



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**IMPACTO DE LA PRESIÓN SELECTIVA EJERCIDA POR HLA-I SOBRE LA
CAPACIDAD REPLICATIVA DEL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA EN
PACIENTES BAJO TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ESCAMILLA GÓMEZ TANIA JIMENA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. SANTIAGO ÁVILA RÍOS
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS, INER
COMITÉ TUTOR: DRA. MARTHA ESTHELA PÉREZ RODRÍGUEZ
IMSS, CENTRO NACIONAL SIGLO XXI
DR. KAREN MANUCHAYRAN AIRAPETIAN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

MÉXICO, D.F. ENERO, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**IMPACTO DE LA PRESIÓN SELECTIVA EJERCIDA POR HLA-I SOBRE LA
CAPACIDAD REPLICATIVA DEL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA EN
PACIENTES BAJO TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ESCAMILLA GÓMEZ TANIA JIMENA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. SANTIAGO ÁVILA RÍOS
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS, INER
COMITÉ TUTOR: DRA. MARTHA ESTHELA PÉREZ RODRÍGUEZ
IMSS, CENTRO NACIONAL SIGLO XXI
DR. KAREN MANUCHAYRAN AIRAPETIAN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

MÉXICO, D.F. ENERO, 2016

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 28 de septiembre de 2015, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **ESCAMILLA GÓMEZ TANIA JIMENA** con número de cuenta 305160607, con la tesis titulada "IMPACTO DE LA PRESIÓN SELECTIVA EJERCIDA POR HLA-I SOBRE LA CAPACIDAD REPLICATIVA DEL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA EN PACIENTES BAJO TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL", realizada bajo la dirección del DR. SANTIAGO ÁVILA RÍOS:

Presidente: DR. LUIS GUILLERMO LLORENTE PETERS
Vocal: DR. ARTURO CARLOS II BECERRA BRACHO
Secretario: DRA. MARTHA ESTHELA PÉREZ RODRÍGUEZ
Suplente: DR. SANTIAGO PÉREZ PATRIGEON
Suplente: DR. KAREN MANUCHARYAN AIRAPETIAN

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 06 de noviembre de 2015

M del Coro Ariz

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS.

- a) Primeramente agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

- b) A la beca otorgada por CONACYT, “ Convocatoria de becas nacionales 2013 segundo periodo, 290817” para la realización de mi proyecto de maestría con duración de 24 meses.

- c) A la beca mixta otorgada por CONACYT en el marco de BECAS MIXTAS 2014 - MZO2015 movilidad en el extranjero, para la realización de mi estancia en Vancouver, Canadá durante el periodo septiembre-noviembre 2014.

- d) Al apoyo PAEP, convocatoria 2014, recibido para la realización de mi estancia en Vancouver, Canadá durante el periodo septiembre-noviembre 2014.

- e) Al apoyo PAEP, convocatoria 2015, recibido para la asistencia al congreso 8th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention (IAS 2015) en Vancouver, British Columbia, Canadá del 19-22 julio 2015.

- f) A los miembros de mi Comité Tutor: Dr. Santiago Ávila Ríos, Dra. Martha Esthela Pérez Rodríguez y Dr. Karen Manuchayran Airapetian. Sus críticas y guía fueron indispensables para el desarrollo de mi trabajo.

Dont worry about a Thing..... 'Cause every little thing is gonna Be Allright.....

A mis padres por sostener un escrito más en sus manos y sonreír con mis logros. Por confiar y brindarme apoyo incondicional en mis decisiones. Por acompañarme en mis días y noches de trabajo y seguir haciendo mi camino en la vida un paisaje extraordinario. Gracias a mi apoyo incondicional que con pocas palabras me motiva, te quiero mucho manito!! Siempre estaré a tu lado cuando más lo necesites y celebrar nuestros triunfos.

Mi familia C IENI que me hizo crecer en cada aspecto de mi vida, gracias por compartir sonrisas, viajes, Oaxacas, tragos, música, baile, frustraciones y discusiones. Gracias por permitirme seguir compartiendo lo que soy, y dejar un pedacito de mí en cada uno de ustedes. Increíbles recuerdos a su lado en estos 4 años. Selma, Clau, Dani, Dani cobí :D, Juan, Beto, Marissa, Maggie, Vero, César, Ángel, Amaranta, Lohana, Perla, Keo, Thaly, Sandra, Daniela Paola, Celía. Ollí!! Gracias por tus consejos parienta mía!. Gracias Mari por todas tus enseñanzas, humor, burlas y risas....me llevo un recuerdo hermoso de nuestra amistad. No cabe duda que tu compañía hizo de este proyecto una tarea fácil a pesar de las largas horas de trabajo. Gracias por escucharme y apoyarme en mis frustraciones. Compartimos mucho, demasiado dirían otros!! Gracias por Vancouver!!

Mi más sincero agradecimiento a mi tutor Santiago Ávila, por tener la paciencia de discutir mi trabajo desde sus inicios, enriquecerlo con sus comentarios siempre en la forma más entendible y ordenada posible. Gracias por alentarme a seguir adelante y valorar mi dedicación en este proyecto. Gracias Dr. Gustavo Reyes Terán por apoyar mi proyecto y hacerme ver que siempre se puede dar más, gracias por la confianza en mi sentido de lealtad y responsabilidad.

Me llevo conmigo un pedacito de pintura epóxica por tantar remodelación y empleamiento y unos cuantos péptidos virales por el trabajo arduo y constante en el BSL-3....Gracias por su compañía y estima!.

Gracias a mis auténticos amigos que caminan a mi lado y se alegran por mis triunfos, Carlos, Vero, Angie, Jessy, Jorge, Vivi, Memo, Pao, Roy, Eri!!! Te quiero en lo más profundo nos falta una vida entera y más por compartir.

A veces la vida te enfrenta a una montaña rusa de emociones y sin ti no podría subirme una y otra vez para disfrutar lo hermoso de esta vida. Gracias por enfrentarme a mis retos y poner siempre un escaloncito para salir adelante con tus palabras. Me has acompañado en esta metamorfosis y no puedo esperar a ver que sigue en el camino de nuestra vida. Admiro tu entrega y pasión y me llena de orgullo vivir tus logros, ha sido maravilloso ser parte de ellos. Gracias por crecer a mi lado.

Do you believe in magic? Of course I do!

ÍNDICE

Índice de figuras.....	i
Resumen.....	1
Abstract.....	3
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1 DESCUBRIMIENTO DEL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA	5
1.2 EPIDEMIOLOGÍA DEL VIH EN EL MUNDO	6
1.2.1 LA EPIDEMIA DE VIH EN MEXICO.....	7
1.3 GENERALIDADES DEL VIH.....	8
1.3.1 Origen del VIH	8
1.3.2 Clasificación del VIH.....	8
1.4 ESTRUCTURA DEL VIH.....	10
1.5 GENOMA DEL VIH	11
1.6 CICLO DE REPLICACIÓN.....	17
1.7 HISTORIA NATURAL DE LA INFECCIÓN POR VIH.....	20
1.8 RESPUESTA INMUNOLÓGICA CONTRA EL VIH	22
1.8.1 RESPUESTA CITOTÓXICA MEDIADA POR LINFOCITOS TCD8+	23
1.8.2 EVOLUCIÓN VIRAL MEDIADA POR EL SISTEMA INMUNOLÓGICO. PRESIÓN SELECTIVA POR HLA-I	25
1.9 TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL.....	29
1.9.1 Tratamiento antirretroviral en Mexico.....	31
1.9.2 Resistencia al tratamiento antirretroviral y presión selectiva del TAR sobre la evolución viral	32
1.9.3 Resistencia a Inhibidores de Proteasa y co-evolución con el gen <i>gag</i>	33
1.10 PRESIÓN SELECTIVA MÚLTIPLE: MUTACIONES DE ESCAPE INMUNE Y MUTACIONES DE RESISTENCIA A FÁRMACOS ANTIRRETROVIRALES	37
CAPÍTULO II. ANTECEDENTES.	38

CAPITULO III. HIPÓTESIS	41
CAPÍTULO IV. OBJETIVOS	42
CAPÍTULO V. METODOLOGÍA.	44
5.1 Selección de pacientes	44
5.2 Extracción de RNA.....	44
5.3 Amplificación de la proteasa viral.....	45
5.4 Amplificación del gen <i>gag-pro</i>	46
5.5 Verificación de amplicones <i>proteasa</i> y <i>gag</i> por electroforesis en gel de agarosa al 1%.....	47
5.6 Purificación de productos de amplificación	48
5.7 Cuantificación de productos de amplificación	48
5.8 Secuenciación de <i>proteasa</i> y <i>gag</i>	49
5.8.1 Secuenciación de la <i>proteasa viral</i>	49
5.8.2 Secuenciación de <i>gag-pro</i>	49
5.9 Análisis de las secuencias <i>proteasa</i> y <i>gag</i>	51
5.9.1 Comprobación de mutaciones de resistencia a Inhibidores de Proteasa en la proteasa viral	51
5.9.2 Alineamiento de secuencias <i>proteasa</i> y <i>gag</i>	51
5.9.3 Análisis filogenéticos.....	52
5.9.4 Análisis evolutivo de las secuencias <i>gag</i>	52
5.10 Ensayo de capacidad replicativa viral	53
5.10.1 Construcción de virus quiméricos	53
5.10.1.1 Preparación de plásmidos pNL4-3 y pNL4-3Δ <i>gag-pro</i>	53
5.10.1.2 Amplificación de la región <i>gag-proteasa</i>	55
5.10.1.3 Linearización del plásmido pNL4-3Δ <i>gag-pro</i>	56
5.10.1.4 Co-transfección del plásmido y amplicones <i>gag-pro</i> por electroporación en línea celular GXR	57

5.10.1.5 Preparación de células GXR.....	57
5.10.1.6 Co-transfección de GXR por electroporación	57
5.10.1.7 Propagación de virus quiméricos	59
5.10.1.8 Monitoreo por citometría de flujo.....	59
5.10.2 Titulación	62
5.10.3 Ensayo de Capacidad Replicativa Viral	62
5.11 Tipificación de HLA clase I.....	64
5.12 Análisis estadísticos.....	66
CAPÍTULO VI. RESULTADOS.....	67
6.1 Descripción de la cohorte.....	67
6.2 Análisis filogenéticos.....	67
6.3 Ensayos de capacidad replicativa: Comparación con una cohorte de individuos vírgenes a tratamiento antirretroviral.....	71
6.4 Ensayos de Capacidad Replicativa: Impacto de mutaciones secundarias en la proteasa viral y que han sido previamente asociadas a un efecto compensatorio	73
6.5 Ensayos de capacidad replicativa: Impacto de las mutaciones mayores de resistencia en la proteasa viral.....	74
6.6 Ensayos de capacidad replicativa: Impacto de mutaciones previamente reportadas en el gen <i>gag</i> asociadas al uso de IPs	77
6.7 Búsqueda de sitios bajo presión selectiva en el gen <i>gag</i> : Análisis por modelos de razón de sustituciones sinónimas y no sinónimas.....	81
6.8 Impacto de posiciones bajo presión selectiva positiva específicas en <i>gag</i> sobre la capacidad replicativa	85
6.9 Variabilidad de los motivos de corte en <i>gag</i> : Relación con las mutaciones en <i>gag-proteasa</i> asociadas a exposición a IPs e impacto en la capacidad replicativa.	91
6.10 Descripción de los virus por cuartiles de capacidad replicativa	95

6.11 Presión Selectiva mediada por HLA-I	96
6.11.1 Interacción entre múltiples presiones selectivas: Doble ventaja viral.....	98
6.11.2 Interacción entre múltiples presiones selectivas: Impacto negativo en la Capacidad Replicativa.	102
CAPÍTULO VII. DISCUSIÓN.	104
CAPÍTULO VIII. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	118
CAPÍTULO IX. LITERATURA CITADA.....	121
ANEXO I.....	127

Índice de figuras

Figura 1.1. Grupos, subtipos y distribución geográfica del VIH.....	9
Figura 1.2. Prevalencia mundial de los subtipos de VIH.....	10
Figura 1.3. Esquema representativo de la partícula viral del VIH.....	11
Figura 1.4 Organización del genoma del VIH.....	12
Figura 1.5. Microscopía electrónica de un virus maduro y un virus inmaduro.....	15
Figura 1.6. .Representación esquemática del ciclo de replicación del VIH.....	20
Figura 1.7 Historia natural de la enfermedad por VIH y sin intervención de tratamiento antirretroviral.....	22
Figura 1.8. Reconocimiento de péptidos de VIH por Linfocitos CD8+ citotóxicos, CTLs.....	24
Figura 1.9. Función de un linfocito T CD8+ efector, CTL por el reconocimiento de péptidos de VIH-1	25
Figura 1.10. Ejemplo de las frecuencias para los alelos HLA-B carcterísticos de la población Mexicana	26
Figura 1.11. Distribución geográfica de alelos HLA-B	27
Figura 1.12. Reversión contra persistencia de mutaciones de escape inmunológico a nivel poblacional	28
Figura 1.13. Acceso a TAR a nivel mundial.....	31
Figura 1.14. Selección de mutaciones de resistencia en el VIH a causa de concentraciones subóptimas de fármacos antirretrovirales	33
Figura 1.15. Tabla de mutaciones mayores de resistencia a IPs.....	35
Figura 1.16. Cuadro que muestra la variación natural de los cinco motivos de corte a lo largo del precursor Pr55 ^{gag} en <i>gag</i>	36

Figura 5.1. Foto de gel de agarosa al 1% para la confirmación de amplicones <i>gag-pro</i> (izquierda) y <i>pol</i> (derecha)	48
Figura 5.2. Izquierda. Esquema que muestra el tamaño de los plásmidos pNL4-3 y pNL4-3Δ Gag-pro así como los sitios de restricción para HindII y BstEII	55
Figura 5.3. Estrategia de análisis de citometría de flujo para el porcentaje de GFP en células GXR infectadas con virus recombinantes	61
Figura 6.1 Árbol filogenético consenso para las 103 secuencias de la proteasa viral (superior) y el gen <i>gag</i> (inferior) de los virus presentes en cada individuo incluido en el estudio	68
Figura 6.2 Árbol filogenético para un subconjunto de secuencias de la proteasa viral (superior) y el gen <i>gag</i> (inferior) de los virus quiméricos propagados	70
Figura 6.3 Comparación de la capacidad replicativa entre la cohorte con mutaciones de resistencia a IPs con una cohorte vírgen a tratamiento	72
Figura 6.4. Efecto de mutaciones compensatorias en la CR de la cohorte expuesta a IPs.	73
Figura 6.5. Frecuencia de mutaciones mayores de resistencia a IPs características de la cohorte.	74
Figura 6.6. Efecto de la mutación G48V sobre la capacidad replicativa viral	75
Figura 6.7. Efecto de la mutación más frecuente L90M, sobre la capacidad replicativa viral	75
Figura 6.8. Correlación entre el número de mutaciones mayores de resistencia a IPs en proteasa y la capacidad replicativa viral	76
Figura 6.9. Comparación entre el número de mutaciones mayores de resistencia a IPs en proteasa y la capacidad replicativa	76

Figura 6.10. Frecuencia de mutaciones previamente reportadas en el gen <i>gag</i> asociadas al uso de IPs	77
Figura 6.11. Efecto de la mutación A43V1 sobre la capacidad replicativa viral	78
Figura 6.12. Efecto de la mutación R76K sobre la capacidad replicativa viral	78
Figura 6.13. Efecto de la mutación R76K y A431V sobre la capacidad replicativa viral	79
Figura 6.14. Correlación entre el número de mutaciones previamente reportadas en el gen <i>gag</i> asociadas al uso de IPs y la capacidad replicativa viral	80
Figura 6.15. Comparación entre el número de mutaciones previamente reportadas en el gen <i>gag</i> asociadas al uso de IPs y la capacidad replicativa viral	80
Figura 6.16. Gráfica de la diferencia dN-dS para el alineamiento del gen <i>gag</i> de la cohorte de estudio	81
Figura 6.17. Diagrama de Venn que compara las posiciones bajo presión selectiva positiva entre la cohorte con resistencia a IPs y una cohorte virgen a tratamiento.	83
Figura 6.18. Efecto del número de variaciones bajo presión selectiva positiva por individuo, sobre la capacidad replicativa	84
Figura 6.19. Variaciones bajo presión selectiva positiva por posición vs Capacidad Replicativa	86
Figura 6.20. Efecto de la mutación S373A/T sobre la capacidad replicativa viral	87
Figura 6.21. Efecto de la combinación L90-S373 sobre la Capacidad Replicativa viral.	88

Figura 6.22. Comparación de la Capacidad Replicativa de los individuos con el par de mutaciones L90M-S373A/T y la Capacidad Replicativa de individuos vírgenes a tratamiento	89
Figura 6.23. Efecto compensatorio del par de mutaciones L90M-S373A/T sobre la capacidad replicativa corregido por A431V	90
Figura 6.24. Efecto compensatorio de la mutación S373A/T sobre la capacidad replicativa en diferentes grupos de mutaciones en la región <i>gag-proteasa</i>	91
Figura 6.25. Comparación de la variabilidad de los motivos de corte a lo largo de Gag en secuencias de pacientes con resistencia a IPs y pacientes vírgenes a tratamiento antirretroviral	93
Figura 6.26. Correlación entre el porcentaje de variación de los motivos de corte y la capacidad replicativa	94
Figura 6.27. Correlación entre el porcentaje de variación de los motivos de corte con el número de mutaciones de resistencia en proteasa, número de mutaciones en <i>gag</i> asociadas a IPs y ambas	95
Figura 6.28. Efecto de alelos HLA-A, HLA-B y HLA-C sobre la capacidad replicativa Viral	97
Figura 6.29. Interacción entre múltiples presiones selectivas	98
Figura 6.30. Alelos característicos de la cohorte que reconocen epítopes dentro del contexto L90M y S373A/T con evidencia de interacción entre múltiples presiones selectivas	100
Figura 6.31. Efecto de la presencia de alelos HLA-B*35:01, B*35:03, A*03:01, A*31:01 en individuos con S373A/T sobre la capacidad replicativa	101
Figura 6.32. Alelos HLA característicos de la cohorte que reconocen epítopes dentro del contexto A431V con evidencia de interacción entre múltiples presiones selectivas	103

Resumen.

Antecedentes. La respuesta citotóxica mediada por linfocitos T CD8+, CTLs, es un mecanismo eficaz en el control del VIH. Las moléculas HLA-I presentan pequeños péptidos virales a los CTLs que resulta en la lisis de la célula infectada. El control mediado por HLA-I se ha constituido como una fuerte presión selectiva que dirige la evolución viral con la selección de mutaciones de escape inmunológico que pueden tener impacto en la capacidad replicativa viral, CRV. Más aún, se ha reportado que la distribución y frecuencia de los alelos HLA-I es característico de cada región. Por otro lado, el tratamiento antirretroviral, TAR, se ha constituido como una presión selectiva adicional y selecciona mutaciones de resistencia. Las mutaciones de resistencia reportadas por el uso de Inhibidores de Proteasa, Ips no sólo se han identificado en la proteasa, sino en el sustrato de la enzima, el gen *gag*. Estas mutaciones también pueden tener impacto en la CRV. El presente trabajo estudió la región *gag-pro* del VIH, en una cohorte mexicana expuesta a Ips, para la búsqueda y entendimiento de la interacción entre múltiples presiones selectivas. Esta interacción podría favorecer doblemente al virus confiriendo tanto escape del sistema inmunológico, como resistencia al TAR. O bien, que la presión mediada por HLA-I pueda tener una influencia directa en la susceptibilidad al TAR, limitando su variabilidad. Todo ello, pudiéndose reflejar en la capacidad replicativa.

