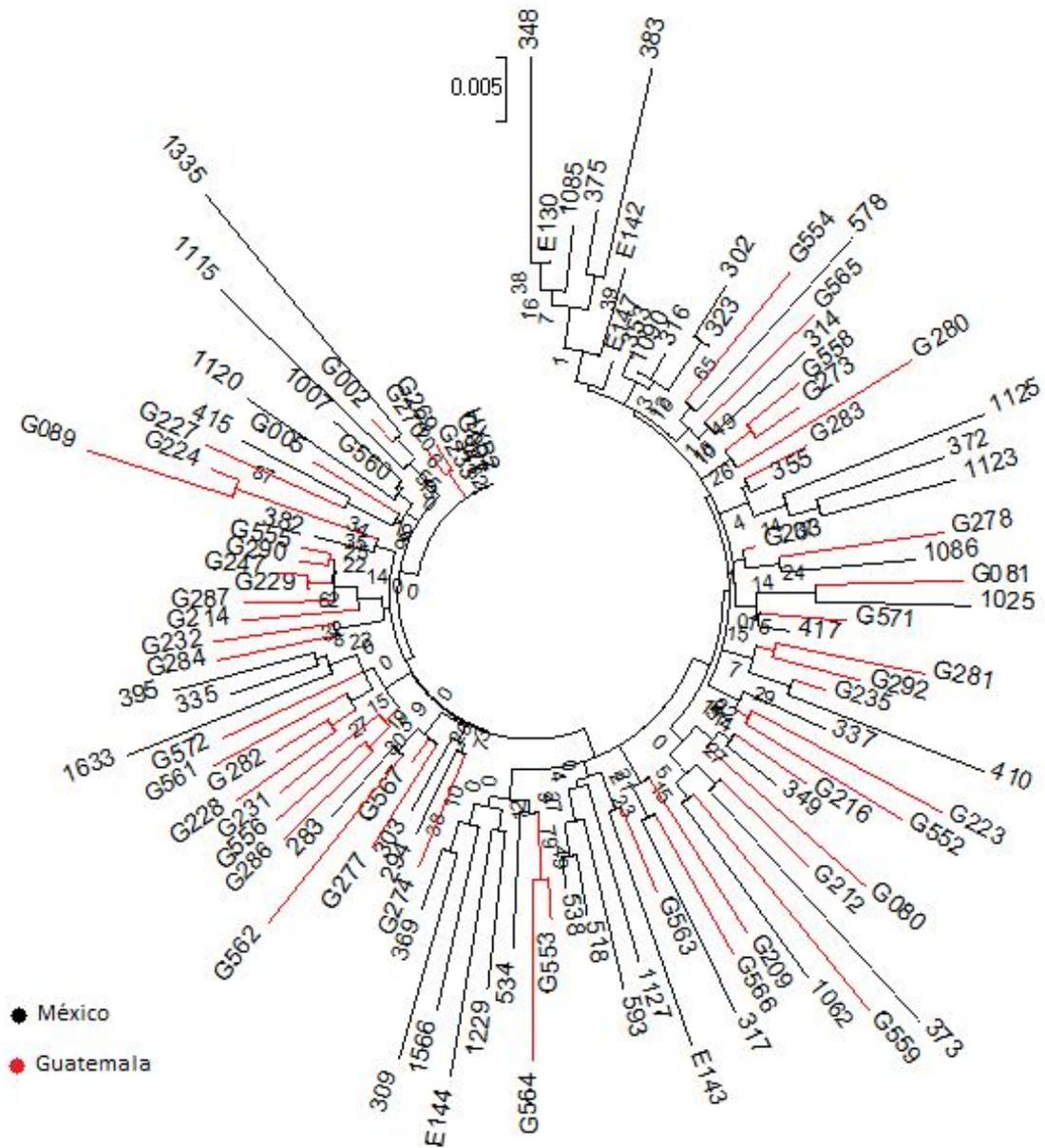


Figura 6.6 Árbol filogenético de máxima verosimilitud con todas las secuencias de gp41 de México (representado en negro) y Guatemala (representado en rojo). A pesar de la formación de pequeños agrupamientos regionales no se presentó una polarización del árbol la cual indicaría un efecto regional importante sobre la proteína, por lo tanto se asume que no hay una divergencia genética marcada entre ambos países. El árbol se realizó en MEGA 5.05 con 1000 repeticiones de Bootstrap y la corrección de Tamura-Nei.