Metodología. Se amplificó y secuenció el gen *gag* y la proteasa viral de virus circulantes de 103 individuos mexicanos infectados por VIH-1 y con falla virológica por la presencia de mutaciones de resistencia a los Ips. Se identificaron por secuenciación las mutaciones asociadas al uso de Ips en *gag* y proteasa. Para el gen *gag*, se buscaron posiciones bajo presión selectiva positiva por un modelo de razón de sustituciones sinónimas/no sinónimas y se obtuvo la variación de los motivos corte. Se construyeron y propagaron quimeras de la región *gag-pro* de cada muestra en un vector viral pNL4-3Δ *gag-pro* por infección de células GXR. El seguimiento de la infección se realizó por citometría de Flujo por expresión de la proteína verde fluorescente en células GXR infectadas. Se realizaron ensayos de Capacidad Replicativa por infección de GXR. Se obtuvo la tipificación de los alelos HLA-I para 56 de los individuos. Se realizaron asociaciones de las mutaciones asociadas al uso de Ips en la región *gag-proteasa* con la capacidad replicativa, así como asociaciones HLA-I con capacidad replicativa para la búsqueda de interacción entre múltiples presiones selectivas.

Resultados. La Capacidad Replicativa, CR de individuos con resistencia a IPs fue significativamente menor comparada con una cohorte virgen a tratamiento ($p=0.0002$). La mutación en proteasa L90M, mutación de resistencia más frecuente en la cohorte, mostró un comportamiento compensatorio en la CR. No se encontró correlación entre el número de mutaciones mayores de resistencia en la proteasa y la CR, y no hubo diferencia al comparar el número de mutaciones mayores de resistencia por individuo, y la CR. Para el gen *gag* se identificaron 10 mutaciones previamente asociadas al uso de IPs, la mutación A431V mostró efecto significativo en la disminución de la CR ($p=0.0055$). Se encontraron además, 15 posiciones bajo presión selectiva positiva de acuerdo al análisis de razón de sustituciones sinónimas/no sinónimas, sólo las posiciones A431 y P473 fueron características de la cohorte. Las 13 posiciones restantes y compartidas pueden reflejar la presión selectiva inmune, donde se identificó selección diferencial entre la cohorte de estudio e individuos vírgenes a tratamiento en la posición S373 ($p<0.002$). S373Q y S373A/T respectivamente, fueron asociadas con un efecto significativo en el aumento de la CR. Se encontró asociación entre S373A/T + L90M, con el aumento significativo de la CR ($p=0.0309$), que hizo comparable la media de CR de la cohorte de estudio, con aquella obtenida en individuos vírgenes a tratamiento. Se encontró que los alelos A*03:01, A*31:01, B*35:01 y B*35:03 presentan reconocimiento potencial a S373A/T. La presencia de S373A/T + L90M con la presencia de alguno de los alelos HLA selectores, resultó en una doble ventaja para el virus, con valores de CR en el rango máximo de la cohorte. Los alelos A*02:06, B*35:01, C*07:02 mostraron reconocimiento para la posición A431 que podrían explicar el efecto en la disminución de la CR. Se encontró una correlación significativa entre el porcentaje de variación de los motivos de corte en *gag* y las mutaciones de resistencia la región *gag-pro* ($p<0.0001$).

Conclusiones. El estudio de las mutaciones de resistencia en *gag-pro* asociadas al uso de IPs mostró que la diferencia en valores de CR dentro de la cohorte, se debe principalmente a cambios en *gag* más que en la selección de mutaciones en proteasa. Nuestro trabajo demuestra que existe una co-evolución entre una proteasa resistente y su sustrato *gag*. Evidencia además, que esta co-evolución impacta en la capacidad replicativa viral y más aún, muestra evidencia de la interacción entre múltiples presiones selectivas que puede conferir doble ventaja al virus, o bien, limitar su variabilidad con alelos HLA-I que muestran una frecuencia representativa en el contexto inmunogenético mexicano. Nuestro trabajo ofrece la búsqueda de esquemas de tratamiento más individualizado considerando los alelos HLA-I de cada individuo.

Abstract

Background. The cytotoxic response against HIV infected cells plays a major role in the control of the viremia. The HLA molecules present HIV epitopes to the specific cytotoxic lymphocyte, CTL and kill the infected cell. In this way, the HLA-dependent responses, impose strong selective pressure on HIV, and select for immune escape mutations. These mutations could have an impact on the viral replicative capacity, VRC. Moreover, The distribution and frequency of the HLA-I alleles is dependent of the region and according to the immunogenetic context. On the other hand, antiretroviral treatment, ART, is also a selective pressure that controls the viremia and selects for drug resistance mutations. Protease Inhibitors (PIs) select for drug resistance mutations not only in *pol* but also in *gag*, substrate of the viral protease. These mutations could also have an impact VRC. We looked for possible interactions between drug resistance mutations, HLA-associated mutations and HIV viral replicative capacity in the *gag-pro* region of the HIV in a Mexican cohort under the exposure of PIs. These interactions may result in a double advantage for the virus where a mutation can escape from the immune system and also allows drug resistance. Or, in the other hand, the interaction may result in cornering or decreased HIV variability, when the HLA-I selective pressure impact the ART susceptibility.

Methods. *gag* and protease sequences from 103 PI-experienced subjects with virologic failure were obtained. Identification of PI resistance mutations in both genes was performed. Positions under positive selective pressure were determined by synonymous/non-synonymous substitution rates and compared with an naïve ART cohort. Percentage of cleavage sites, CS, variation was determined. Recombinant viruses expressing the *gag-pro* genetic region from each patient in an NL4-3 backbone were constructed for 98 patients and VRC assays were performed. Phylogenetic trees for quality control were produced for both genes before and after recombinant virus construction. HLA typing from 56 of the individuals was obtained and associations with PIs resistance mutations and VRC were analyzed.

Results. Viruses with PIs resistance mutations had a decreased VRC when compared with an ART-naïve cohort ($p=0.0002$). L90M was the most frequent protease major mutation in the cohort, and had a tendency of compensating the VRC. There was no effect in VRC when comparing the presence-absence, or the total protease resistance mutations. However, a significant difference in VRC was observed when comparing *gag* PI-associated mutations ($p=0.0088$ 0 vs 1, $p=0.0549$ 0 vs 2 and 3 *gag* mutations). Also, the previously reported *gag* PI mutation A431V,

had a negative effect in VRC ($p=0.0055$). We identified 15 positions under positive selective pressure in *gag*. Only A431 and P473 were unique to PI-experienced viruses when compared with an ART-naïve cohort. The other 13 shared positions may suggest immune selective pressure. Among these, we found a differential amino acid selection between ART-naïve and PIs experienced viruses in position S373 ($p<0.002$). S373Q and S373A/T respectively, were associated with a positive effect in VRC with S373A/T associated with the protease resistance mutation L90M ($p=0.0309$). This association made comparable the VRC median between the study cohort and the ART-naïve cohort. Moreover, we found that the HLA A*03:01, A*31:01, B*35:01 y B*35:03 common alleles in the cohort, potentially recognizes the epitope within S373 and these association was associated with higher VRC. On the other hand, the HLA A*02:06, B*35:01, C*07:02 alleles can potentially recognize A431 and may influence in the negative effects in VRC observed in our study for this compensatory reported mutation. Finally, there was a positive correlation between *gag-pol* ($p<0.0001$) PIs associated mutations and the percentage of variation in all *gag* cleavage sites. Phylogenetic-sequence quality controls showed the maintenance of resistance mutations in *gag-pro* before and during VRC assays.

Conclusions. The study of PI drug resistance mutations in the *gag-pro* region showed that *gag* mutations instead of protease mutations had an impact in VRC. Our results evidence the co-evolution of a resistant protease and the substrate *gag*. Moreover, our results show interactions between multiple selective pressures reflected in the VRC of PI experienced viruses and related with common HLA-I alleles in our immunogenetic context. These putative interactions could have a direct impact on HIV control strategies and in selection of ART schemes considering also the cleavage site variation. Also, our results contribute to individualized HIV control strategies according to the immunogenetic background of the patient.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1.1 DESCUBRIMIENTO DEL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA

El Virus de la Inmunodeficiencia Humana, VIH, es el agente causal del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida, SIDA en humanos [1-5]. La enfermedad es tá caracterizada por una pérdida progresiva en la capacidad de respuesta del sistema inmunológico a antígenos y patógenos oportunistas que sin intervención terapéutica, ocasiona la muerte de los individuos afectados [1, 6, 7]. La infección por VIH, es una pandemia que ha costado la vida de más de 39 millones de personas y ha significado un retro para el desarrollo de vacunas y tratamiento curativo [8, 9]. Hoy en día, el acceso al tratamiento antirretroviral, TAR, ha mejorado la calidad de vida de las personas, elevando significativamente su esperanza de vida. Sin embargo, el acceso aún no es universal, con cerca de 20 millones de personas sin acceso a tratamiento, especialmente en regiones y países en vías de desarrollo con pobres políticas de salud [8].

El virus se logró identificar a partir de la descripción de una nueva enfermedad en la década de los 80's en un sector de población que no debiera presentar síntomas de inmunodeficiencias: adultos jóvenes, principalmente de sexo masculino, con afecciones como diarrea crónica, neumonías, linfadenopatías, y una variedad de cánceres poco usuales como sarcoma de Kaposi o linfomas No-Hodgkin [10, 11]. Los síntomas poco a poco se fueron asociando a sectores específicos como drogadictos, homosexuales y trabajadores sexuales, personas con transfusiones sanguíneas y donde finalmente, la alta incidencia de transmisión materno-fetal se convirtió rápidamente en un factor importante para la identificación del patógeno. [8]. Dentro de las primeras especulaciones sobre la transmisión, se incluyó el contacto con sangre de personas infectadas, así como prácticas sexuales no protegidas. Los estudios de laboratorio mostraban una disminución significativa en el recuento de las células sanguíneas, Linfocitos T CD4+. [1, 10, 12].

Fue en el año de 1986 cuando el Dr. Luc Montagnier y colaboradores en el instituto Pasteur de Francia, reportaron el aislamiento de un nuevo agente a partir de nódulos linfáticos, con las siguientes características:

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

Con ello, se logró una primera denominación: LAV (por las iniciales en inglés de Lymphadenopathy Associated Virus) seguida de un gran número de aportaciones como el doctor Dr. Robert Gallo en el National Cancer Institute en Estados Unidos, quien también aisló y demostró que este virus era el agente causal de las inmunodeficiencias reportadas [1, 5, 13]. Finalmente, tras intensa investigación, en la que se vieron involucrados el sector salud, científico, político y social, se denominó al VIH como el agente causal del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida.

1.2 EPIDEMIOLOGÍA DEL VIH EN EL MUNDO

De acuerdo con el informe anual de datos estadísticos mundiales proporcionado por ONUSIDA en 2014, se reportó que existen aproximadamente 35 millones [33,2 millones-37,2 millones] de personas infectadas por VIH. El número de personas que han contraído la infección se ha estimado en 78 millones desde el inicio de la pandemia, con la región de África Subsahariana, como la más afectada a nivel mundial (68% de los casos). [9].

Desde su identificación, las infecciones por VIH tuvieron un crecimiento exponencial y el desarrollo de medidas terapéuticas y preventivas se volvió una prioridad. El año 2004-2005 fue el pico más alto en muertes relacionadas con SIDA (2.5 millones) con un decremento hasta la fecha, de más del 30% en países con acceso a tratamiento antirretroviral. El decremento mundial en nuevas infecciones es del 38% desde 2001 y una reducción del 58% en la transmisión materno-fetal se ha logrado a partir de ese mismo año [9]. Las campañas de concientización, mejoramiento de infraestructura, atención hospitalaria y optimización del Tratamiento Antirretroviral, han jugado un papel crucial para mejorar la calidad de vida de las personas que viven con VIH.

1.2.1 LA EPIDEMIA DE VIH EN MEXICO

América Latina, Europa oriental y Asia central se encuentran en el tercer lugar de infecciones a nivel mundial. En el año de 1986 México adicionó el SIDA a la lista de enfermedades sujetas a notificación inmediata, y en este mismo año se creó el primer Comité Nacional para Coordinar los Esfuerzos en VIH/SIDA, al cual le siguió la formación del Consejo Nacional para la Prevención y Control del VIH/SIDA (CONASIDA) y del Centro Nacional para la Prevención y Control del VIH/SIDA (CENSIDA) [2, 3].

De acuerdo al Informe Nacional de avances en respuesta al VIH y el SIDA, en México, la epidemia se ha establecido como concentrada, y alcanzó el punto máximo de infecciones en 1999 con factores como prácticas sexuales sin protección y flujo de migrantes como principales puntos en la expansión de la epidemia. A partir del 2004, el acceso al tratamiento antirretroviral es proclamado como derecho, ocasionando una disminución paulatina en los casos de muerte relacionados con SIDA en un 9% [2, 14, 15]

La prevalencia de VIH en adultos en México, ha permanecido constante con un porcentaje estimado de 0.3% (edad de 15 a 49 años), valor por debajo del porcentaje en América Latina (0.6%) y en el mundo (0.8%) [14]. Las poblaciones clave más afectadas son hombres que practican sexo con hombres, trabajadores sexuales y usuarios de drogas intravenosas. El número estimado de personas que viven con VIH, con fecha de actualización de diciembre de 2013 es de 180,000 siendo la transmisión sexual la principal vía de transmisión con un 90% de los casos reportados [14].

Se ha mantenido una razón histórica hombre/mujer de 4.05 hombres con SIDA o VIH por cada mujer, con un 80% de casos del sexo masculino. La disminución en la transmisión materno-fetal ha sido un objetivo más en el sector salud con una disminución del 40% en comparación con el año 2011 [14].

De acuerdo a este reporte, la epidemia se ha mantenido estable con un mayor número de personas diagnosticadas en el período 2011-2013 debido principalmente a las campañas de diagnóstico y pruebas rápidas de detección. Y

aunque los casos de SIDA reportados han mostrado un decremento, se ha estimado que sólo el 51% de la población VIH positivo se encuentra bajo régimen de tratamiento antirretroviral [14].

1.3 GENERALIDADES DEL VIH

1.3.1 Origen del VIH

La pandemia causada por el VIH es el resultado de un salto entre especies de retrovirus entre monos y humanos. El Síndrome de Inmunodeficiencia adquirida en humanos es causado por dos tipos de VIH, VIH-1 y VIH-2, el segundo permanece endémico de África Oriental, las afecciones inmunológicas son distintas y con una progresión más lenta, periodos asintomáticos más largos y una tasa de mortalidad menor [16].

Posterior a años de investigación, se conoce que el salto de especie para VIH-1 se originó a partir de un lentivirus de chimpancés, el virus de inmunodeficiencia simiana (SIV_{cpz}) [5, 16-18]. Utilizando herramientas evolutivas como el reloj molecular, a partir de la longitud de ramas descendientes y el ritmo de mutación del virus, se pudo “caminar” a través del árbol filogenético del VIH para estimar cuando ocurrió el salto de especie y hubo una divergencia a partir de un ancestro común. Se ha estimado que el salto tuvo lugar hacia principios del siglo XX con más de una introducción a la población humana, posiblemente ocasionados por la caza de chimpancés destinados a su consumo [5, 18]. El origen evolutivo del VIH-2 es distinto ya que surgió del SIV del mono mangabey ahumado.

1.3.2 Clasificación del VIH

El VIH-1 causante de la pandemia, posee una clasificación compleja debido a la rápida evolución y enorme variabilidad genética, que se debe en gran parte a lo siguiente:

- Alto grado de errores en la replicación del genoma viral por la transcriptasa inversa. Cerca 3×10^5 mutaciones/por ciclo de replicación [16, 19, 20].
- Alta tasa de recombinación genética [16, 20].

- Alta capacidad replicativa del virus *in vivo*. Se sabe que se producen cerca de 10^9 partículas virales en un día, con un rango de 150 a 300 ciclos de replicación [16, 20].
- El gran número de personas afectadas a nivel mundial [16, 20].

Dada la gran variabilidad genética del VIH, es posible encontrar más de un tipo de virus en un solo que difieren en distinto grado entre sí. A estas variantes virales se les denomina cuasi especies [16].

A nivel poblacional, su clasificación requirió de análisis filogenéticos profundos que llevaron a la clasificación del VIH-1 en cuatro grupos genéticos: M (“major”), O (“outier”) y N (“non-M, non-O”), y el recientemente agregado grupo P [16, 21, 22]. De los cuatro grupos descritos, el grupo M es el que se encuentra distribuido mundialmente y presenta además 9 sub-tipos: A, B, C, D, F, G, H, J, K. Aunque son filogenéticamente equidistantes, cada uno de los subtipos presenta diferencias a nivel genético y distribución geográfica [22]. (Figura 1.1). El VIH-1 subtipo C es el predominante en el mundo, especialmente en África Subsahariana y en la India. El VIH-1 subtipo B es el predominante en América del Norte incluyendo México [23] [22-25].

Figura 1.1. Grupos, subtipos y distribución geográfica del VIH [26].

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

Gracias al análisis de diferentes regiones del genoma del VIH, se conoce que existen variantes virales circulantes en distintas partes del mundo que presentan eventos de recombinación genética inter-subtipo a lo largo del genoma. Estas variantes geográficas se conocen como formas recombinantes circulantes (CFR), y

surgen por la transmisión de virus de individuos con múltiples infecciones. En los últimos años se han asociado 51 CRFs a distintas regiones del mundo, donde algunas incluso, se han vuelto predominantes [27, 28].

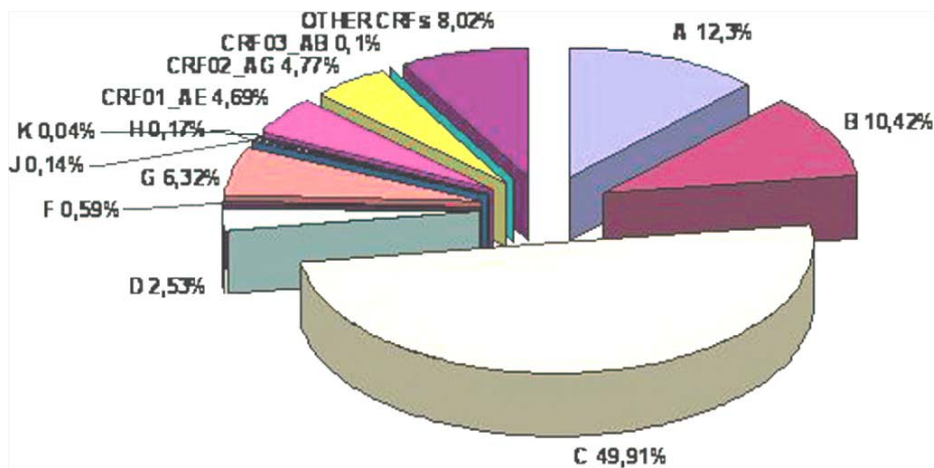


Figura 1.2. Prevalencia mundial de los subtipos de VIH-1. Los grupos N , O y P no se incluyen en la gráfica. Tomada de [28].

1.4 ESTRUCTURA DEL VIH

Taxonómicamente, el VIH se ubica en el género de los lentivirus dentro de la familia de los retrovirus. Así como otros retrovirus típicos, su genoma es tá compuesto de RNA, 2 copias de 9.3Kb en el caso de VIH. Los retrovirus utilizan la actividad enzimática de la retro-transcriptasa para la conversión de su genoma a DNA [16, 19, 20, 22].

Es un virus envuelto de morfología variable, con un diámetro de entre 80 y 120 nm. Figura 1.3. La envoltura es una membrana lipídica que adquiere del hospedero una vez que sale de la célula infectada, contiene principalmente las proteínas de envoltura virales gp120 y gp41 que poseen un alto grado de glicosilación y además, proteínas del hospedero como moléculas HLA de clase I o II, o proteínas de adhesión como ICAM-1. Estas moléculas del hospedero pueden facilitar la infección subsecuente a otras células blanco [6, 7, 29].

Las glicoproteínas virales se encuentran en forma de trímeros con una molécula de gp120, o proteína de superficie y heterodímeros de la proteína transmembranal

gp141, los trímeros conforman las espículas virales y cada partícula viral expresa alrededor de 72 espículas [7, 16, 30].

La envoltura rodea a la proteína de Matriz confiriendo estructura a la partícula viral (p17) y a la Cápside que le confiere rigidez y la forma cónica característica (p24). La cápside en su interior, contiene las dos copias del genoma de RNA viral, que en el VIH, es parte de un complejo proteína-ácido nucleico que está acompañado de la proteína p7 o Nucleocápside y la Retro-Transcriptasa, RT [31]. El virión contiene entre 10 y 50 copias de RT, integrasa (p32), proteasa (p11) y dos copias de RNA de transferencia celulares, que le sirven como cebadores durante la retrotranscripción (tRNA^{Lys3}) [16, 31].

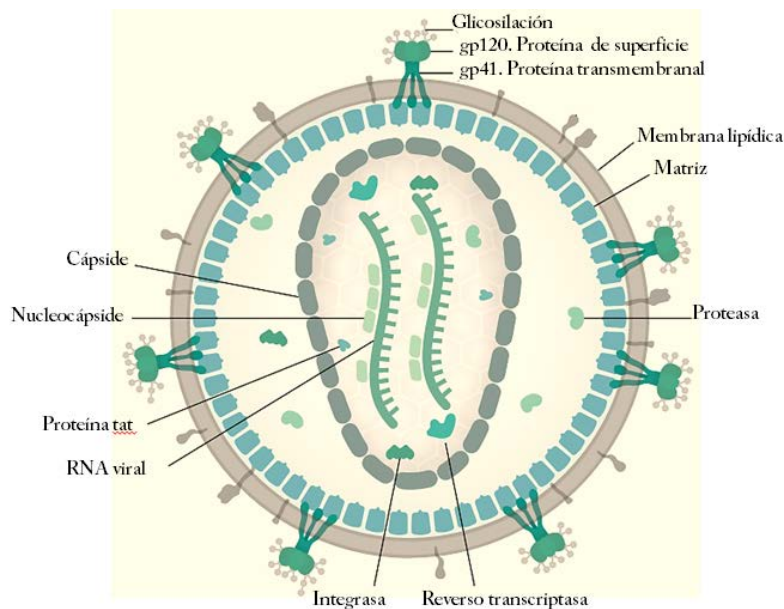


Figura 1.3. Esquema representativo de la partícula viral del VIH. Se indica la posición aproximada de las enzimas, proteínas estructurales y accesorias en la partícula viral. Modificada de www.scistyle.com.

1.5 GENOMA DEL VIH

Como regla general, el genoma de los retrovirus codifica para tres genes principales:

- Env: Envoltura. Codifica para proteínas de la envoltura
- Gag: Gen de antígeno específico, que codifica para proteínas estructurales
- Pol: Polimerasa. Codifica para enzimas virales

El genoma del VIH, además de estos tres genes principales, contiene 6 marcos de lectura adicionales que se encuentran traslados y codifican para proteínas accesorias y regulatorias: Vif, Vpu, Vpr, Tat, Rev y Nef. En total, el genoma codifica para 14 proteínas [1, 3, 32].

Dos secuencias largas de repetición o LTRs flanquean el genoma viral y su estructura es primordial y a que sirve como promotor y potenciador de la transcripción del genoma, e interviene en diferentes etapas del ciclo de replicación. Dentro de sus funciones principales están: formar estructuras híbridas ARN-ADN que permiten la producción de hebras completas de ADN durante la retrotranscripción, guían la integración del ADN viral al genoma del hospedero y una vez integrado, funcionan como regulador de la síntesis de ARNm, contienen además, secuencias que dirigen el empaquetamiento del ARN genómico [1, 30, 33]. Figura 1.4.

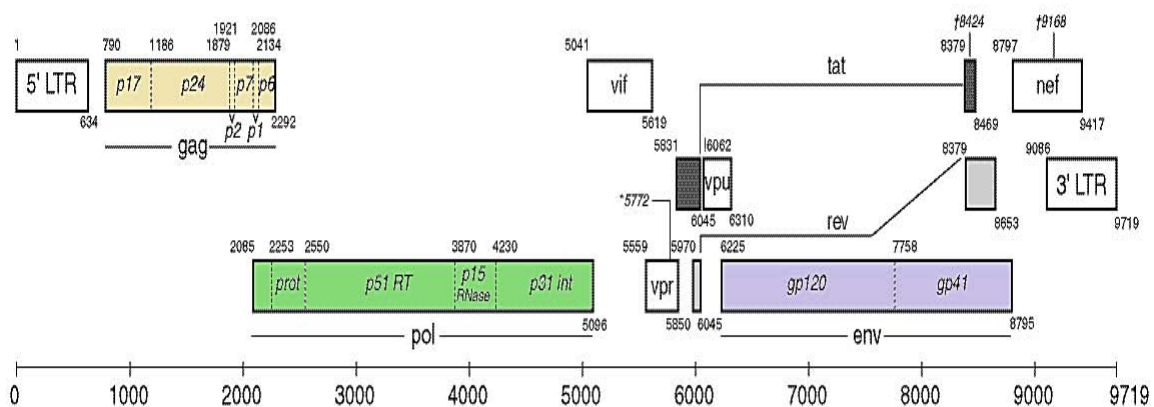


Figura 1.4 Organización del genoma del VIH-I. Se muestran los LTRs flanqueadores y los tres marcos de lectura abiertos, ORF, para los genes principales *gag*, *pol* y *env*. Se muestran los seis ORF adicionales que codifican para las proteínas accesorias/regulatorias. Obtenido de [34]

La transcripción del genoma de los retrovirus ocurre de manera policistónica, por lo que se requieren modificaciones posteriores para la formación de una partícula viral madura. A continuación se describe la función de cada proteína codificada por el genoma viral.

Proteínas estructurales

El gen *gag* viral codifica para el precursor polipeptídico de 55kDa llamado Pr55^{gag}, y tiene el siguiente orden de traducción p17: Matriz, MA; p24: Cápside, CA; p7: Nucleocápside, NC; p6 y dos péptidos espaciadores p2 y p1[19, 31].

La proteína de Matriz, p17 tiene una estructura trimérica, se localiza inmediatamente después de la envoltura lipídica y es la responsable de conferir estabilidad y estructura al virus [19]. Tiene además, la función de direccionar el precursor Pr55^{gag} a la membrana de la célula hospedera por unión de un dominio rico en ácido mirístico y aminoácidos básicos que presentan a finidad a la negatividad de la membrana de la célula hospedera [16, 31]. Otras funciones descritas para la Matriz, son el reclutamiento de las proteínas de envoltura y la participación en eventos tempranos post-entrada por interacción con un complejo llamado complejo de pre-integración (PIC) [7, 16, 31, 35] (Ver sección 1.4. Ciclo de replicación).

La Cápside p24, tiene como función principal promover el ensamblaje del virus y posee dos dominios funcionalmente importantes. El dominio N-terminal incorpora a la ciclofilina A, proteína celular cuya interacción resulta fundamental en la descapsidación y su ausencia impacta en la replicación viral por defectos tempranos post-infección. El dominio C-terminal contribuye a la polimerización de los precursores de gag para empaquetar proteína suficiente en la partícula viral. La forma cónica característica se forma por la red de hexámeros de p24 que ocasionalmente incorpora pentámeros deformando la estructura de la proteína. [16, 31].

La Nucleocápside, NC se asocia directamente al RNA viral por la interacción con dos dedos de Zinc y a través de un dominio rico en cisteínas y altamente básico. Esta interacción es crítica para promover la multimerización de Gag y mutaciones en esta región conservada abolen la encapsidación. El RNA viral interactúa con la NC por una secuencia ψ o señal de encapsidación que se encuentra en el extremo LTR 5' del genoma viral [16, 31]. Dentro de sus funciones adicionales, se encuentra la facilitación de la retrotranscripción por interacción con las moléculas

de RNAt y estabilidad de los ácidos nucleicos recién retrotranscritos por su actividad de chaperona [7, 31].

La proteína p6, cumple una función primordial para la liberación de los viriones de la célula hospedera. El mecanismo que utiliza esta proteína es el secuestro de la maquinaria de transporte de vesiculación celular por unión a un dominio del complejo celular ESCRT, Tsg101 [36]. El dominio de unión de p6 con ESCRT, PTAP, ha sido bien caracterizado y se encuentra cerca del dominio N-terminal de p6. Su delección ocasiona una acumulación de partículas virales que permanecen unidas a la membrana celular. Adicional a este mecanismo, p6 contiene el motivo LYPLTSLRSL que une al factor celular AIP1 o Alix que a su vez interacciona con el complejo ESCRT-III, funciona como mecanismo secundario y de rescate en caso de interacciones defectuosas PTAP-ESCRT [7, 36, 37].

El gen *pol* codifica para el precursor Pr160^{gag-pol}, y tras su procesamiento contiene la información para tres enzimas virales: proteasa, transcriptasa inversa e integrasa. Este gen posee una porción de traslape con el gen *gag* viral (figura XX) y el precursor se traduce en conjunto con las proteínas de *gag*. La tasa de traducción para estos genes traslapados es de 95% para Pr55^{gag} y 5% para el precursor Pr160^{gag-pol} [38-40].

La enzima proteasa es una proteína homodimérica aspártica, que requiere de auto-procesamiento para su liberación del polipéptido gag-pol y dimerizarse. Una vez que adopta su configuración activa, es la responsable de procesar los polipéptidos y completar el proceso de maduración de los viriones durante la salida de la célula, los cambios conformacionales que esto conlleva son visibles por microscopía electrónica. Figura 1.5 [16, 39, 41, 42].

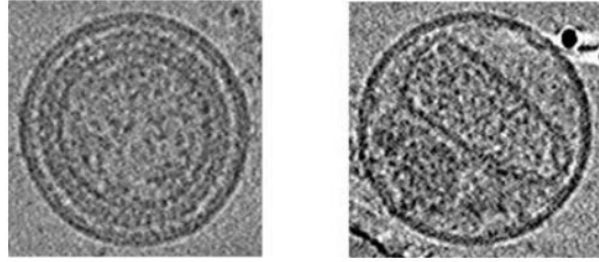


Figura 1.5. Microscopía electrónica de un virus maduro y un virus inmaduro. Microscopía electrónica que muestra la estructura cónica característica del VIH-1, derecha, gracias a la maduración del virión por el procesamiento de precursores polipeptídicos. Tomada de [43]

La transcriptasa inversa es una DNA-polimerasa dependiente de RNA que como su nombre lo dice, es la encargada de catalizar la formación de DNA de doble cadena a partir de las dos copias de RNA viral. Es una enzima dependiente tanto de RNA como de DNA que posee actividad de RNasaH que degrada la cadena original de RNA viral, pero que carece de propiedades de exonucleasa 3'-5' [16, 19, 44]. La falta de esta actividad resulta en una baja fidelidad al no tener la capacidad de corregir los errores que ocurren durante la replicación (3×10^5 mutaciones/por ciclo de replicación) [16]. La enzima además, genera eventos de recombinación durante el proceso de retro-transcripción al cambiar entre las dos cadenas de RNA genómico viral, proceso que se conoce como elección de hebra [16, 43].

La enzima integrasa, como su nombre lo dice, permite la integración del DNA viral recién retrotranscrito al genoma de la célula hospedera. Tiene tres funciones enzimáticas: actividad de exonucleasa que permite la eliminación de dos nucleótidos terminales del extremo 3' del DNA viral, actividad de endonucleasa de doble cadena que permite el corte del DNA de la célula en el sitio de integración, y actividad de ligasa que hace posible la unión covalente de cada extremo del DNA proviral con el DNA de la célula hospedera [16].

El gen *env* es el precursor polipeptídico gp160. A diferencia de los precursores anteriores, gp160 se procesa por una proteasa celular y tiene como productos la proteína de superficie gp120 (SU) y la proteína transmembranal gp41 (TM) [16]. gp120 es la proteína con más variabilidad en el VIH y es la que tiene los dominios de unión a la molécula diana del hospedero, CD4, y a los correceptores de quimiocinas CCR5 y CXCR4, correceptores del virus. La función principal de estas

proteínas es promover la reacción de fusión de membranas. Cuando se establece la unión entre gp120, el receptor y el correceptor se producen cambios conformacionales que exponen el dominio de fusión presente en gp41 haciendo posible la unión entre la envoltura viral y la membrana celular. Las proteínas durante su maduración, adquieren un alto grado de glicosilación que dificulta la selección de anticuerpos neutralizantes [7, 16, 30].

Proteínas reguladoras

La proteína Rev es una fosfoproteína que permite la acumulación de transcritos virales sin eventos de corte y empalme (splicing). Es una proteína reguladora de la expresión génica que se traduce tempranamente, y secuestra a los transcritos de splicing permitiendo la traducción de transcritos largos (*gag-pol* y *env*), por transporte del núcleo al citoplasma de la célula. Rev se une a una secuencia específica del genoma del virus llamada RRE, elemento de reconocimiento de Rev, situada en *env*, en cuya ausencia no hay formación de nuevos viriones [16, 45].

Una segunda proteína reguladora es Tat cuya actividad es primordial durante la transcripción génica. Recibe el nombre de transactivador transcripcional y posee unión directa con una región específica del RNA viral a través del elemento TAR localizado en el LTR 5'. La presencia de Tat incrementa cientos de veces la eficiencia de la transcripción de genes del VIH por interacción con la Polimerasa celular. Se ha reportado que Tat también facilita la infectividad por intervención en procesos de transducción de señales dentro de la célula [7, 16, 45].

Proteínas accesorias

Vif es el factor de infectividad del virus y es esencial para que el virus pueda replicarse en linfocitos T CD4+ y otras líneas celulares como macrófagos y células dendríticas. Inhibe la actividad de factores celulares de la familia de APOBEC3G (A3G), que de forma natural, bloquean la replicación induciendo hipermutación en el genoma viral. Vif funciona como enlace entre estos factores y el sistema de ubiquitinización ocasionando la degradación de este factor de restricción [7, 16].

Nef induce regulación a la baja de la molécula CD4, favoreciendo su internalización. Sirve como factor de evasión para el reconocimiento del sistema inmune de las células infectadas por la regulación a la baja de HLA-I (ver sección xxx). Interfiere con moléculas de transducción de señales activadoras en las células T del hospedero para mantener el control de la célula infectada y permitir la replicación [7, 16]

Vpu es esencial para el empaquetamiento de viriones. Es una fosfoproteína integral de membrana cuya ausencia produce la acumulación de viriones en la membrana y en vesículas intracelulares. Vpu interfiere con la actividad de la proteína restrictiva teterina. Teterina evita la liberación de los viriones al formar puentes entre la membrana viral y la membrana celular. Vpu se une a teterina provocando su degradación mediada por ubiquitinación y promoviendo la liberación de los viriones. Vpu también induce la degradación de CD4 al hacer un enlace entre el dominio citoplasmático de la molécula CD4 y un marcador de proteólisis mediada por ubiquitinación [7, 16]

Vpr forma parte de dos complejos proteicos importantes en el ciclo de replicación viral. El primero es en la transcripción inversa, donde regula la mutación del VIH evitando la acumulación excesiva de errores durante el proceso de retrotranscripción. El segundo es el complejo de pre-integración (PIC), actuando como un factor de transporte del DNA viral al núcleo de la célula. Otra de sus actividades bien caracterizada es el arresto celular en fase G₂ durante las primeras horas de infección por inactivación del complejo cinasa dependiente de ciclina (CDK) p34/cdc2. Esta proteína se encuentra presente en grandes cantidades en los viriones por unión con p6 [7, 16, 31]

1.6 CICLO DE REPLICACIÓN

Como todos los lentivirus, el VIH produce una condición de progresión lenta donde el punto clave para establecer una infección crónica-persistente es lograr la inserción de su material genético en el DNA del hospedero. La inserción del DNA permite la síntesis proteica y el establecimiento de un estado de latencia [18, 46].

El ciclo da comienzo con el contacto de la proteína gp120 al receptor primario del virus, la molécula CD4, presente mayoritariamente en linfocitos T ayudadores activados y en un menor porcentaje en macrófagos, monocitos, células dendríticas, entre otras. Este paso es crucial y a que no sólo marca el inicio del ciclo de replicación, sino que interfiere con señales de transducción intracelulares propias del linfocito T. De manera natural, el marcador CD4 es una molécula que pertenece a la súper familia de las inmunoglobulinas y su función principal es potenciar la cascada de señalización por el TCR, iniciando los eventos de fosforilación en la célula [16, 19, 30].

La interacción gp120-CD4 no es suficiente para la entrada del virus, sino que requiere además, de un correceptor que interacciona con la región variable V3 de gp120 [16, 19, 30]. Se han descrito dos co-receptores de quimiocinas principales, CXCR4 y CCR5, la distinción entre estos correceptores define el tropismo del virus clasificándolo en M-trópicos o R5 si el correceptor es CCR5 y T-trópicos o X4 si el correceptor usado es CXCR4. Además, se han aislado virus con tropismo dual cuya afinidad es intermedia. En la mayoría de los casos, al principio de la infección predominan los virus R5 (etapa temprana) y en etapas más tardías predominan virus X4. Una vez establecida esta unión, ocurren cambios conformacionales en gp120 que exponen el dominio de fusión de gp41 promoviendo la fusión entre la envoltura del virus y la membrana celular [16, 19, 20, 30].

La fusión de membranas permite que la cápside entre al citoplasma celular y gradualmente se separe para permitir la formación del complejo de retrotranscripción. El complejo RT se encarga de sintetizar la primera hebra de DNA con ayuda de un tRNA^{Lys3} que proporciona el 3'OH y funciona como primer. El dominio con actividad de RNasaH degrada la porción de RNA del híbrido RNA-DNA, dejando una cadena sencilla de DNA que se complementará para formar las dos hebras de DNA para su inserción en el núcleo celular, cabe mencionar que la recombinación ocurre en más del 50% durante la síntesis de DNA [16, 19, 47]. Durante el proceso, se forma el PIC o complejo de preintegración, que es tá compuesto de ADN de doble cadena, y proteínas virales como IN, RT, MA, NC y Vpr. Este complejo contiene señalizaciones para la internalización activa por los

poros nucleares de la célula. Una vez dentro del núcleo, la IN forma extremos cohesivos y la ligasa une el DNA viral con el DNA de la célula en regiones del genoma transcripcionalmente activos. Al DNA viral insertado en el genoma, se le denomina provirus [16, 19, 48, 49].

Una vez integrado el genoma viral, da inicio la transcripción de los genes. Como previamente se describió, la porción LTR juega un papel importante al contener secuencias potenciadoras y promotoras a diferentes factores de transcripción presentes en el núcleo de las células. Los primeros que se transcriben son RNAm que sufren procesamiento y modificaciones por splicing y dan lugar a las proteínas reguladoras y accesorias. Los RNAm de fase tardía dan lugar a los productos polipeptídicos de Gag, Pol y Env así como la transcripción del genoma completo, todo esto gracias a la actividad reguladora de Rev [16, 19, 45].