## 7. Discusión

El presente trabajo constituye la primera descripción de resistencia transmitida a inhibidores de fusión en VIH circulante en México y Guatemala, así como de la diversidad genética de gp41 en virus circulantes en estas regiones. Existen pocos trabajos previos reportando prevalencias de resistencia transmitida a enfuvirtida en el mundo. Sin embargo, la descripción de la prevalencia de resistencia transmitida a inhibidores de fusión y la descripción de la variabilidad genética de gp41, blanco importante para posibles estrategias antirretrovirales, son importantes para el manejo de la epidemia de VIH actual, en especial para pacientes con resistencia a múltiples familias de fármacos antirretrovirales. Como era esperado, los niveles de resistencia transmitida a enfuvirtida en México y Guatemala fueron bajos (2.0% y 3.8% para México y Guatemala respectivamente) y comparables con los que se han reportado en otros estudios [56,57,58,63]. Este resultado indica que el uso de enfuvirtida como terapia de salvamento es una opción viable para la mayoría de los pacientes en México y Guatemala; sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de que se presente resistencia. La importancia de este análisis radica en que enfuvirtida es subministrado como parte de los regímenes de salvamento para pacientes cuyo virus es resistente a los regímenes antirretrovirales más comunes, por lo tanto evaluar el nivel de resistencia a enfuvirtida era de suma importancia para saber si éste es una buena opción para los pacientes de México y Guatemala. Este resultado era esperado debido al poco uso que se le da a enfuvirtida en ambos países. Es interesante que una sola mutación, G36D, explicó todos los casos observados de resistencia transmitida a enfuvirtida en los virus circulantes en México y Guatemala. Esto podría sugerir un evento fundador previo en los virus circulantes, asociado con otras presiones selectivas, que pudiera explicar la presencia de variantes con la mutación. Sin embargo, no pueden descartarse diseminaciones independientes de virus con previa exposición a enfuvirtida. Se debe tomar en cuenta que el tamaño de las cohortes en estudio es pequeño, por lo que los resultados obtenidos en el presente estudio deberán confirmarse posteriormente con cohortes más grandes. Sin embargo, los tamaños de muestra son comparables con los de otros estudios publicados [58,63] y son informativos al

constituir una primera descripción de lo que ocurre en México y Guatemala en cuanto a resistencia a inhibidores de fusión y a la situación evolutiva de la proteína gp41.

Interesantemente, se observaron polimorfismos adicionales en posiciones asociadas a resistencia en HR1, así como conocidas mutaciones compensatorias en HR2 en virus circulantes tanto en México como en Guatemala. Se registró que el polimorfismo N42S en la región HR1 y S138A en HR2 ocurrían con una alta incidencia. Al analizar si éstos presentaban alguna relación con la carga viral se encontró una notable diferencia con el resto de la cohorte. Esto sugiere que estos polimorfismos comunes en las poblaciones mexicana y guatemalteca confieren una ventaja en la capacidad replicativa del virus aún en ausencia de presión de fármacos antirretrovirales. La presencia de éstos podría haber sido causada por la naturaleza inmunogénica de la población debido a la selección por HLA (lo cual a su vez sugiere similitudes entre los genes HLA de las dos poblaciones). Aunque para ninguna de estas dos posiciones se encontró evidencia de presión selectiva positiva, no se descarta la posibilidad de que tanto respuestas celulares como humorales pudieran tener un papel en la selección de variantes en ellas. Esta posibilidad deberá comprobarse con estudios específicos de asociación HLA-polimorfismos de VIH en cohortes más grandes. La selección por anticuerpos es poco probable, dado que las regiones más inmunogénicas de gp41 no se encuentran en los dominios HR1 ni HR2 sino en el asa C-C y en los residuos adyacentes a MPER, sin embargo no debe ser descartada ya que cualquier región o conformación expuesta durante el proceso de fusión puede ser blanco de la respuesta inmune humoral. Más aun, existe una región altamente inmunogénica para anticuerpos que se sobrelapa con la posición 138 (Figura 6.5). Otra de las opciones por las cuales éstos polimorfismos son tan comunes es la ancestría común de éstos. En el caso de México aunque el polimorfismo aparece independientemente en dos pacientes, es notable que en seis de estos se forma un agrupamiento. El agrupamiento sugiere que los virus de estos pacientes comparten un ancestro común que podría haber poseído el polimorfismo y lo pasó a sus descendientes en lugar de haber aparecido *de novo* como en los pacientes 410 y 373, lo cual habla de transmisión de polimorfismos de un paciente a otro. En el caso de Guatemala no se observaron agrupamientos claros; sin embargo, resaltan las secuencias G228,