El RNA viral así como los precursores Gag, Pol y Env se dirigen a la superficie celular para formar viriones (virus inmaduros). El proceso de salida de los viriones está dirigido principalmente por los precursores de Gag y Pol. El precursor Pr55^{gag} se dirige a la membrana por el dominio en MA que se une directamente a la membrana de la célula en dominios ricos en colesterol y lípidos [7, 16, 19, 31]. La salida de los viriones depende de la presencia de Vpu y de la interacción de p6 con los componentes del sistema ESCRT ya mencionados. Durante la gemación, se adquiere parte de la membrana celular y las proteínas de superficie gp120 y gp41, así como proteínas celulares. Mientras tanto, se lleva a cabo el proceso de maduración por acción de la proteasa viral, donde se procesan los precursores para dar origen a proteínas individuales y funcionales. [16, 19, 50].

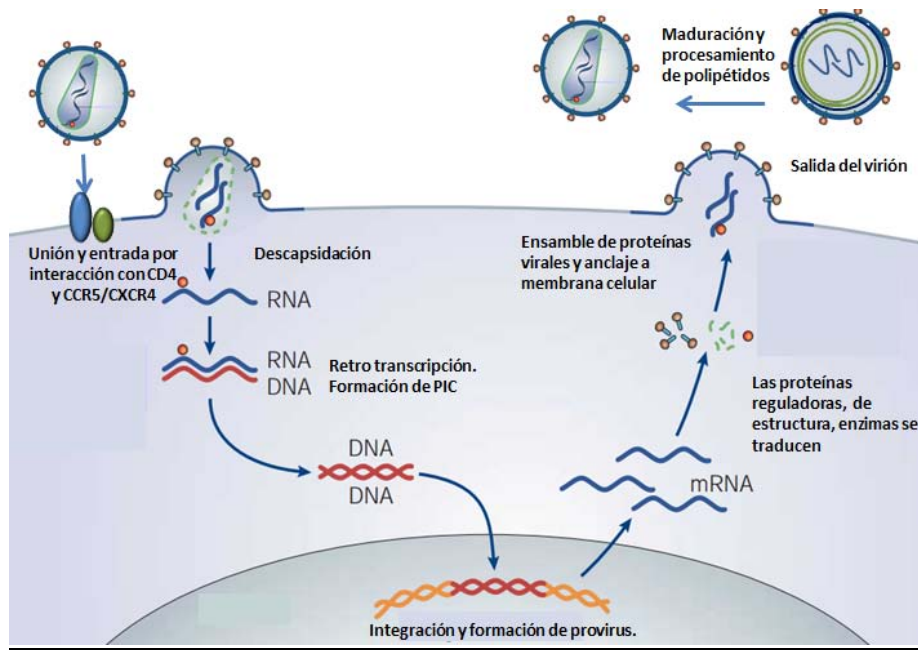


Figura 1.6. Representación esquemática del ciclo de replicación del VIH. Interacción gp120, CD4 y el receptor de quimiocinas (CCR5 o CXCR4). Fusión de membranas, entrada y descapsidación, transcripción inversa del genoma viral, formación del complejo de preintegración, PIC. Transporte de PIC al interior del núcleo e integración del DNA viral (provirus). Transcripción temprana de las proteínas reguladoras, y accesorias, en etapas tardías, se producen las proteínas estructurales y las dos copias de RNA viral. Transporte de RNA viral y poliproteínas a la membrana plasmática, ensamblaje y liberación de viriones por gemación. Maduración del virión por el corte de precursores mediado por la actividad de la proteasa. Obtenido y modificado de xxxx.

1.7 HISTORIA NATURAL DE LA INFECCIÓN POR VIH

El curso de la infección por VIH puede estudiarse en tres etapas: Infección primaria o aguda, Infección crónica, de latencia o asintomática y SIDA. La duración de cada etapa varía en cada persona por factores inmunes, genéticos, virológicos, así como el inicio de un esquema de tratamiento antirretroviral. Los parámetros clínicos por excelencia para evaluar la progresión, es el recuento de Linfocitos T CD4+ (células/ μ L sangre) y el RNA viral en plasma (copias/mL de plasma) Figura 1.7 [1, 3, 5, 51]

Infección primaria. La fase aguda se puede subdividir en más de una etapa de acuerdo a eventos inmunológicos y virológicos [51]. La fase de eclipse, es un período de diseminación del virus en mucosas, previo a la detección de RNA viral en plasma sanguíneo (10 días). A esta fase, le sigue un crecimiento exponencial de RNA en plasma, que culmina en un pico de viremia consecuencia de la diseminación y replicación poco controlada del virus. La transición al periodo de

viremia se asocia a una marcada depleción de linfocitos CD4+ en sangre periférica y con mayor importancia, depleción de CD4+ en mucosas. Se pueden identificar anticuerpos específicos posterior a 30 días de infección y la fase se acompaña de síntomas no específicos fiebre, faringitis, dolor de cabeza, pérdida de peso, entre otros [16, 21, 51]

Posterior al pico de viremia y en coincidencia con la aparición de respuestas inmunes específicas del hospedero (Linfocitos T citotóxicos CD8+, ver sección 1.8. Respuesta inmunológica contra el VIH), se observa un control parcial de la viremia en un punto de equilibrio conocido como “set point” viral (10^3 - 10^5 copias/mL de sangre). La cuenta de Linfocitos T CD4+ aumenta y se mantiene en equilibrio. El set point es predictivo de la progresión de la enfermedad y el riesgo de transmisión [51].

Infección crónica. Una vez que el sistema inmune del hospedero ha montado respuestas específicas contra el virus, el individuo cursa con una infección asintomática o crónica que varía de persona en persona influenciado también, por factores inmunes, genéticos y virológicos. La etapa tiene una duración de años y se caracteriza por cargas virales relativamente bajas y controladas, con una pérdida estable de LT CD4+ de aproximadamente 30-60 células/ μ L/año, donde las cuentas se establecen entre 200 a 500 células/ μ l. En esta etapa, la replicación viral y el recambio de células es muy dinámico lo que permite que clínicamente no existan síntomas de relevancia médica, sin embargo, la replicación viral residual sucede de manera explosiva y constante [19, 20, 51].

La replicación constante conlleva a la producción de variantes virales debidas a dos factores principales: la alta tasa de mutación y replicación, en adición a los eventos de recombinación propia del virus, y la presión de selección por parte de la genética inmune del hospedero que origina que se fijan variantes de escape inmunológico. Sección 1.8.2 Evolución viral mediada por el sistema inmunológico. Presión selectiva por HLA-I. Todos estos factores conllevan a una progresión lenta pero constante de la infección hacia SIDA.

Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida. SIDA. La etapa final de la infección está caracterizada por diversas comorbilidades acompañada de la sintomatología clínica que la inmunodeficiencia y desgaste inmune conlleva. Los individuos afectados son incapaces de responder a patógenos, incluidos oportunistas consecuencia de dos factores importantes: Primero, las células blanco del VIH, Linfocitos TCD4+, son células clave para coordinar y regular la respuesta inmune del organismo, en esta fase, los niveles son menores a 200 células/ μ L. Segundo, debido al contacto constante con antígenos del VIH, acompañado de anomalías en mucosas y ganglios linfáticos, existe activación y desgaste inmunológico crónico que hace ineficaz la respuesta ante cualquier patógeno. La infección por VIH, sin intervención terapéutica, es letal. [6, 19, 20, 51] (Figura 1.7).

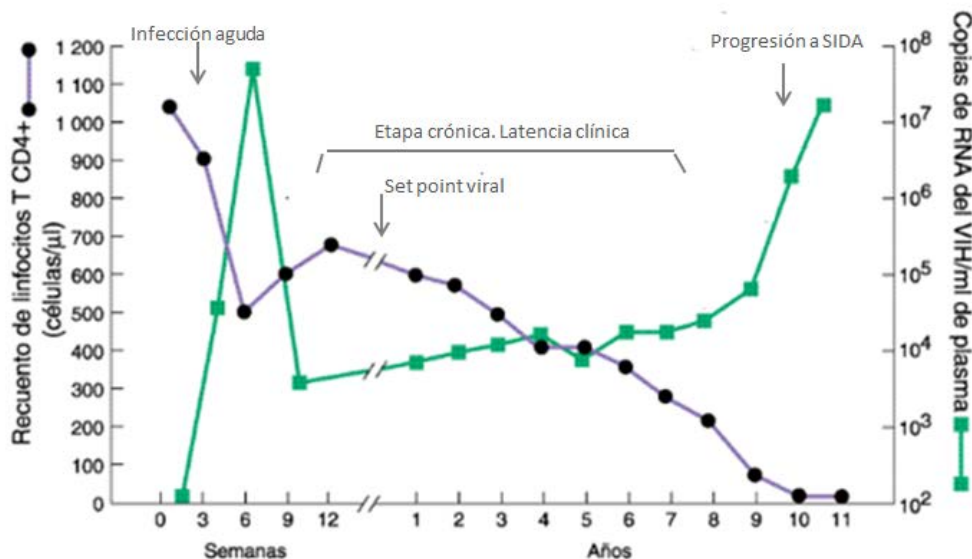


Figura 1.7 Historia natural de la enfermedad por VIH y sin intervención de tratamiento antirretroviral. Se grafica la variación vs tiempo de Linfocitos T CD4+ y del número de copias de RNA viral. [Modificada de [52]].

1.8 RESPUESTA INMUNOLÓGICA CONTRA EL VIH

Durante el curso de la infección por VIH el sistema inmunológico emplea estrategias para el control de la replicación y diseminación del virus. Sin embargo, este control no solamente es por parte de las células inmunológicas, también existen factores genéticos que naturalmente confieren resistencia a la infección. Uno de los mecanismos mejor estudiados es la delección de 32 pares de bases en

el receptor de quimiocina CCR5, la delección evita su expresión en las células y el virus no puede usarlo como coreceptor para la entrada en el hospedero. La heterocigosis confiere resistencia parcial y la homocigosis, resistencia completa [30].

La protección mediada por anticuerpos ha implicado grandes esfuerzos para el desarrollo de vacunas, sin embargo, hasta la fecha, no se ha logrado la efectividad de alguna. El fracaso en el uso de anticuerpos se debe principalmente a que los anticuerpos neutralizantes se seleccionan de manera tardía, posterior a 3 meses post-infección y no satisfacen la velocidad de mutación de los epítopos que reconocen, especialmente en la proteína de superficie gp120. El grado de glicosilación de esta proteína, es un factor importante adicional en el fracaso de selección de anticuerpos efectivos [12, 29, 30, 51]

Desde el punto de vista inmunológico, la evolución de la respuesta en contra del VIH es dinámica y compleja. Desde etapas agudas de la infección células NKs y células dendríticas cumplen su función de defensa innata al identificar al VIH como patógeno intracelular. Sirven como mediadores para el desarrollo de respuestas específicas y celulares y proveen de un ambiente rico en citocinas y quimiocinas antivirales. E.g. INF tipo I, IL -12, IL -15, IL-8 [29]. Las células dendríticas son presentadoras de antígeno profesionales y son las encargadas de hacer el puente entre la inmunidad innata y adaptativa contra el VIH. Las células NK lisan directamente a las células infectadas por un balance entre estímulos activadores e inhibidores que propician un ambiente de inflamación antiviral. Se han descrito asociaciones de receptores NK con progresión lenta de la infección y se han clasificado como alelos protectores, e.g. el receptor KIR3DS1 en asociación con su ligando B W4 que posee una isoleucina en la posición 80, Bw4 Ile80, se ha reportado como alelo de protección. [29, 53].

1.8.1 RESPUESTA CITOTÓXICA MEDIADA POR LINFOCITOS TCD8+

Se ha demostrado sin embargo, que la respuesta celular específica es la que tiene un mayor impacto en el control de la replicación viral. La respuesta mediada por linfocitos T CD8+ citotóxicos se da gracias al ambiente de citocinas que favorecen una respuesta celular adaptativa por la estimulación de los linfocitos T CD4+

ayudadores. [12, 54-57]. El reconocimiento se da gracias al contacto sumamente específico tipo “cerradura”, entre pequeños péptidos virales y el receptor TCR del linfocito T CD8+. Los péptidos o epítopes, son lineales con una longitud de 8 -12 aminoácidos que se generan por degradación del patógeno intracelular vía presentación antigénica clase I y se expresan en el surco de las moléculas HLA-I de la célula infectada Figura 1.8 [54, 57, 58].

Las moléculas HLA-I, Antígeno Leucocitario Humano, se expresan en todas las células nucleadas del organismo y se codifican en el complejo mayor de histocompatibilidad MHC en el brazo corto del cromosoma 6.

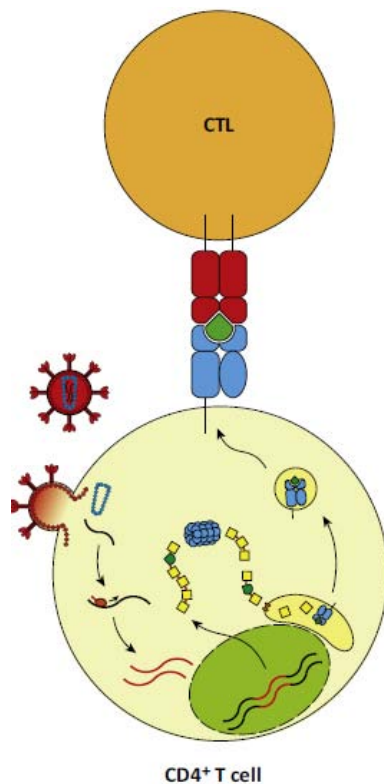


Figura 1.8. Reconocimiento de péptidos de VIH por Linfocitos CD8+ citotóxicos, CTLs. Esquema que muestra el procesamiento y reconocimiento de péptidos virales (verde) por el TCR del Linfocito CD8+ citotóxico, CTL (rojo), en una célula CD4 infectada. El péptido se presenta en el surco de la molécula HLA-I (azul). Obtenida de [12].

El reconocimiento del péptido deriva en la diferenciación a un fenotipo efector con actividad citotóxica y liberación de factores solubles. Dentro de los factores solubles se destacan citocinas como Interferón- γ , TNF- α y quimiocinas como MIP-1 α/β y RANTES, proporcionando un ambiente pro-inflamatorio antiviral. La respuesta citotóxica utiliza dos vías: la liberación de granzimas y perforinas que lisan a la célula infectada y la interacción de la molécula FasL, ligando de Fas CD95, presente en la célula infectada y que inicia el proceso apoptosis celular[6, 54, 57].

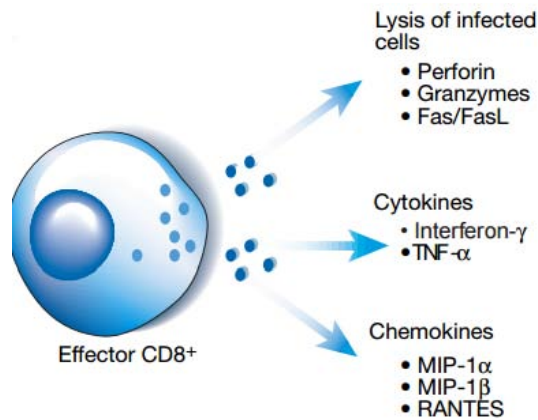


Figura 1.9. Función de un linfocito T CD8+ efector, CTL por el reconocimiento de péptidos de VIH-1. La liberación de perforina, granzima y FAS/FASL ocasiona la lisis de la célula infectada. La liberación de citocinas y quimiocinas favorece la respuesta inflamatoria antiviral.

1.8.2 EVOLUCIÓN VIRAL MEDIADA POR EL SISTEMA INMUNOLÓGICO. PRESIÓN SELECTIVA POR HLA-I

Los genes que codifican para las moléculas HLA-I exhiben un grado de polimorfismo destacado en el genoma humano. De manera clásica, se codifican para alelos HLA-A, HLA-B, y HLA-C con seis posibilidades de expresión en cada persona, es decir, dos alelos por cada molécula. Existen también moléculas HLA-II DP, DQ, DR que se expresan únicamente en células presentadoras de antígeno como células dendríticas y macrófagos [59].

Hasta junio de 2015, se han reportado 3,192 alelos para HLA-A, 3,977 para HLA-B y 2,740 para HLA-C, cada uno con la posibilidad de presentar una gran pero finita variedad de epítopes. Este repertorio de presentación y alto grado de variabilidad, origina que la presión sobre la selección de mutaciones en el VIH, y por tanto su evolución, sea constante y muy fuerte no sólo a nivel individual sino a nivel poblacional [57, 60-62].

Dada esta presión selectiva, el VIH se ha adaptado al sistema inmunológico del hospedero con la selección de mutaciones que escapan al reconocimiento por parte de los CTLs. Más aún, la descripción de los péptidos específicos que reconoce cierto alelo HLA, ha hecho posible describir asociaciones entre alelos y mutaciones relacionadas con el reconocimiento citotóxico y que por tanto, tienen impacto en la progresión de la enfermedad. Ejemplo de ello son los alelos HLA-

B*57:01 y HLA-B*27:05 que han mostrado una asociación fuerte y consistente con un control eficiente de la infección por VIH y un avance lento de la enfermedad, los epítopes que reconocen se encuentran dentro del gen *gag* viral. Específicamente para el alelo B*57:01 por ejemplo, se conoce el epítope TW10 con la mutación de escape T 242N asociada a una disminución significativa de la capacidad de Replicación del virus confiriendo lenta progresión en el hospedero. Por el contrario, alelos como HLA-B*3502 y HLA-B*3503 se asocian a un control deficiente de la replicación y un avance rápido de la enfermedad [25, 57, 61-63].

Más interesante, se ha demostrado que los alelos HLA-I son característicos de la población, así como su distribución geográfica. Estudios se han enfocado a la tipificación y determinación de la frecuencia de alelos HLA-I por región. Figura 1.10, 1.11. La población caucásica tiene una frecuencia alélica diferente a poblaciones amerindias como la mexicana y por tanto, conocer dicha frecuencia resulta de suma importancia para identificar nuevos alelos que pueden ser de riesgo o protección y que no han sido descritos. Estos nuevos alelos reflejan la adaptación viral por población y tiene impacto directo para el desarrollo de vacunas [12, 25, 61, 64, 65]

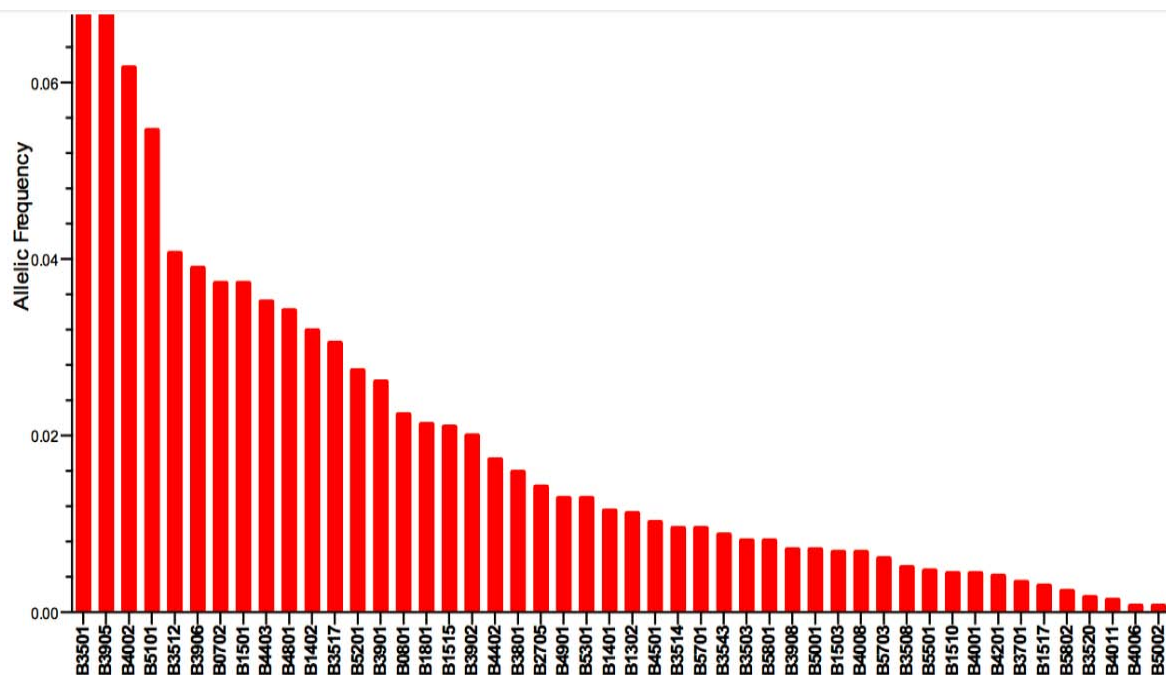


Figura 1.10. Ejemplo de las frecuencias para los alelos HLA-B característicos de la población Mexicana. La gráfica muestra la variabilidad y frecuencia de los alelos HLA-B en la población mexicana. Tomado Valenzuela-Ponce et. al, 2014, datos sin publicar.

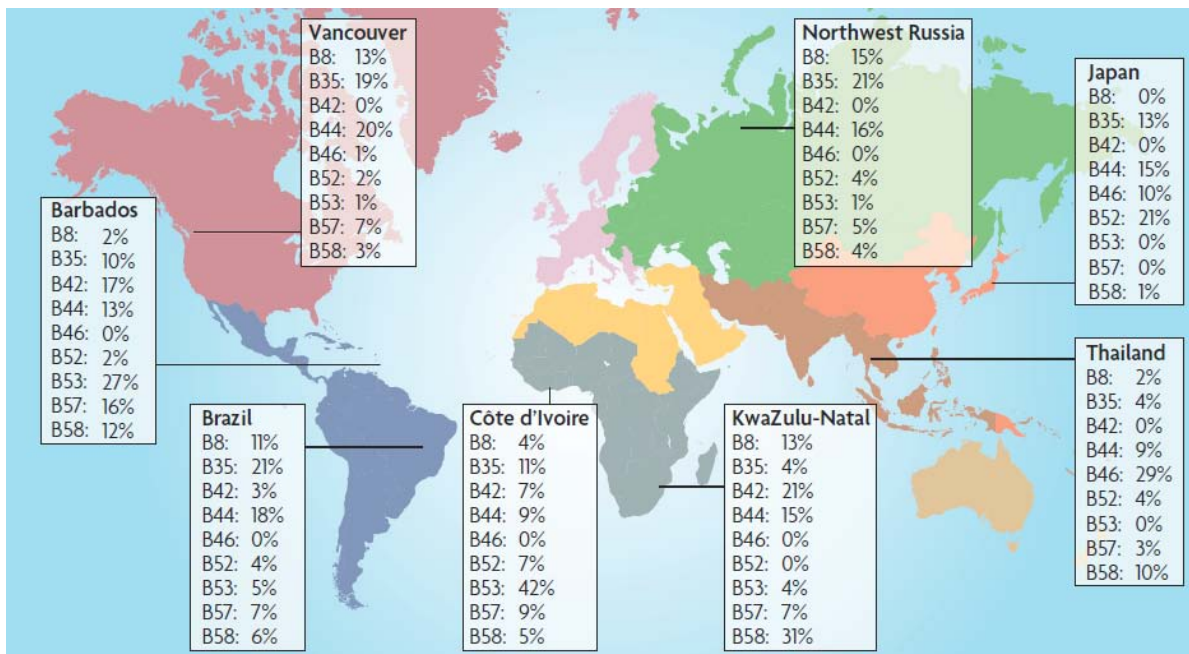


Figura 1.11. Distribución geográfica de alelos HLA-B. Se muestra la distribución y frecuencia de 9 alelos HLA-B a nivel mundial, se observa que la frecuencia de cada uno es distinta en cada región incluso con un 0% de representatividad en algunas regiones eg. B53 en Tailandia vs 42% en África para el mismo alelo. Tomada de [61].

Desde el punto de vista del hospedero, las mutaciones de escape tienen efecto directo en la unión del péptido, disminuyen la afinidad al surco de presentación en la molécula HLA, interfieren en el procesamiento de los péptidos o impiden el reconocimiento por el TCR. Desde el punto de vista virológico, las mutaciones de escape, pueden tener o no un alto costo en la capacidad de replicación, se conoce por ejemplo, que cambios en Gag, especialmente en p24, Cápside, tienen efectos negativos en la capacidad replicativa dada la alta conservación e importancia funcional de esta proteína [60]. La capacidad replicativa (CR), o fitness viral, se define como la capacidad que tiene el virus para replicar bajo ciertas condiciones y es una propiedad que depende totalmente del contexto en el que se encuentre el virus [12].

Siempre que exista el alelo HLA selector, el cambio permanecerá tenga o no implicaciones negativas para el virus; sin embargo, si el virus se transmite a una persona carente de ese alelo, la mutación revertirá [58, 66, 67]. Conforme la

enfermedad progresa, además de las mutaciones de escape, surgen también mutaciones compensatorias, que como su nombre lo dice, sirven para contrarrestar los efectos negativos en la capacidad replicativa viral, de esta manera, el virus escapa al reconocimiento y tienen una capacidad de replicación más alta que le confiere ventajas sobre el hospedero. Se ha descrito también, que para algunos genes, las mutaciones tienen un patrón de selección, por lo que la descripción de estas variantes mutacionales así como un mapa de escape bajo cierto contexto inmunogenético, tiene gran implicación en el estudio de la infección por VIH [60, 68, 69].

Como ya se mencionó, cuando una variante de escape se transmite a un hospedero que carece del alelo selector, tiende a revertir, sin embargo hay ocasiones en las que la variante persiste y tiene implicaciones en la evolución y progresión de la enfermedad sobre todo, si le confiere ventajas en capacidad replicativa. El virus se ha adaptado a la población y se fija como una variante consenso en dicha población, y así, como consecuencia de la gran diversidad de las moléculas HLA-I característica de cada población, así como su distribución geográfica, éstas dirigen la diversidad global del VIH-1 [12, 25] (Figura 1.12).

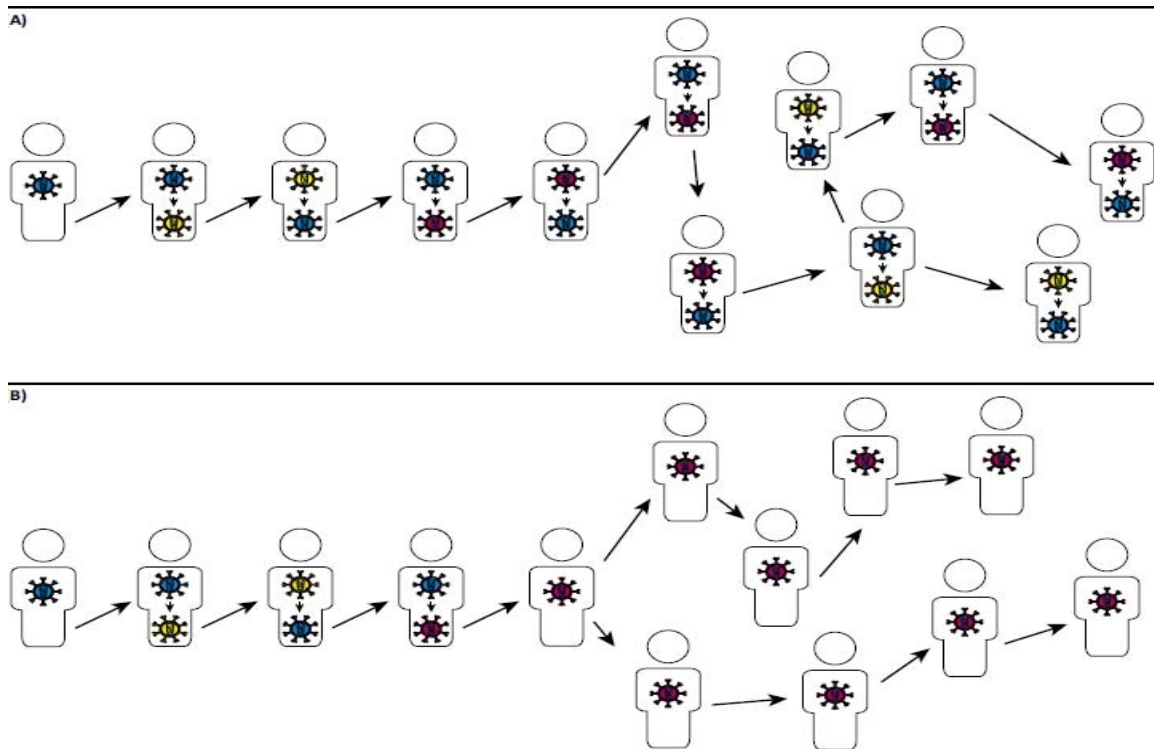


Figura 1.12. Reversión c ontra p ersistencia d e m utaciones d e es cape i nmunológico a n ivel poblacional. Las mutaciones de escape en azul y rosa. Panel A. Las variantes de escape inmunológico c uando s e t ransmiten a un r eceptor carente del a llo s elector, t ienden a r evertir ocasionando un e quilibrio entre l a frecuencia de l a variante no m utada y l a variante d e es cape. Panel B. L a m utación d e es cape i nmunológico p ermanece aún e n aus encia del a llo s elector, fijándose en l a población.

La respuesta citotóxica, aunque es determinante para el control de l a replicación, es incapaz de m antener una r espuesta eficaz a lo largo del curso de l a infección. Ahora s e conoce que adicionalmente a las variantes de es cape i nmunológico, l a activación i mune crónica es crucial para el desgaste del hospedero y por lo tanto, en el control i neficaz de l a infección [6, 46, 70, 71]. La activación crónica influye en l a funcionalidad no sólo de los linfocitos T CD8+ citotóxicos, sino que el fenotipo y funcionalidad del resto de las células como NKs, células dendríticas, macrófagos y los mismos linfocitos T CD4+ se ve alterada, todo ello propicia l a progresión hacia SIDA [70, 71].

1.9 TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL

Los esfuerzos para el desarrollo de agentes antirretrovirales contra el VIH han sido exhaustivos c on l ogros hi stóricos a p artir d e su descubrimiento en l os 80´ s. E l primer fármaco a probado para su uso en humanos fue l a Z idovudina o A ZT en 1987, el p rincipio ac tivo pertenece a l a familia de i nhibidores n ucleósidos de l a transcriptasa r eversa o I NTR [44, 72, 73]. E l desarrollo de una gran número de antirretrovirales se ha l ogrado desde entonces, con el bloqueo de distintos puntos clave dent ro del c iclo de r eplicación del v irus. Los fármacos aprobados en l a actualidad se clasifican en cinco familias:

Tabla 1. 1. Medicamentos ant irretrovirales c ontra VIH aprobados para su uso en humanos de acuerdo a l a familia a l a que pertenecen y sus características generales. Obtenida de [21, 44, 74, 75]

Familia de antirretroviral	Medicamentos aprobados para su uso en humanos	Características generales
Inhibidores nucleósidos de la transcriptasa reversa INTR	<ul style="list-style-type: none"> - Abacavir - Aidanosina - Emtricitabina - Lamivudina - Stavudina - Tenofovir disoproxil Fumarato - Zidovudina 	Moléculas competitivas para el sitio activo de la RT obstaculizando el proceso de transcripción inversa. Poseen estructuras parecidas a nucleósidos y compiten con las bases bloqueando la extensión de la cadena de DNA.

Inhibidores no-nucleósidos de la transcriptasa reversa INNTR	- Delavirdina - Efavirenz - Etravirina - Nevirapina - Rilpivirina	La unión de los fármacos con la RT altera su estructura y actividad impidiendo que prosiga el proceso de transcripción inversa.
Inhibidores de proteasa	- Atazanavir - Darunavir - Lopinavir - Fosamprenavir - Indinavir - Nelfinavir - Ritonavir - Saquinavir - Tipranavir	Inhibidores competitivos de la proteasa viral. Impiden el proceso de maduración al evitar el procesamiento de los precursores polipeptídicos.
Inhibidores de integrasa	- Dolutegravir - Elvitegravir - Raltegravir	Evita la integración del DNA viral al genoma del hospedero por interacción con la enzima integrasa. Inhiben la actividad de transferencia de hebra.
Inhibidores de fusión	- Enfurtivida (T20)	Péptido que mimetiza un dominio en gp41, evitando la fusión de membranas
Antagonistas de CCR5	- Maraviroc	Impide la interacción de gp120 con el correceptor CCR5.

Actualmente se ha establecido por modelos matemáticos y de predicción que el mejor esquema de tratamiento debe incluir una combinación de tres antirretrovirales con al menos dos mecanismos de acción distintos [70]. El objetivo primordial es la supresión máxima y prolongada de la carga viral en plasma, y la meta es que esto sea a niveles inferiores a los valores de detección de las pruebas convencionales, en promedio 50 copias de RNA viral/mL [75]. La inclusión de un esquema de tratamiento modifica el curso natural de la infección por VIH, los pacientes exhiben un aumento gradual en el recuento de Linfocitos T CD4+ que se refleja en la salud de los individuos. Sin embargo, aún estamos lejos de alcanzar una cobertura óptima, países en vías de desarrollo se enfrentan a la dificultad del acceso al tratamiento, actualmente sólo el 36% a nivel mundial, cuenta con acceso a tratamiento antirretroviral (Figura 1.13).

Cuando la supresión viral máxima no se alcanza o existen efectos adversos importantes, el esquema debe modificarse de inmediato. Un factor decisivo para el cambio de esquema de primera línea es el rebote en la carga viral por el desarrollo de mutaciones de resistencia al tratamiento. La causa principal de esta falla, es la pobre adherencia al tratamiento por parte de los pacientes lo que ha conformado un serio obstáculo para la eficacia en el control de la viremia [72, 76].

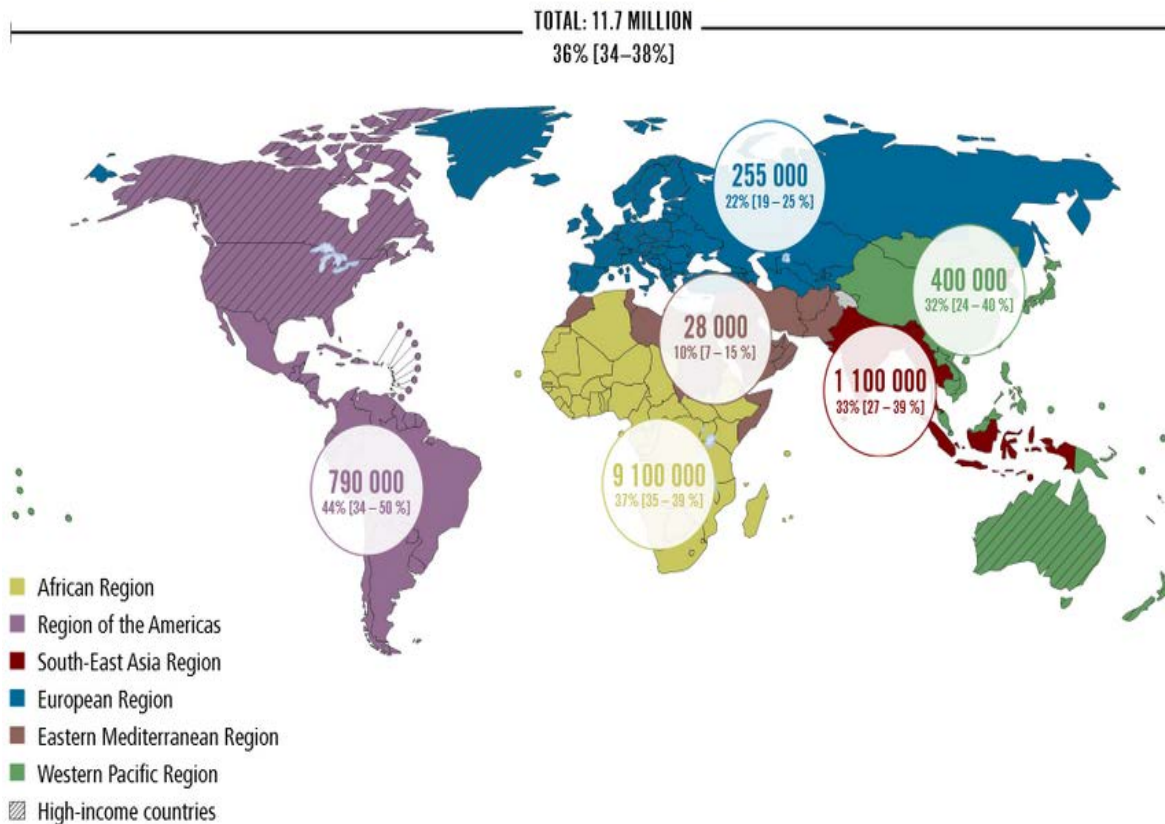


Figura 1.13. Acceso a TAR a nivel mundial. Mapa que muestra el acceso a TAR a nivel mundial con fecha de actualización a diciembre de 2013. Obtenida de www.who.int/hiv.

1.9.1 Tratamiento antirretroviral en México.

A finales del 2003, México alcanzó la universalidad al TAR por el acceso gratuito a personas sin seguridad social que lo requirieran. Esto fue gracias al Fideicomiso de protección c ontra G astos C atastróficos d el S eguro P opular, q ue m ostrado u n impacto significativo en la reducción de transmisión y mortalidad en nuestro país [2, 3, 14]. Cada país tiene guías sobre el manejo y tratamiento antirretroviral y en México, existe acceso gratuito vía internet a una guía actualizada sobre el esquema de tratamiento que se recomienda de acuerdo a la etapa de la enfermedad en la que se encuentra el individuo [75].

La ventana de oportunidad para una progresión más lenta y la implementación de estrategias curativas se ha propuesto debe ocurrir antes de los 25 días post-infección. De ahí la importancia de inicio del tratamiento antirretroviral en fases agudas de la infección para lograr un impacto directo en la disminución del

establecimiento del reservorio, principal obstáculo para la cura de la enfermedad [51]. Además, cabe hacer mención, que el tratamiento antirretroviral tiene concentraciones subóptimas en tejidos, por lo que la eliminación del VIH es improbable. Estudios en mucosas y ganglios linfáticos han mostrado que existe replicación activa y constante en estos tejidos [77, 78].

1.9.2 Resistencia al tratamiento antirretroviral y presión selectiva del TAR sobre la evolución viral

El uso extendido de los antirretrovirales y su lucha por la universalización ha tenido consecuencias negativas de repercusión mundial como la resistencia adquirida y transmitida al tratamiento. En términos generales, la resistencia al tratamiento significa la selección de mutaciones que le permiten al VIH mantener una función proteica del blanco antirretroviral y de esta manera, el objetivo de suprimir la replicación, es ineficiente [11, 42, 79].

La resistencia adquirida o secundaria al tratamiento, se define como la selección de mutaciones en pacientes que han iniciado el esquema de tratamiento y presentan resistencia. La razón principal de esta falla virológica es la pobre adherencia al tratamiento que produce concentraciones subóptimas del fármaco en sangre (Figura 1.14). De todas las mutaciones que puedan surgir en el genoma del virus, sólo unas cuantas le serán favorables y ventajosas, se seleccionan de acuerdo a cada familia de antirretroviral y en algunas de ellas, puede observarse resistencia cruzada [76, 80]

La resistencia transmitida describe a las mutaciones de resistencia que están presentes en el virus circulante de un individuo que no había sido expuesto a ningún antirretroviral, esto por efecto de la transmisión de una cepa viral resistente [23]. La determinación del porcentaje de resistencia transmitida a las diferentes familias de antirretrovirales es una tarea mundial importante, ya que tiene impacto directo en las guías de manejo del tratamiento en cada región. La resistencia transmitida depende de la frecuencia de fármacos utilizada en cada país y tiene una distribución geográfica diferencial [23, 72].