G282, G231 y G209, las cuales poseen dos polimorfismos distintos asociados a resistencia y se agrupan sugiriendo ancestría común. Esto podría indicar que la aparición de ambos polimorfismos en conjunto o cada uno por separado es algo corriente en la población guatemalteca (ya que esto se presenta en la secuencia G566).

Respecto al análisis de variabilidad de las secuencias se concluye que ambas poblaciones presentaron patrones similares, con la región HR1 siendo la más conservada de la secuencia y la región HR2 presentando alto polimorfismo. Si HR1 está conservada se esperaría que su región complementaria HR2 también lo fuera, mas la alta entropía en esta última sugiere que gp41 puede presentar variabilidad en esta región conservando su función. Suponiendo que virus con mutaciones en HR2 podrían presentar una cinética de fusión alterada se analizaron posibles diferencias en la carga viral de pacientes con VIH con y sin mutaciones en HR2 que pudieran alterar la capacidad replicativa viral. Sin embargo, dado el análisis de correlación polimorfismos/carga viral y polimorfismos/conteo de linfocitos T CD4+ en el cual no se demuestra rotundamente ninguna asociación entre estos factores todo parece indicar que el dominio HR2 puede permitirse una mayor variabilidad sin costos en la capacidad replicativa viral, mientras que HR1 requiere permanecer lo más conservado posible. Por otra parte, tras el análisis de diferencia de entropía para comparar la variabilidad de ambas poblaciones, se encontró que las secuencias de México eran más polimórficas que las de Guatemala, esto podría explicarse por diferentes fenómenos en la evolución del virus en las dos poblaciones o quizás a presiones selectivas inmunes distintas dadas las características inmunogenéticas únicas de las poblaciones. La variabilidad mayor del virus en México podría mostrar un mayor tiempo de evolución del VIH en presencia de deriva genética en dicho país con respecto a Guatemala. Alternativamente, diferentes frecuencias de alelos HLA en las dos poblaciones que seleccionaran mutaciones de escape en posiciones específicas de gp41, podrían explicar también diferencias en la frecuencia de polimorfismos específicos en la proteína.

Tras evaluar el fenómeno de presión de selección en cada aminoácido se puede inferir que debido a las pocas posiciones bajo presión positiva en HR1 tanto en México como en

Guatemala, éste dominio a pesar de encontrarse expuesto durante el proceso de fusión no es blanco de presión inmunológica. Este bajo número de posiciones seleccionadas positivamente también puede deberse a que en ésta región el virus no puede permitirse ser muy polimórfico lo cual va de acuerdo a los resultados obtenidos en los análisis anteriores de resistencia, polimorfismos y entropía. Estos datos en conjunto indican que HR1 es una región crucial para la entrada del virus a la célula. Resalta que en ambas poblaciones la posición 55, dentro de HR1, se encuentra seleccionada positivamente, esto podría ser reflejo de una alta presión inmunológica sobre algún epítipo que contenga ese aminoácido, es posible descartar la opción de que ésta posición sea polimórfica por transmisión de la mutante ya que el modelo lo encontró con alta frecuencia en ambas poblaciones y es por lo tanto poco probable que la mutación haya sido transmitida *de novo* a todos los individuos.

En cuanto a la región HR2 es notorio que se encuentra bajo una mayor presión de selección, sobre todo en Guatemala. La presencia de estos codones en mayor cantidad en Guatemala sugiere que en efecto la presión inmunológica ejercida sobre la proteína es distinta en ambos países, lo cual era esperado debido a las distintas características étnicas y por lo tanto inmunológicas de las poblaciones. Esta alta presión de selección parece no concordar con los datos obtenidos en el análisis de variabilidad, en el cual se encontró que México era más polimórfico que Guatemala; sin embargo, puede ser plausible debido a que el análisis de entropía mide la cantidad de aminoácidos distintos en una posición dada, sin necesariamente estar asociada esta variabilidad a la acción de presiones selectivas. Por otro lado, la presencia de más codones bajo presión de selección en la región HR2 concuerda con los análisis previos que muestran que HR2 es más polimórfico que HR1; esto parece indicar que HR2 puede ser más versátil que HR1 sin alterar la infectividad del virus mientras que HR1 es una pieza clave en el proceso de fusión y el virus debe mantener ésta región lo más conservada posible.

En cuanto a la posible presión inmunológica ejercida sobre la proteína se encontraron posiciones bajo presión selectiva, a su vez distintas en las dos poblaciones, cuya variabilidad podría explicarse por la presencia de epítopos de CTLs. Estas posiciones sugieren que la presión

inmunológica ha favorecido la fijación de polimorfismos en las secuencias consenso de las poblaciones de manera característica, apoyando la observación de evolución única del VIH en poblaciones distintas. Las secuencias consenso de México y Guatemala diferían entre ellas en 10 posiciones; sin embargo, al compararlas con una secuencia de referencia estadounidense se encontraron un total de 31 residuos distintos. Esto indica que las secuencias de México y Guatemala fueron más parecidas entre sí que con la secuencia estadounidense; sin embargo, la secuencia guatemalteca fue más similar a ésta que la mexicana. Se habría esperado que dada la cercanía geográfica entre México y Estados Unidos estas dos secuencias fueran más similares entre sí que la secuencia guatemalteca y estadounidense, a pesar de esto México difería de Estados Unidos en 28 residuos y Guatemala difería de la americana en 28. Esta diferencia puede ser circunstancial y se tienen que hacer estudios con cohortes más grandes para comprobar nuestras observaciones.

Al realizar el mapa de epítomos con las secuencias consenso e incluir en este las posiciones bajo presión selectiva y las diferencias entre los consensos se encontró una clara asociación de la presión inmunológica sobre estos residuos tanto por parte de la presión por HLA como por la presión por anticuerpos. Se registraron 10 posiciones bajo presión selectiva y 17 residuos distintos al consenso que no entraron en ningún epítomo HLA o región inmunogénica de reconocimiento de anticuerpos. Estas podrían estar asociadas a otras presiones selectivas; sin embargo, la presión inmunológica no debe ser descartada debido a que las bases de datos disponibles de epítomos para HLA y anticuerpos típicamente integran información obtenida con cohortes caucásicas que carecen de las características genéticas propias de las poblaciones con ancestría amerindia.

En la cuestión evolutiva se encontró que a pesar de la aparente homogeneidad en la distribución de las ramas (Figura 6.5) existen clusters específicos de diversificación para cada país, estos dos fenómenos sugieren la existencia de presiones de selección únicas (fenómenos regionales, presión inmunológica) pero también indican la presencia de un componente común en la diversificación viral.

## 8. Conclusión

Se estimó por primera vez la prevalencia de resistencia transmitida a inhibidores de fusión en una cohorte mexicana y guatemalteca, observándose una prevalencia de 2.0% en México y 3.8% en Guatemala. Los resultados coinciden con los ya reportados en otras cohortes e indican que enfuvirtida es una opción viable como terapia antirretroviral en estas poblaciones. Independientemente de las mutaciones de resistencia se encontraron polimorfismos comunes que presentan un impacto en la capacidad replicativa del virus con medianas de carga viral más altas que aquellas de la cohorte total. Se requieren estudios posteriores para determinar si la presencia de estos polimorfismos puede deberse a efectos fundadores poblacionales o a presión inmunológica.

Al analizar la presión ejercida inmunologicamente sobre el virus se encontraron características únicas para cada población lo suficientemente fuertes para fijarse en el virus circulante así como características en común que hablan de similitudes entre los contextos inmunogenéticos de las poblaciones analizadas. La mayoría de las posiciones bajo presión selectiva se encontraban en regiones de reconocimiento de HLA y/o anticuerpos lo cual indica una relación contundente entre el sistema inmune y la evolución regional del virus.