En algunos casos, una sola mutación es capaz de dar un fenotipo resistente, e.g. L90M al inhibidor de proteasa nelfinavir; y se definen como mutaciones mayores

de resistencia. Sin embargo, en muchos casos se necesita la acumulación de varias mutaciones para lograr la resistencia [44, 77]. La nomenclatura de las mutaciones está dada por la anotación del aminoácido wildtype-posición dentro de la proteína-aminoácido mutado, en el ejemplo L90M, se seleccionó el cambio de Leucina por Metionina en la posición 90 de la proteasa viral [76].

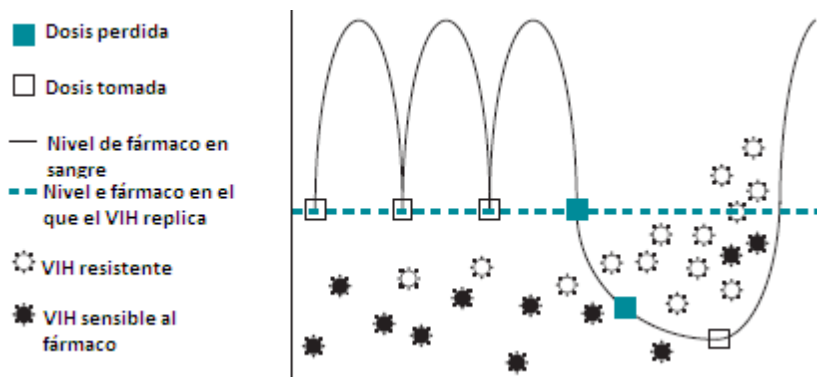


Figura 1.14. Selección de mutaciones de resistencia en el VIH a causa de concentraciones subóptimas de fármacos antirretrovirales. Modificada de [44].

Como previamente se mencionó, una vez que se ha detectado una falla al tratamiento, es importante cambiar el esquema, sin embargo, conforme se modifica a una segunda, tercera línea o esquema de rescate por múltiples fallas, la eficacia disminuye por el grado de exposición a fármacos. Además, el impacto clínico en los individuos debe considerarse por los efectos adversos de los fármacos y el desgaste inmunológico persistente. [44, 71, 78].

Dicho lo anterior, el tratamiento antirretroviral, se constituye como una presión selectiva artificial que limita al virus, y también dirige su evolución. La selección de mutaciones de resistencia es un reflejo de la adaptación viral a esta presión selectiva y se han reportado los efectos en la capacidad de replicación viral dados los cambios en el genoma [42, 77, 81].

1.9.3 Resistencia a Inhibidores de Proteasa y co-evolución con el gen gag

El proyecto de investigación se enfocó al estudio de la presión selectiva por exposición a Inhibidores de Proteasa, IPs. Esta familia de antirretrovirales es la que selecciona el mayor número de mutaciones de resistencia con más de 60 mutaciones reportadas con impacto en el control de la viremia [44]. De manera general, el uso de IPs se ofrece como esquema de segunda línea o de rescate

cuando los pacientes presentan falla al uso y combinación de INTR ó INNTR. Sin embargo, lopinavir/r, atazanavir/r, fosamprenavir/r y con menor frecuencia saquinavir/r se utilizan como fármacos de primera línea (Tabla 1.1). La “r” hace referencia a la co-administración de ritonavir un potenciador que se utiliza como “boosting” por inhibición del citocromo P450 [42, 82].

Todos los inhibidores de proteasa actúan como péptidos mimetizadores, por inhibición competitiva del sustrato natural de la enzima: el precursor Pr55^{gag} y Pr160^{gag-pol} y tienden a ocupar más espacio que el propio sustrato [77]. Las mutaciones de resistencia a los IP surgen por cambios en aminoácidos en el sitio activo de la enzima que reducen la afinidad de la proteasa por el inhibidor, disminuyendo el número y naturaleza de los puntos de contacto con el fármaco. Estas mutaciones reducen mayoritariamente la afinidad por el fármaco más que por el sustrato natural, confiriéndole ventaja al virus reflejada en el repunte de la viremia en sangre, la mayoría de las mutaciones presenta resistencia cruzada a más de un IP (Tabla 1.1) [72].

Las mutaciones de resistencia a los IP se clasifican en dos tipos: Mutaciones mayores o primarias y mutaciones menores o secundarias. Las mutaciones mayores surgen primero y poco tiempo después (semanas) de haber iniciado el régimen (Tabla 1.1), estas mutaciones confieren una reducción significativa en la susceptibilidad al fármaco pero conllevan un alto costo en la capacidad replicativa del virus. En cambio, las mutaciones secundarias surgen de manera paulatina y posterior, por sí mismas son incapaces de aportar resistencia; sin embargo, en conjunto con mutaciones primarias, el fenotipo de resistencia es mayor. Las mutaciones secundarias tienen como efecto compensar las fallas en replicación y se localizan generalmente lejos del sitio activo, ejemplos de ellas son las posiciones 10, 20, 36, 63, 71 en la proteasa viral [42, 44, 72].

	30	32	33	46	47	48	50	54	76	82	84	88	90
<i>Cons</i>	D	V	L	M	I	G	I	I	L	V	I	N	L
ATV/r		I	F	IL	V	VM	L	VTALM		ATFS	V	S	M
DRV/r		I	F		VA		V	LM	V	F	V		
FPV/r		I	F	IL	VA		V	VTALM	V	ATSF	V		M
IDV/r		I		IL	V			VTALM	V	AFTS	V	S	M
LPV/r		I	F	IL	VA	VM	V	VTALM	V	AFTS	V		M
NFV	N		F	IL	V	VM		VTALM		AFTS	V	DS	M
SQV/r						VM		VTALM		AT	V	S	M
TPV/r		I	F	IL	VA			VAM		TL	V		

Figura 1.15. Tabla de mutaciones mayores de resistencia a IPs. Obtenida de la base de datos en línea de la Universidad de Stanford disponible en la red (<http://hivdb.stanford.edu/DR/PIResiNote.html>, last update march 2014. [83]. Se muestran en rojo las mutaciones con mayor impacto clínico y que se contraíndican con el uso del Inhibidor. La primera línea indica la posición dentro de proteasa de acuerdo a la referencia HXB2.

Dado que las mutaciones mayores de resistencia implican efectos negativos en la capacidad de replicación, ahora se conoce que el virus también se ha adaptado en genes externos a la proteasa para compensar estas fallas replicativas. Esta adaptación se ha descrito en el gen *gag* por la selección de mutaciones en el precursor y sustrato Pr55^{gag}. Las mutaciones se han descrito mayoritariamente en los motivos de corte que la proteasa reconoce durante el proceso de maduración viral, pero también en aminoácidos dentro de las proteínas codificadas por Gag [80, 84-88].

El procesamiento de *gag* es una cascada ordenada de eventos de corte consecutivos donde la enzima reconoce cada secuencia de corte dentro de Pr55^{gag}. Alteraciones en esta cascada de corte impiden la maduración de los viriones, provocando alteraciones en la morfología cónica característica del virus maduro [50, 86]. Para conocer la co-evolución de estos genes, se ha establecido el polimorfismo natural de los motivos de corte en ausencia de IPs por lo que la diferencia en variación de cada uno, es ejemplo de la co-evolución entre *gag* y *pol*. El motivo de corte más polimórfico es p2/NC y el más conservado es MA/CA. Figura 1.16.

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

Figura 1.16. Cuadro que muestra la variación natural de los cinco motivos de corte a lo largo del precursor Pr55^{gag} en gag. Obtenida de [50].

Las mutaciones que se han descrito en gag no sólo actúan de manera compensatoria para las fallas replicativas de una proteasa resistente a IPs, sino que algunas de ellas son capaces por sí mismas, de conferir resistencia incluso en la ausencia del inhibidor de proteasa clásico [87, 89, 90]. Se ha descrito que la zona donde se concentra el mayor número de mutaciones asociadas a la exposición por IPs es la porción final de gag p2/ p7/p1/p6 donde una de las mutaciones más caracterizadas es la mutación A431V localizada en el motivo de corte p7/p1, por sí misma se ha asociado a conferir resistencia a IPs [50, 69]. Algunas otras mutaciones destacadas son V128T, K436E/R, I437T/V, L449T/P/V, R452S/K, P453A/L/T que también se han descrito como mutaciones seleccionadas en respuesta a la exposición de IPs.

Dada la importancia del gen gag para la estructura y capacidad replicativa del VIH, la investigación de esta co-evolución es esencial para el manejo de esquemas de tratamiento. La lista de posiciones en gag bajo presión selectiva por IPs sigue en aumento así como el estudio del efecto en el ciclo de replicación viral bajo cierto contexto inmunogenético [50, 81, 91].

1.10 PRESIÓN SELECTIVA MÚLTIPLE: MUTACIONES DE ESCAPE INMUNE Y MUTACIONES DE RESISTENCIA A FÁRMACOS ANTIRRETROVIRALES

Los antecedentes descritos ponen de manifiesto que el virus, una vez que se inicia con un esquema de tratamiento, está sujeto a múltiples presiones selectivas que permiten la selección de mutaciones dirigiendo su evolución y adaptación en el hospedero. La presión selectiva mediada por HLA-I funciona como una presión selectiva natural y constante y los fármacos antirretrovirales, en este caso IPs, como una presión selectiva artificial. El efecto de estas dos fuertes presiones sobre el virus, se ha constituido como un foco importante de investigación que busca describir la evolución viral en busca de mejores candidatos terapéuticos y e inmunógenos para su control en el hospedero [55, 63, 92-95].

El estudio de la posible interacción entre estas dos presiones selectivas, dirige la mirada a la búsqueda de puntos en el genoma donde la presión selectiva inmune y farmacológica confluyan e interaccionen. Es factible que una mutación de resistencia se encuentre dentro de un péptido de reconocimiento para cierto alelo HLA, y con ello, inflencie su antigenicidad. Así, se pueden plantear dos escenarios: que la mutación de resistencia funcione también como mutación de escape inmunológico confiriéndole doble ventaja al virus, o bien, que aumente la antigenicidad del péptido haciéndolo mejor blanco de la respuesta inmune. En este caso, si el virus muta, quedará acorralado entre dos presiones selectivas opuestas. De igual manera, la selección de mutaciones mediadas por HLA-I puede tener un impacto directo en la susceptibilidad al tratamiento antirretroviral. Dado que las mutaciones impactan directamente en la replicación, ensayos que permitan estimar la capacidad replicativa viral ofrecen una oportunidad única para entender la evolución del virus bajo múltiples presiones selectivas en cierto contexto inmunogenético. Más aún, se ha observado que la capacidad replicativa de un virus que se transmite tiene influencia directa en la progresión de la enfermedad. Un virus cuya capacidad replicativa sea alta, establece una infección aguda más severa, con un estado de inflamación mayor que impacta directamente en la progresión y establecimiento de reservorio viral [55, 68] [55, 63, 92-96].

CAPÍTULO II. ANTECEDENTES.

El VIH es un retrovirus que establece una infección crónica y persistente en el humano. Una vez que se establece en el hospedero, el VIH es blanco del control inmune donde la respuesta citotóxica mediada por linfocitos T CD8+, CTLs, es la de mayor relevancia en el control de la viremia [34, 24, 53, 54]. Para que esta respuesta citotóxica se produzca, las células infectadas generan péptidos virales, algunos de los cuales, serán presentados en el surco de las moléculas HLA de clase I para su reconocimiento. Dicho reconocimiento, deriva en la lisis celular por la liberación de granzimas y perforinas [59, 61]. El control mediado por HLA-I se constituye como una fuerte presión evolutiva sobre el virus, con la selección de mutaciones de escape inmune que evitan la unión del péptido viral a la molécula HLA, impiden el procesamiento de los péptidos virales, o evitan el reconocimiento del complejo HLA-péptido por los CTL. La presión selectiva dependiente de HLA es crucial para la evolución del virus a nivel global, dado el alto grado de polimorfismo de las moléculas HLA y la distribución geográfica heterogénea de los alelos específicos. Así, la evolución asociada a HLA del VIH dependerá fuertemente del contexto inmunogenético de la población afectada [25, 57, 61-63] [60] [12, 57, 68]. La selección de mutaciones de escape tiene efecto directo en la capacidad de replicación, en especial mutaciones seleccionadas en el gen *gag* debido a su importancia funcional y estructural. De igual manera, la selección gradual de mutaciones adicionales en el genoma, que compensan la pérdida en capacidad replicativa es un fenómeno de suma importancia para el control de la viremia [60, 61].

Por otro lado, el desarrollo de la terapia antirretroviral, TAR, trajo consigo una mejora en la calidad de vida y disminución en la tasa de transmisión. Sin embargo, efecto de control sobre la viremia, el TAR es una presión selectiva adicional que también dirige la evolución viral [23]. Los Inhibidores de proteasa, IPs, tienen como blanco la proteasa viral impidiendo la maduración de los viriones. En casos de mala adherencia o concentración subóptima del TAR, es común la selección de mutaciones de resistencia que le permiten al virus replicar en presencia del fármaco [42, 44, 69, 73, 94]. Las mutaciones mayores de resistencia son las que confieren el mayor grado de escape, pero conllevan un alto costo en la capacidad

de replicación dado que los cambios se encuentran en el sitio de unión al sustrato de la enzima. Sin embargo, la selección de mutaciones secundarias que se da de manera gradual, compensa las fallas replicativas y contribuye al fenotipo resistente [44, 50]. A medida que se profundizó en el estudio de la resistencia a IPs, se conoce que existe una co-evolución entre una proteasa resistente y el sustrato polipéptico Pr55^{gag}. Se han identificado mutaciones a lo largo de todo el gen *gag*, mayoritariamente hacia la porción final p2p7p1p6 y en especial en los motivos de corte de la proteasa, asociadas al uso de IPs. Estas mutaciones en el sustrato son capaces de conferir resistencia y compensar pérdidas en capacidad replicativa, mejorando la afinidad por el sustrato [50, 84, 86, 90]. Una de las mutaciones más caracterizadas es la A431V localizada en el motivo de corte p7/p1, mutación compensatoria y de resistencia a IPs, algunos otros ejemplos son las mutaciones V128T, K436E/R, I437T/V, L449T/P/V, R452S/K, P453A/L/T [50, 69, 97]

En el presente trabajo se buscó contribuir al conocimiento de la complejidad y dinamismo de la evolución del VIH en un contexto de múltiples presiones selectivas enfocadas en la región *gag-proteasa*. A partir de muestras de plasma de una cohorte de individuos mexicanos infectados por VIH que desarrollaron resistencia a IPs, después de exposición a esquemas de TAR incluyendo esta familia de fármacos, se secuenció la región *gag-proteasa* del VIH y se realizó una búsqueda de posibles interacciones entre la presión selectiva farmacológica y la presión selectiva inmune asociada a HLA. Así mismo, se construyeron virus recombinantes expresando la región *gag-proteasa* de cada individuo con el fin de medir el impacto de mutaciones seleccionadas tanto por fármacos antirretrovirales como por respuestas restringidas por HLA en la capacidad replicativa relativa. Las interacciones entre estas presiones selectivas podrían favorecer doblemente al virus confiriéndole tanto escape al sistema inmunológico, como resistencia al tratamiento antirretroviral. Alternativamente, la presión mediada por HLA-I puede tener una influencia directa en la susceptibilidad del virus al tratamiento antirretroviral, limitando su variabilidad. El estudio de estas interacciones entre presiones selectivas es relevante para el diseño de inmunógenos, así como para la optimización de los esquemas de tratamiento con de manera individualizada, considerando la identidad de los alelos HLA presentes. Los ensayos de CR y el

análisis de las secuencias *gag-proteasa* son una buena herramienta para entender la co-evolución de estos genes en virus expuestos a IPs en un contexto inmunogénético particular [68] [98-101]. Empleando como referencia una cohorte de individuos mexicanos infectados por VIH, vírgenes a TAR, cuyo contexto inmunogénético es similar al de la cohorte del presente estudio, se identificaron mutaciones de resistencia a IPs tanto en *proteasa* como en *gag*, se analizó la variabilidad de los motivos de corte en *gag*, se identificaron posiciones en *gag* que tienden a la variación del aminoácido presente y que son reflejo de presión selectiva, se asoció la presencia de mutaciones de escape con la presencia de alelos HLA específicos y se evaluó el impacto de la presencia de mutaciones de escape inmune o resistencia a fármacos en la capacidad replicativa viral.

CAPITULO III. HIPÓTESIS

Dado que la región genómica *gag-pro* del VIH se encuentra bajo múltiples presiones selectivas, en particular aquellas restringidas por HLA-I y por el tratamiento antirretroviral, será posible encontrar sitios de confluencia entre dichas presiones selectivas.

Las interacciones entre presión selectiva inmune y farmacológica podrán asociarse al contexto inmunogenético de la cohorte y se verán reflejadas en la capacidad replicativa del virus.

Existirán casos en los cuales la presencia de una mutación de resistencia a fármacos incrementa la inmunogenicidad de un epítipo para respuestas restringidas por HLA específicos, lo cual evidenciará un posible acorralamiento viral.

Existirán casos en los cuales una mutación de resistencia a fármacos también funcione como mutación de escape inmune, dando una doble ventaja selectiva al virus.

Si las mutaciones seleccionadas por alguna de las dos presiones selectivas impactan la capacidad replicativa, esto tendría consecuencias en la transmisión. Una capacidad replicativa elevada estará asociada a una mayor frecuencia de transmisión, prevalencia en la población y progresión de la enfermedad.

CAPÍTULO IV. OBJETIVOS

Objetivo general.

Estudiar y caracterizar interacciones entre la presión selectiva inmunológica mediada por HLA-I y por el tratamiento antirretroviral en la región *gag-proteasa* del VIH-1.

Evaluar el impacto de mutaciones seleccionadas por presión selectiva farmacológica e inmunológica en la región *gag-pro* del VIH, en la capacidad replicativa viral.

Objetivos particulares.

- Extraer el RNA viral de plasma de individuos infectados por VIH-1 y que presentan falla virológica por la presencia de mutaciones de resistencia a IPs.
- Amplificar mediante PCR anidada la proteasa viral y el gen *gag* a partir del RNA extraído de cada individuo.
- Secuenciar *gag* y la proteasa viral para la genotipificación de las mutaciones de resistencia a IPs.
- Describir y determinar la frecuencia de todas las mutaciones de resistencia asociadas al uso de IPs en la región *gag-proteasa*.
- Generar una base de secuencias alineadas tanto para *gag* como para la proteasa viral de la cohorte de estudio.
- Establecer las relaciones filogenéticas de las secuencias en estudio.
- Construir quimeras virales por recombinación de la región *gag-pro* en un vector plasmídico pNL43Δ*gag-pro* en una línea celular permisiva a la infección por VIH, GXR.
- Propagar las quimeras virales por infección de GXR y dar seguimiento a la propagación por citometría de flujo a través de la expresión de la proteína verde fluorescente, GFP.