En un nivel poblacional hemos mostrado evidencia de que los virus circulantes en México y Guatemala se encuentran en un proceso de evolución regional en el que las fronteras geográficas, sociales y culturales parecen ser importantes. A pesar de la aparente homogeneidad genética de algunas secuencias mostrada por las ramas de las secuencias en el árbol filogenético, la formación de agrupamientos regionales indica la presencia de presiones de selección y/o eventos fundadores particulares de cada región que están definiendo la evolución del VIH a nivel poblacional.

## 9. Literatura citada

1. Cordoba-Villalobos JA, Ponce de Leon Rosales, S., Valdespino, J.L., editor (2008) 25 años de SIDA en México. Logros, desaciertos y retos. . 2 ed. México: Instituto Nacional de Salud Pública. 469 p.
2. UNAIDS (2012) Report on the global AIDS epidemic. UNAIDS.
3. UNAIDS (2009) Epidemiological Fact Sheet on HIV and AIDS.
4. Greene WC, Peterlin BM (2002) Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy. *Nat Med* 8: 673-680.
5. Freed EO (1998) HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. *Virology* 251: 1-15.
6. Checkley MA, Luttmann BG, Freed EO (2011) HIV-1 envelope glycoprotein biosynthesis, trafficking, and incorporation. *J Mol Biol* 410: 582-608.
7. Stowell D (2006) pol. *The Molecules of HIV - A Hypertextbook*.
8. Zhou X, Evans SL, Han X, Liu Y, Yu XF (2012) Characterization of the interaction of full-length HIV-1 Vif protein with its key regulator CBFbeta and CRL5 E3 ubiquitin ligase components. *PLoS One* 7: e33495.
9. Mangeat B, Gers-Huber G, Lehmann M, Zufferey M, Luban J, et al. (2009) HIV-1 Vpu neutralizes the antiviral factor Tetherin/BST-2 by binding it and directing its beta-TrCP2-dependent degradation. *PLoS Pathog* 5: e1000574.
10. Schaefer MR, Wonderlich ER, Roeth JF, Leonard JA, Collins KL (2008) HIV-1 Nef targets MHC-I and CD4 for degradation via a final common beta-COP-dependent pathway in T cells. *PLoS Pathog* 4: e1000131.
11. Brigati C, Giacca M, Noonan DM, Albin A (2003) HIV Tat, its TARGETS and the control of viral gene expression. *FEMS Microbiol Lett* 220: 57-65.
12. *The Role of HIV rev Protein*. USA.
13. Kogan M, Rappaport J (2011) HIV-1 accessory protein Vpr: relevance in the pathogenesis of HIV and potential for therapeutic intervention. *Retrovirology* 8: 25.
14. Root MJ, Steger HK (2004) HIV-1 gp41 as a target for viral entry inhibition. *Curr Pharm Des* 10: 1805-1825.
15. Greenberg M, Cammack N, Salgo M, Smiley L (2004) HIV fusion and its inhibition in antiretroviral therapy. *Rev Med Virol* 14: 321-337.
16. Yu X, Lu L, Cai L, Tong P, Tan S, et al. (2012) Mutations of Gln64 in the HIV-1 gp41 N-terminal heptad repeat render viruses resistant to peptide HIV fusion inhibitors targeting the gp41 pocket. *J Virol* 86: 589-593.
17. Eggink D, Bontjer I, Langedijk JP, Berkhout B, Sanders RW (2011) Resistance of human immunodeficiency virus type 1 to a third-generation fusion inhibitor requires multiple mutations in gp41 and is accompanied by a dramatic loss of gp41 function. *J Virol* 85: 10785-10797.
18. Alcamí J, Coiras M (2011) Inmunopatogenia de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica* 29: 216-226.