- Realizar controles de calidad por filogenia y secuenciación comparando las secuencias de las quimeras con aquéllas de la población viral extraída del plasma de cada individuo.
- Realizar ensayos de capacidad replicativa por infección de GXR y monitoreado por citometría de flujo.
- Determinar la capacidad replicativa, CR, de cada quimera relativa a un virus de referencia acoplado también a un vector plasmídico, pNL43.
- Generar una base de datos de CR de la cohorte expuesta a IPs y compararla con la CR de una cohorte vírgen a tratamiento.
- Extraer el DNA a partir de plasma de cada individuo y amplificar los genes HLA-A, HLA-B y HLA-C por PCR anidada.
- Secuenciar cada alelo HLA-I y obtener la tipificación por el software U-type
- Estudiar el impacto de todas las mutaciones identificadas en *gag-proteasa* asociadas al uso de IPs sobre la capacidad replicativa viral
- Analizar la variabilidad de los motivos de corte en el sustrato *gag*, compararla con la de una cohorte de individuos vírgenes a TAR, y estudiar su impacto en la capacidad replicativa viral.
- Realizar un análisis evolutivo del gen *gag* en busca de posiciones bajo presión selectiva por el método de razón de sustituciones sinónimas y no sinónimas en cada codón dentro del alineamiento de secuencias.
- Analizar el impacto sobre la capacidad replicativa, de las mutaciones en *gag* que tienden a la variación y se encuentran bajo presión selectiva.
- Analizar la presencia de alelos HLA-I y su efecto sobre la capacidad replicativa.
- Establecer posibles asociaciones-interacciones entre la presión selectiva mediada por HLA-I y las mutaciones seleccionadas por el uso de IPs y su impacto en la capacidad replicativa.

CAPÍTULO V. METODOLOGÍA.

5.1 Selección de pacientes

Se utilizó plasma sanguíneo de individuos infectados por VIH-1 y con falla virológica al tratamiento antirretroviral. Las muestras se seleccionaron del banco de muestras del Laboratorio de Diagnóstico Viroológico, LDV, del Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas, CIENI, del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, INER. Se hizo una consulta del banco de muestras desde 2008 y hasta 2014. La falla al tratamiento antirretroviral se consideró por carga viral detectable y la presencia de mutaciones de resistencia a Inhibidores de Proteasa en el gen *pol* viral que codifica, entre otras enzimas, a la proteasa viral.

Las mutaciones de resistencia a Inhibidores de Proteasa, IPs fueron previamente identificadas en el LDV por pruebas de genotipificación-secuenciación del gen *pol*, de tal manera que la genotipificación, en conjunto con la existencia de una cantidad de plasma suficiente para completar la metodología, fueron considerados como criterios de inclusión en el estudio. Se obtuvo un total de 103 muestras.

Para cada muestra se extrajo el RNA viral, se amplificaron y secuenciaron los genes *gag* y *proteasa viral* y se construyeron virus quiméricos con la región *gag-proteasa* de cada muestra para ensayos de capacidad replicativa viral, ECR. Para la proteasa además, se repitió y comparó la genotipificación de las mutaciones de resistencia a IPs para asegurar su inclusión en el estudio. El presente trabajo fue evaluado y aceptado por el Comité de Ciencia y Bioética del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, INER.

5.2 Extracción de RNA

Se extrajo el RNA viral de plasma para cada muestra utilizando el kit QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Valencia C.A). La extracción se logró por unión selectiva del ácido nucleico a una membrana de sílice-gel dispuesta en una columna. La centrifugación del plasma a altas velocidades 15-17000 rpm por 2 horas, concentra las partículas virales en un pellet que se lisa bajo condiciones desnaturalizantes con base e ntiocianato de guanidina; el lisado se unió a la membrana de sílice y el RNA unido a la membrana se estabilizó y lavó con buffers

de alta fuerza iónica. Finalmente, el RNA viral se eluyó con un buffer libre de RNAsas y de baja fuerza iónica.

5.3 Amplificación de la proteasa viral

Se amplificó la región proteasa-retrotranscriptasa del gen *pol* viral de aproximadamente 1400 pb. Se llevaron a cabo dos rondas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la primera por transcripción inversa acoplada a PCR y una segunda reacción específica para la obtención de DNA en cantidades suficientes y medibles. Para ambas rondas se utilizó un termociclador Veriti 96 well Thermal Cycler (Life Technologies, Carlsbad, CA).

Para la primera amplificación y retrotranscripción, se utilizó la enzima SuperScript® III One-Step RT-PCR Platinum® Taq High Fidelity (Invitrogen, Carlsbad, CA), con el siguiente par de primers: primer “forward” **PR 5’ OUTER** (Posición en HXB2, 2009-2031) y primer “reverse” **RT 3’ OUTER** (3576-3603) de acuerdo a la siguiente mezcla de reacción y programa de amplificación.

Componente	Volumen por muestra
dH ₂ O	3 µL
Buffer 2x	12.5 µL
Primer “forward” PR 5’ OUTER (20 pmol/µL)	0.5 µL
Primer “reverse” RT 3’ OUTER (20 pmol/µL)	0.5 µL
RT-Taq platinum polimerasa	0.5 µL
RNA viral	5 µL
Volumen final	25 µL

Programa de amplificación: 1 ciclo de 30 min a 50°C y 3 min a 94°C, 35 ciclos de 30s a 94°C, 30s a 60°C y 2 min a 72°C, finalmente 1 ciclo de 5 min a 72°C.

Para la segunda ronda de amplificación se utilizó la enzima Platinum® Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA), y los primers “forward” **PR 5’ INNER** (2057-2081) y “reverse” **RT 3’ INNER** (3559-3485) de acuerdo a la siguiente mezcla de reacción y programa de amplificación.

Componente	Volumen por muestra
dH ₂ O	13.75µL
Buffer 10x	2.5µL
MgCl 50 mM	1µL
dNTP's mix (1.25mM)	4µL
Primer "forward" PR 5' INNER (20 pmol/µL)	0.5µL
Primer "reverse" RT 3' INNER (20 pmol/µL)	0.5µL
Taq platinum DNA polimerasa	0.25µL
DNA primera ronda	2.5µL
Volumen final	25µL

Programa de amplificación: 1 ciclo de 94°C por 3min, 35 ciclos de 30s a 94°C, 30s a 60°C y 2 min a 72°C, finalmente 1 ciclo de 5min a 72°C.

5.4 Amplificación del gen *gag-pro*

Se amplificó la región *gag-pro* viral de aproximadamente 1500 pb por dos rondas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR anidada), la primera por transcripción inversa acoplada a PCR. Para ambas rondas se utilizó un termociclador Veriti 96 well Thermal Cycler (Life Technologies, Carlsbad, CA).

La primera amplificación también utilizó la enzima SuperScript® III One-Step RT-PCR Platinum® Taq High Fidelity (Invitrogen, Carlsbad, CA), seguida de la amplificación de la región de interés en un solo paso. Se utilizó el siguiente par de primers: primer "forward" **623Fi** (623-634) y "reverse" **2cRx** (2849-2826) de acuerdo a la siguiente mezcla de reacción y programa de amplificación.

Componente	Volumen por muestra
dH ₂ O	8.5 µL
Buffer 2x	12.5 µL
Primer "forward" 623Fi (20 pmol/µL)	0.5 µL
Primer "reverse" 2cRx (20 pmol/µL)	0.5 µL

RT-Taq platinum polimerasa	0.5 µL
RNA viral	2.5 µL
Volumen final	25 µL

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

Para la segunda ronda de amplificación se utilizó la enzima Platinum® Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA), y los primers “forward” **G1** (691-710) y “reverse” **G10** (2343-2325) de acuerdo a la siguiente mezcla de reacción y programa de amplificación.

Componente	Volumen por muestra
dH ₂ O	16.25µL
Buffer 10x	2.5µL
MgCl ₂ 50 mM	1µL
dNTP's mix 1.25 mM	4µL
Primer “forward” G1 (20 pmol/µL)	1µL
Primer “reverse” G10 (20 pmol/µL)	1µL
Taq platinum DNA polimerasa	0.25µL
DNA primera ronda	2.5µL
Volumen final	25µL

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

5.5 Verificación de amplicones *proteasa* y *gag* por electroforesis en gel de agarosa al 1%

Para la visualización y comprobación de los amplicones de aproximadamente 1500 pb y 1400 pb para *gag-pro* y *pol* respectivamente, se realizó un gel de agarosa al 1%. Se utilizó el marcador de peso molecular ϕ x 174 RF DNA/*Hae* III Fragments (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se incluyó en todos los casos un control negativo en cuyo pozo no debe observarse banda.

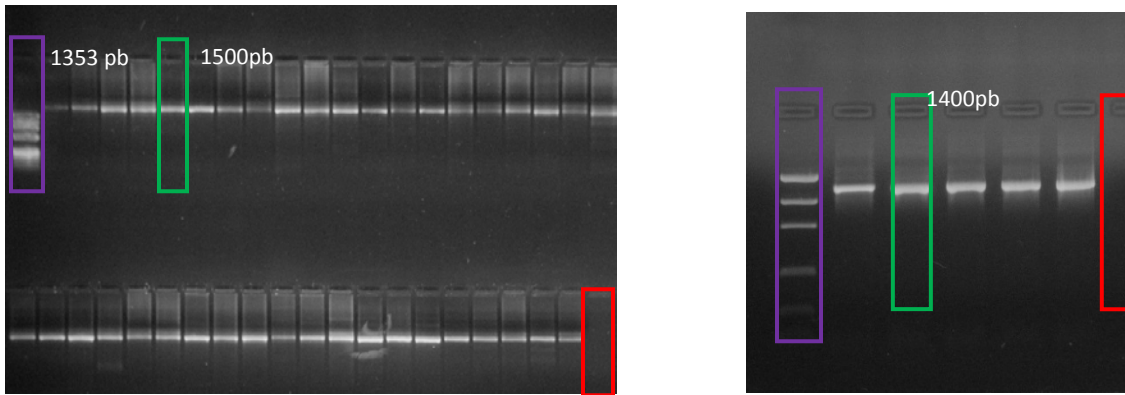


Figura 5.1. Foto de gel de agarosa al 1% para la confirmación de amplicones *gag-pro* (izquierda) y *pol* (derecha). En recuadro morado se muestra el patrón de bandas del marcador de peso molecular, el recuadro verde muestra el ejemplo de banda para una de las muestras de acuerdo al peso correspondiente. El recuadro rojo muestra el pozo de control negativo. Se utilizó Gel Red (Gel Red™) como agente intercalante de DNA.

En caso de no amplificación se probó con el doble de volumen de RNA para la primera ronda de PCR, disminuyendo el volumen correspondiente de agua. Con un segundo resultado negativo, se probó con una nueva extracción de RNA.

5.6 Purificación de productos de amplificación

Posterior a la comprobación en gel de agarosa para ambos genes, se purificaron utilizando el kit de purificación QIAquick® PCR Purification Kit (QIAGEN, Valencia, CA). La purificación se llevó a cabo por unión selectiva del DNA a una membrana de sílica dispuesta en una columna bajo presencia de una alta concentración de sales y pH < 7.5. Las impurezas se eliminaron por lavados con buffers de alta fuerza iónica y el DNA purificado se eluyó por buffer de baja fuerza iónica y pH básico.

5.7 Cuantificación de productos de amplificación

Para una eficiente reacción de secuencia se cuantificó cada amplicón para asegurar un rango de concentración de entre 10-40 ng/μL. Los amplicones *gag-pro* y *pol* se cuantificaron utilizando un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE). La pureza del DNA purificado fue evaluada en el software por la relación entre ácidos nucleicos/proteínas (absorbancia 260/280), siempre considerando valores mayores a 1.8.

5.8 Secuenciación de proteasa y gag

Una vez purificado y cuantificado cada producto de PCR se llevó a cabo la reacción de secuenciación. Para ambos genes se hizo una dilución apropiada para asegurar el rango de concentración 10-40 ng/μL y se acopló el sistema a placas de 96 pozos compatibles con termocicladores Veriti 96 well Thermal Cycler (Life Technologies, Carlsbad, CA). Se utilizó el método de Sanger que utiliza di deoxinucleótidos (ddNTPs), estos nucleótidos modificados carecen del grupo OH 3' libre y están marcados por fluorescencia de acuerdo a la base correspondiente (Adenina, Timina, Guanina y Citocina). Al incorporarse en la reacción de secuencia, funcionan como terminadores de cadena que posteriormente son separados por electroforesis capilar. Para la reacción de secuencia se empleó el reactivo Big Dye Terminator v.3.1 cycle-sequencing (Life Technologies, Carlsbad, CA) que incluye a los ddNTPs marcados con fluorocromos. La PCR de secuencia se realizó en un termociclador Veriti 96 well Thermal Cycler (Life Technologies, Carlsbad, CA).

5.8.1 Secuenciación de la *proteasa viral*.

Se realizaron siete reacciones individuales utilizando siete primers distintos que aseguran cubrir la región proteasa-retrotranscriptasa del gen *pol* en ambos sentidos (3'→5' y 5'→3'). Cuatro primers "forward" **POL_A** (2164-2188), **POL_B** (2610-2634), **POL_C** (3007-3031) **POL_D** (2252-2275); Tres primers "reverse" **POL_F** (2610-2586) **POL_G** (3008-2985) **POL_H** (3550-3526).

5.8.2 Secuenciación de *gag-pro*.

Se realizaron ocho reacciones individuales utilizando ocho primers distintos que aseguran cubrir la región *gag-pro* en ambos sentidos (3'→5' y 5'→3'). Cuatro primers "forward" **G2** (734-750), **GAS3** (1401-1420), **GAS5** (1697-1716), **HPR1977** (1957-1976); Cuatro primers "reverse" **GS1** (1097-1074), **GAS4** (1481-1462), **GAS6** (1790-1771), **GA2274R** (2295-2274).

Para ambos genes se preparó la siguiente mezcla de reacción y programa de amplificación.

Componente	Volumen por muestra
dH ₂ O	3.5µL
Buffer 5x	2µL
BigDye v3.1	0.5µL
Primer's (2pmol/µL)	2µL
Dilución de DNA (10-40ng totales)	2µL
Volumen final	10µL

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

Concluida la reacción de amplificación, la placa se purificó utilizando acetato de sodio 3 M (adición de 1 µL por pozo de reacción) y etanol al 100% (50 µL por pozo) para la precipitación de DNA. Se mezcló con vórtex y se centrifugó por 20 min a 2000 rpm. Se quitó el excedente de etanol por centrifugación de la placa invertida en papel absorbente a 150 rpm por un minuto. Se adicionó 150 µL de etanol al 70% para la eliminación de impurezas con una centrifugación de 5min a 2000rpm. Se realizaron como mínimo dos pasos de centrifugación para la eliminación de etanol con placa invertida en papel absorbente a una velocidad de 500 rpm por 2 minutos. Posterior a 15 minutos de secado a temperatura ambiente, el precipitado se resuspendió en 10 µL de formamida con una centrifugación final de 150rpm durante 1 min para eliminar todos los excedentes adheridos a la pared del pozo. Finalmente la placa se desnaturalizó a 95°C por 2 minutos con choque térmico en hielo por 2 minutos.

Los productos de reacción de secuencia se separaron por electroforesis capilar en el equipo ABI Prism 3730xl DNA Genetic Analyzer (Life Technologies, Carlsbad, CA). La preparación de la placa para su análisis, así como la revisión del electroferograma se realizó con el software Sequencing Analysis v5.4 (Life Technologies, Carlsbad, CA). El ensamblado de los primer's para cada generar la secuencia consensu de cada muestra, se realizó con dos softwares distintos dependiendo del gen a analizar:

- Proteasa viral: Se utilizó el sistema de genotipificación de Viroseq Version 2.8 Build 8, 2008 de Celera. El sistema permite la detección de mutaciones en proteasa y retrotranscriptasa que confieren resistencia a antirretrovirales cuyo blanco de acción sea alguna de estas enzimas virales. El software permite además, la revisión y edición manual de cada primer ensamblado para obtener la secuencia consenso de cada muestra.
- **NOTA.** Los primers están diseñados para cubrir la región proteasa-retrotranscriptasa del gen *pol*, sin embargo, las secuencias fueron cortadas para incluir solamente las secuencias de proteasa.
- *Gag-pro*. Se hizo revisión y edición manual de las secuencias ensambladas utilizando el software Geneious 5.6.4. Al igual que con la proteasa viral, se obtuvo una secuencia consenso del gen *gag* para cada paciente.

Las secuencias generadas para ambos genes se archivaron en formato FASTA para análisis subsecuentes.

5.9 Análisis de las secuencias *proteasa* y *gag*

5.9.1 Comprobación de mutaciones de resistencia a Inhibidores de Proteasa en la proteasa viral

Con las secuencias consenso de la proteasa viral, se generó el reporte de resistencia a IPs utilizando el sistema Viroseq. Esta genotipificación, se comparó con la previa realizada por el Laboratorio de Diagnóstico Viroológico, LDV del CIENI. Como se mencionó en la sección 5.1, se incluyeron las muestras cuyo resultado correspondiera a la previa genotipificación. En caso de genotipos discordantes, se hizo un análisis detallado de las secuencias y se incluyeron aquellas que resultaron más limpias y con menor grado de edición.

5.9.2 Alineamiento de secuencias *proteasa* y *gag*

De manera independiente, las secuencias consenso de *gag* y proteasa, en formato FASTA, se importaron y alinearon con el programa MEGA 6.2 (Análisis Molecular de Genética Evolutiva). El programa utiliza la herramienta Clustal W para el alineamiento múltiple de secuencias. Una vez obtenido el primer alineamiento, se

editó de forma manual, en conjunto con una secuencia de referencia VIH-HXB2 y una secuencia de VIH subtipo B, obtenidas de la base de datos de VIH de Los Álamos [34]. Se consideraron en cada secuencia las inserciones y/o deleciones para lograr el mejor alineamiento. Se utilizó la secuencia de HXB2 como referencia para la numeración de las proteínas tanto de la proteasa como de las proteínas de Gag.

5.9.3 Análisis filogenéticos

Se construyó un árbol filogenético para las secuencias *gag* y proteasa de todos los individuos en estudio a partir del fragmento de una longitud aproximada de 1500 pb del gen *gag* y 300pb para proteasa. Se utilizó el programa MEGA 6.2 con el método de Maximum Likelihood, calculando las distancias evolutivas con el modelo General Time Reversible Model que considera la posibilidad de reversión de mutaciones en el modelo. La significancia del árbol se probó mediante 1000 réplicas de bootstrap. Se incluyó la secuencia de referencia HXB2 subtipo B del VIH-1 [34].

5.9.4 Análisis evolutivo de las secuencias *gag*

Se buscaron posiciones dentro de *gag* que tuvieran evidencia de estar sujetas a presiones selectivas positivas y reflejaran la evolución del virus en esta parte del genoma. La búsqueda se hizo utilizando un modelo evolutivo de codones basado en razones de sustituciones sinónimas (dS) y no sinónimas (dN) de aminoácidos, disponible a través del servidor en línea DataMonkey (www.datamonkey.org). El modelo utiliza al análisis SLAC (Single-Likelihood Ancestor Counting). Este análisis estima valores de:

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

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

Si $dN > dS$ (razón de sustituciones no sinónimas mayor a la razón de sustituciones sinónimas) se concluye que la posición se encuentra bajo selección positiva y es un sitio que tiende a la variación. Si $dN < dS$ se dice que la posición se encuentra bajo presión selectiva negativa o que tiende a la conservación y a que la razón de sustituciones sinónimas es mayor. Los valores se consideraron estadísticamente significativos con un valor de $p < 0.01$.

5.10 Ensayo de capacidad replicativa viral

El Ensayo de Capacidad Replicativa Viral se basa en la construcción de virus quiméricos/recombinantes a partir de la amplificación de una región única de interés, en este caso *gag-pro*, de virus circulantes de individuos infectados. El amplicón se inserta en un vector viral NL4-3 plasmídico carente de la región de interés: pNL4-3 Δ *gag-pro*. Los virus producidos se propagan en una línea celular linfocitaria inmortalizada que contiene un gen reportero para la infección, y puede ser monitoreado por citometría de flujo. La metodología se describe a continuación.