19. Arhel NJ, Souquere-Besse S, Munier S, Souque P, Guadagnini S, et al. (2007) HIV-1 DNA Flap formation promotes uncoating of the pre-integration complex at the nuclear pore. *EMBO J* 26: 3025-3037.
20. Miller CJ, Li Q, Abel K, Kim EY, Ma ZM, et al. (2005) Propagation and dissemination of infection after vaginal transmission of simian immunodeficiency virus. *J Virol* 79: 9217-9227.
21. Peterlin BM, Trono D (2003) Hide, shield and strike back: how HIV-infected cells avoid immune eradication. *Nat Rev Immunol* 3: 97-107.
22. Montal M (2003) Structure-function correlates of Vpu, a membrane protein of HIV-1. *FEBS Lett* 552: 47-53.
23. Garnier L, Parent LJ, Rovinski B, Cao SX, Wills JW (1999) Identification of retroviral late domains as determinants of particle size. *J Virol* 73: 2309-2320.
24. Katzmann DJ, Babst M, Emr SD (2001) Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell* 106: 145-155.
25. Haase AT (1999) Population biology of HIV-1 infection: viral and CD4+ T cell demographics and dynamics in lymphatic tissues. *Annu Rev Immunol* 17: 625-656.
26. Mehandru S, Poles MA, Tenner-Racz K, Horowitz A, Hurley A, et al. (2004) Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. *J Exp Med* 200: 761-770.
27. Koup RA, Safrit JT, Cao Y, Andrews CA, McLeod G, et al. (1994) Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol* 68: 4650-4655.
28. Douek DC, Roederer M, Koup RA (2009) Emerging concepts in the immunopathogenesis of AIDS. *Annu Rev Med* 60: 471-484.
29. Levy JA (2008) *El VIH y la patogénesis del SIDA*. México: FCE/INER.
30. Wei X, Decker JM, Wang S, Hui H, Kappes JC, et al. (2003) Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* 422: 307-312.
31. Watkins BA, Buge S, Aldrich K, Davis AE, Robinson J, et al. (1996) Resistance of human immunodeficiency virus type 1 to neutralization by natural antisera occurs through single amino acid substitutions that cause changes in antibody binding at multiple sites. *J Virol* 70: 8431-8437.
32. Shirai A, Cosentino M, Leitman-Klinman SF, Klinman DM (1992) Human immunodeficiency virus infection induces both polyclonal and virus-specific B cell activation. *J Clin Invest* 89: 561-566.
33. Nagase H, Agematsu K, Kitano K, Takamoto M, Okubo Y, et al. (2001) Mechanism of hypergammaglobulinemia by HIV infection: circulating memory B-cell reduction with plasmacytosis. *Clin Immunol* 100: 250-259.
34. Martinez-Maza O, Crabb E, Mitsuyasu RT, Fahey JL, Giorgi JV (1987) Infection with the human immunodeficiency virus (HIV) is associated with an in vivo increase in B lymphocyte activation and immaturity. *J Immunol* 138: 3720-3724.
35. Frey G, Chen J, Rits-Volloch S, Freeman MM, Zolla-Pazner S, et al. (2010) Distinct conformational states of HIV-1 gp41 are recognized by neutralizing and non-neutralizing antibodies. *Nat Struct Mol Biol* 17: 1486-1491.

36. Stiegler G, Kunert R, Purtscher M, Wolbank S, Voglauer R, et al. (2001) A potent cross-clade neutralizing human monoclonal antibody against a novel epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses* 17: 1757-1765.
37. Zwick MB, Labrijn AF, Wang M, Spenlehauer C, Saphire EO, et al. (2001) Broadly neutralizing antibodies targeted to the membrane-proximal external region of human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp41. *J Virol* 75: 10892-10905.
38. Frey G, Peng H, Rits-Volloch S, Morelli M, Cheng Y, et al. (2008) A fusion-intermediate state of HIV-1 gp41 targeted by broadly neutralizing antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 3739-3744.
39. Ray N, Blackburn LA, Doms RW (2009) HR-2 mutations in human immunodeficiency virus type 1 gp41 restore fusion kinetics delayed by HR-1 mutations that cause clinical resistance to enfuvirtide. *J Virol* 83: 2989-2995.
40. Janeway CAJ, Travers, P., Walport, M., et al. (2001) *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. . New York: Garland Science.
41. Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, et al. (1995) Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science* 270: 1811-1815.
42. Barker E, Mackewicz CE, Reyes-Teran G, Sato A, Stranford SA, et al. (1998) Virological and immunological features of long-term human immunodeficiency virus-infected individuals who have remained asymptomatic compared with those who have progressed to acquired immunodeficiency syndrome. *Blood* 92: 3105-3114.
43. Althaus CL, De Boer RJ (2008) Dynamics of immune escape during HIV/SIV infection. *PLoS Comput Biol* 4: e1000103.
44. Avila-Rios S, Ormsby CE, Carlson JM, Valenzuela-Ponce H, Blanco-Heredia J, et al. (2009) Unique features of HLA-mediated HIV evolution in a Mexican cohort: a comparative study. *Retrovirology* 6: 72.
45. Kilby JM, Eron JJ (2003) Novel therapies based on mechanisms of HIV-1 cell entry. *N Engl J Med* 348: 2228-2238.
46. Cervia JS, Smith MA (2003) Enfuvirtide (T-20): a novel human immunodeficiency virus type 1 fusion inhibitor. *Clin Infect Dis* 37: 1102-1106.
47. Qadir MI (2011) Qadirvirtide. *Pak J Pharm Sci* 24: 593-595.
48. Lu J, Deeks SG, Hoh R, Beatty G, Kuritzkes BA, et al. (2006) Rapid emergence of enfuvirtide resistance in HIV-1-infected patients: results of a clonal analysis. *J Acquir Immune Defic Syndr* 43: 60-64.
49. Rimsky LT, Shugars DC, Matthews TJ (1998) Determinants of human immunodeficiency virus type 1 resistance to gp41-derived inhibitory peptides. *J Virol* 72: 986-993.
50. Fikkert V, Cherepanov P, Van Laethem K, Hantson A, Van Remoortel B, et al. (2002) env chimeric virus technology for evaluating human immunodeficiency virus susceptibility to entry inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 3954-3962.
51. Reeves JD, Lee FH, Miamidian JL, Jabara CB, Juntilla MM, et al. (2005) Enfuvirtide resistance mutations: impact on human immunodeficiency virus envelope function, entry inhibitor sensitivity, and virus neutralization. *J Virol* 79: 4991-4999.

52. Bartmeyer B, Kuecherer C, Houareau C, Werning J, Keeren K, et al. (2010) Prevalence of transmitted drug resistance and impact of transmitted resistance on treatment success in the German HIV-1 Seroconverter Cohort. *PLoS One* 5: e12718.
53. Fauci AS (1995) HIV. An elusive soluble suppressor. *Nature* 378: 561.
54. Avila-Rios S, Garcia-Morales C, Garrido-Rodriguez D, Ormsby CE, Hernandez-Juan R, et al. (2011) National prevalence and trends of HIV transmitted drug resistance in Mexico. *PLoS One* 6: e27812.
55. Avila-Rios S, Mejia-Villatoro CR, Garcia-Morales C, Soto-Nava M, Escobar I, et al. (2011) Prevalence and patterns of HIV transmitted drug resistance in Guatemala. *Rev Panam Salud Publica* 30: 641-648.
56. Alencar CS, Nishiya AS, Ferreira S, Giret MT, Diaz RS, et al. (2010) Evaluation of primary resistance to HIV entry inhibitors among brazilian patients failing reverse transcriptase/protease inhibitors treatment reveal high prevalence of maraviroc resistance-related mutations. *AIDS Res Hum Retroviruses* 26: 1267-1271.
57. Teixeira C, de Sa-Filho D, Alkmim W, Janini LM, Diaz RS, et al. (2010) Short communication: high polymorphism rates in the HR1 and HR2 gp41 and presence of primary resistance-related mutations in HIV type 1 circulating in Brazil: possible impact on enfuvirtide efficacy. *AIDS Res Hum Retroviruses* 26: 307-311.
58. Peuchant O, Capdepon S, Ragnaud JM, Aurillac-Lavignolle V, Thiebaut R, et al. (2007) Primary resistance to enfuvirtide (T20) in recently HIV-1 infected, antiretroviral-naive patients from the ANRS Aquitaine Cohort. *Antivir Ther* 12: 559-562.
59. (2010) QIAmp viral RNA mini handbook. In: Qiagen, editor.
60. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, et al. (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28: 2731-2739.
61. <http://www.hiv.lanl.gov> Entropy.
62. Kosakovsky Pond SL, Frost SD (2005) Not so different after all: a comparison of methods for detecting amino acid sites under selection. *Mol Biol Evol* 22: 1208-1222.
63. Kousiappa I, van de Vijver DA, Demetriades I, Kostrikis LG (2009) Genetic analysis of HIV type 1 strains from newly infected untreated patients in cyprus: high genetic diversity and low prevalence of drug resistance. *AIDS Res Hum Retroviruses* 25: 23-35.