5.10.1 Construcción de virus quiméricos

5.10.1.1 Preparación de plásmidos pNL4-3 y pNL4-3 Δ *gag-pro*

Se utilizó un vector plasmídico pNL4-3 Δ *gag-pro* para la generación de virus quiméricos de cada muestra incluida en el estudio. El plásmido contiene la secuencia de referencia NL4-3 del VIH-1 a la cual le ha sido deletada la región *gag-pro* proteasa. La región se reemplazó con dos sitios de restricción para la enzima BstE II y se transformó y cultivó en bacterias *E. coli* competentes, STBL3 que carecen de recombinasas y originan menor variabilidad. El plásmido contiene marcadores de resistencia a ampicilina.

El vector plasmídico pNL4-3 se utilizó como control positivo en los ensayos de capacidad replicativa y a que contiene el genoma viral completo, comparte las mismas características que el pNL4-3 Δ *gag-pro* y de igual manera, se transformó y cultivó en bacterias *E. coli* competentes, STBL3.

Para la producción de virus quiméricos y ensayos de capacidad replicativa es necesaria la purificación del plásmido posterior al cultivo de bacterias en medio Luria Bertani, LB. El cultivo se realizó de la siguiente manera:

- Cultivo 1. Día 1. Se tomó un inóculo de bacterias transformadas a partir del stock en glicerol a -80°C y se inoculó en 5 mL de medio LB y 5 μL de ampicilina. El cultivo se mantuvo en agitación por 8 horas a 37°C y 300rpm.
- Cultivo 2. Día 2. Previamente se esterilizó y almacenó a 4°C 500mL de medio LB. Una hora previa al cultivo 2, se hicieron alícuotas de 100mL de medio LB con 100 μL de ampicilina en matraces también previamente esterilizados. Transcurridas las ocho horas de cultivo y en campana de flujo laminar, se adicionaron 500 μL del cultivo 1 a cada matraz. El cultivo se mantuvo en agitación por 16 horas a 37°C y 300rpm logrando una concentración aproximada de $3-4 \times 10^9$ cells/ml.

La purificación de los plásmidos a partir del cultivo de 16 horas se realizó con el kit QIAGEN® Plasmid Purification (QIAGEN, Valencia C.A.) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La purificación se logró por lisis alcalina de las bacterias seguida de la unión selectiva del plásmido a una resina dispuesta en columna que opera por fuerza de gravedad. La unión se favoreció en condiciones de baja concentración de sales y pH adecuado. Contaminantes como RNA, proteínas e impurezas de bajo peso molecular fueron removidas por lavados a base de sales. El plásmido se eluyó a altas concentraciones de sales para finalmente concentrarlo y desalarlo por precipitación en isopropanol.

Una vez purificados los plásmidos, se midió su concentración por NanoDrop® ND-1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE) y se evaluó la integridad del plásmido por digestión con la enzima de restricción HindIII de New England, BioLabs de acuerdo a las instrucciones del inserto. El motivo de DNA que reconoce la enzima se especifica a continuación:



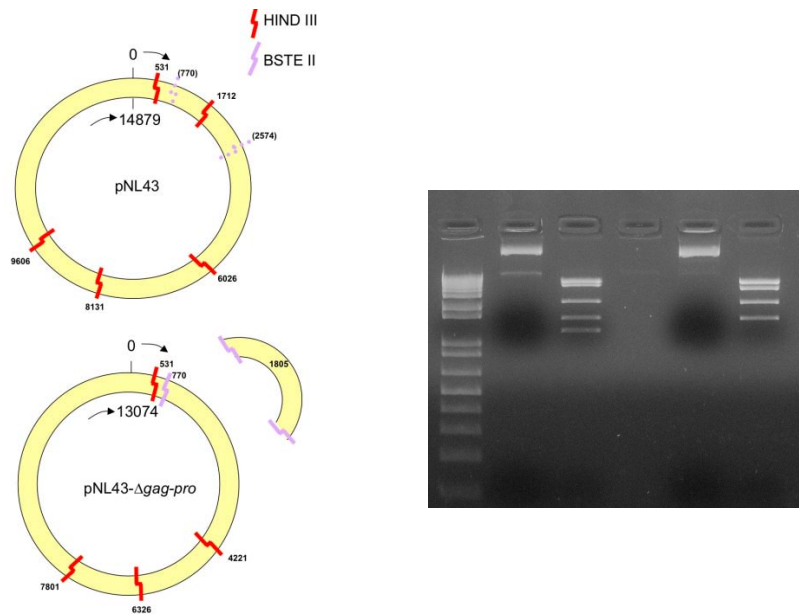


Figura 5.2. Izquierda. Esquema que muestra el tamaño de los plásmidos pNL4-3 y pNL4-3Δ Gag-pro así como los sitios de restricción para HindIII y BstEII. Derecha. Imagen de un gel de agarosa al 1% que muestra la digestión por HindIII de pNL4-3 y pNL4-3Δ Gag-pro. De izquierda a derecha, el segundo pozo muestra el plásmido pNL4-3 sin digerir, tercer pozo pNL4-3 digerido mostrando un patrón de cinco bandas de distinto peso molecular. Quinto pozo pNL4-3Δ Gag-pro sin digerir, y sexto pozo pNL4-3Δ Gag-pro con un patrón de cuatro bandas de distinto peso molecular.

5.10.1.2 Amplificación de la región gag-proteasa

Para la amplificación de la región *gag-proteasa* se utilizaron primer's largos que favorecen la recombinación con el plásmido pNL4-3Δ *gag-pro*. Primer "forward"

Gagpro chimeric recomb_F_toshi

(5'GACTCGGCTTGCTGAAGCGCGCACGGCAAGAGGCGAGGGGCGGCGACTGGTGAG TACGCCAAAATTTTGACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGAGAGATGGG-3') y primer

"reverse" **GagPro chimericrecomb_R_new**

(5'GGCCCAATTTTTGAAATTTTTCTTCCTTTTCCATTTCTGTACAAATTTCTACTAATGC TTTTATTTTTTCTTCTGTCAATGGCCATTGTTTAACTTTTG-3'). Se hizo una PCR

anidada utilizando el producto de amplificación de la primera ronda descrita en la Sección. 5.4 Amplificación del gen *gag-pro*. y la enzima The Expand™ High Fidelity Taq polymerase, Roche.

Componente	Volumen por muestra
dH ₂ O	38.5µL
Buffer 10x HF	5µL
MgSO ₄ 50 mM	2µL
dNTP's mix 10 mM	1µL
Primer "forward" recombinante (20 pmol/µL)	0.5µL
Primer "reverse" recombinante (20 pmol/µL)	0.5µL
Taq platinum HF DNA polimerasa	0.5µL
DNA primera ronda	2.5µL
Volumen final	50µL

Programa de amplificación: 1 ciclo de 94°C por 2min, 40 ciclos de 30s a 94°C, 30s a 60°C y 2 min a 68°C, finalmente 1 ciclo de 7min a 68°C.

El producto de PCR se corrió en gel de agarosa al 1% y fue purificado con el kit QIAquick® PCR Purification Kit (QIAGEN, Valencia, CA) como se describió en la Sección 5.6 Purificación de productos de amplificación

5.10.1.3 Linearización del plásmido pNL4-3Δ *gag-pro*.

Para que el plásmido pueda recombinarse con la región *gag-pro* amplificada de cada paciente y sea más eficiente el proceso de replicación, se linearizó por restricción con la enzima BstI (New England Biolabs), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El motivo de DNA que reconoce la enzima se especifica a continuación:



Para conocer el volumen de enzima necesario para la restricción se consideró lo siguiente:

- El número de muestras a incluir para la generación de virus quiméricos.
- Se requieren 10 µg de plásmido linearizado por muestra.
- La concentración del plásmido pNL4-3Δ *gag-pro* purificado por Maxi-Prep.
- Dos unidades de BstI son necesarias para digerir 1 µg de plásmido.
- 1 µL de enzima contiene 10 unidades.

Eg. Para la generación de 20 virus quiméricos con una concentración de plásmido pNL4-3Δ gag-pro de 500ng/μL

$$20 \text{muestras} \times \frac{10 \mu\text{g de pNL4-3}\Delta \text{ Gag-prot}}{1 \text{ muestra}} \times \frac{1 \mu\text{L plásmido purificado}}{0.500 \mu\text{g de pNL4-3}\Delta \text{ Gag-prot}} \times \frac{2 \text{ unidades } Bst\text{eII}}{1 \mu\text{g de pNL4-3}\Delta \text{ Gag-prot}} \times \frac{1 \mu\text{L de enzima}}{10 \text{u } Bst\text{eII}}$$

De acuerdo al cálculo anterior se requerirían 80 μL de enzima para la digestión del plásmido pNL4-3Δ gag-pro por una hora a 60°C de acuerdo al inserto.

5.10.1.4 Co-transfección del plásmido y amplicones *gag-pro* por electroporación en línea celular GXR

Los virus quiméricos/recombinantes fueron generados por co-transfección del plásmido pNL4-3Δ *gag-pro* linearizado en conjunto con el producto de PCR *gag-pro* de cada muestra. La co-transfección se llevó a cabo por electroporación en la línea celular GXR en el laboratorio de Bioseguridad Nivel 3 del CIENI. Las células GXR son una línea celular infectada y inmortalizada, que expresa en su superficie el receptor CD4 y los correceptores CXCR5 y CXCR4 para la infección por VIH-1. Estas células contienen además un gen reportero dependiente de la expresión de la proteína viral Tat que se encuentra acoplado a un LTR retroviral. El gen reportero corresponde a la proteína verde fluorescente, GFP, cuya expresión permitió hacer el seguimiento de la producción de virus quiméricos por citometría de flujo.

5.10.1.5 Preparación de células GXR

La línea celular se mantuvo en medio R10 (RPMI con 10% suero fetal bovino, 1% penicilina-streptomocina, 1% L-glutamina) a 37°C, 0.5 % CO₂ y 85 % de humedad. Para producción de virus quiméricos y ensayos de capacidad replicativa se mantuvo una concentración de 1x10⁶ células/mL de medio que mostró ser efectiva para el crecimiento de las células en cantidades suficientes. Para su conteo, se tomó un volumen adecuado de medio y posterior a su centrifugación a 1500 rpm por 10 min, se contaron en microscopio utilizando azul tripano como colorante vital.

5.10.1.6 Co-transfección de GXR por electroporación

Se utilizó el sistema de electroporación de BIO-RAD, Gene Pulser X cell™ Electroporation System que emplea choques eléctricos para permeabilizar la membrana celular y permitir la entrada de DNA externo. Se utilizaron cubetas de

0.2 cm (Gene Pulser/MicroPulser Electroporation Cuvettes, BIORAD), compatibles con el sistema de electroporación.

Para la co-transfección se consideró:

- De acuerdo al volumen total de digestión en la sección 5.10.1.3, se tomó la alícuota necesaria para la adición de 10 µg de plásmido pNL4-3Δ *gag-pro* por muestra.
- Los 50 µL del producto de PCR *gag-pro* purificado de cada muestra.
- Se electroporaron 2×10^6 células GXR por muestra.

Una vez centrifugadas y contadas las células, se reconstituyó el pellet en el volumen de medio necesario para una concentración de 2.5×10^6 /mL, donde la adición de 800 µL proporciona 2×10^6 células por muestra.

Se hizo una mezcla de la alícuota de plásmido pNL4-3Δ *gag-pro* digerido, más el producto de PCR de cada muestra y los 800 µL de células. El volumen se dispuso en las cubetas de electroporación. Se mezcló por pipeteo para homogeneizar cada muestra y se preparó un control negativo y positivo para cada ensayo:

- Control positivo: Se utilizó el plásmido purificado pNL4-3
- Control negativo: Se adicionó agua DEPC en sustitución al producto de PCR.

Cada muestra se electroporó bajo las siguientes condiciones:

- 300 Volts
- 500 µF de capacitancia
- ∞ Resistencia
- 4 mm de grosor de celda
- 9 ms de tiempo de exposición

Posterior al choque eléctrico, se dejaron en reposo por 45 minutos y por pipeteo se transfirió el volumen a botellas de cultivo de 20 mL, con 5 mL de medio R10. Se incubaron a 37°C, 0.5% CO₂ y 85% de humedad.

5.10.1.7 Propagación de virus quiméricos

Posterior a dos días de cultivo, se adicionaron 5 mL de medio para permitir el crecimiento y propagación de los virus generados en caso que se haya ensamblado un genoma completo dentro de las células. Las células se dejaron en contacto con el virus por un tiempo aproximado de 10 días permitiendo su propagación, a partir del cual, se realizó el primer monitoreo por citometría de flujo. A partir de este primer monitoreo, el cultivo se mantuvo por remoción y reemplazo de 2 mL de medio R10 por aproximadamente 21 días.

Para el monitoreo de la producción de los virus quiméricos se tomó una alícuota de 2 mL de cultivo en tubos de citometría, se centrifugó a 1500 rpm por 10 min y se hicieron dos lavados con una solución de PBS y 5% EDTA bajo las mismas condiciones de centrifugación. El pellet se resuspendió en 0.5 mL de formamida al 1% para fijar las células.

5.10.1.8 Monitoreo por citometría de flujo

La expresión de GFP en células transfectadas y productoras de virus recombinantes, se hizo en el citómetro Attune Acoustic Focusing Cytometer, (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) utilizando el canal FITC en el láser azul. El %GFP se consideró como una medida indirecta de la replicación del virus recombinante en cada cultivo. Para la realización de todos los ensayos, incluyendo el monitoreo de producción de virus quiméricos, titulación y ECR, el equipo se inicializó de acuerdo a las instrucciones del fabricante considerando: controles de calidad diaria que ajustan los voltajes y láseres en el instrumento, purga de l sistema de fluidos para evitar la formación de burbujas y quitar impurezas adheridas a las manijas, así como protocolos de limpieza específicos y exhaustivos para evitar taponamientos.

Para evaluar la producción de virus quiméricos, el valor a partir del cual se consideró positiva la expresión de GFP, se estableció con el control negativo del ensayo, considerando 0.1% de expresión como valor máximo de fluorescencia basal. Las muestras cuyo cultivo expresaran más de 20% de GFP se cosecharon y almacenaron para el ensayo de capacidad replicativa. La cosecha de los virus

recombinantes se realizó por centrifugación del volumen total del cultivo en un tubo Falcon de 15mL (1500 rpm por 10 min), guardándose 8-9 alícuotas de 1 mL del sobrenadante a -80°C; el resto del cultivo se desechó.

Los resultados generados en el citómetro se analizaron en Flowjo, versión 10.0 de acuerdo a la siguiente estrategia de análisis: Se seleccionaron células únicas, singlets → selección de células vivas → porcentaje de células GFP positivas de acuerdo al valor establecido durante la lectura del control negativo (Figura 5.3).

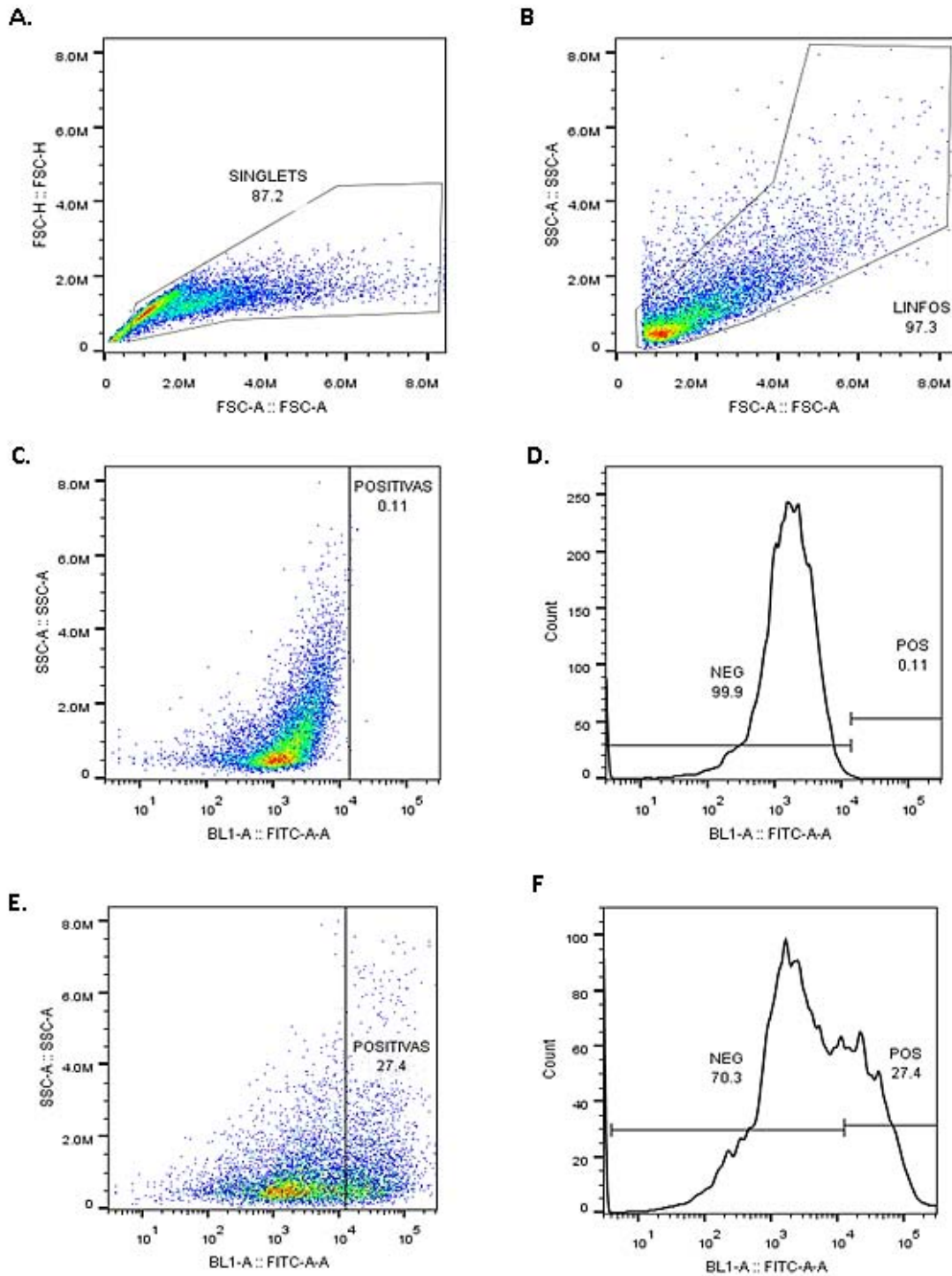


Figura 5.3. E estrategia de análisis de citometría de flujo para el porcentaje de GFP en células GXR infectadas con virus recombinantes. Se seleccionaron células únicas o singlets (A), de esta población se analizaron linfocitos vivos (B). La expresión de GFP en plot e histograma del control negativo, se muestran en los paneles C y D, valores menores a 0.1% GFP se consideraron como negativos. Se muestra un ejemplo representativo de un cultivo con valores positivos de GFP en plot e histograma con un 27.4% de expresión, panel E y F.

5.10.2 Titulación

Para conocer el número de partículas virales quiméricas por cultivo y para que los ensayos de capacidad replicativa pudieran ser comparables, cada quimera se tituló por infección de células GXR. En una placa de 24 pozos se infectaron 1×10^6 células en un volumen de 100 μL con una alícuota de 400 μL de los virus quiméricos previamente descongelados. Cada virus se analizó por duplicado y se incluyó un control negativo y un duplicado del control positivo (virus NL4-3). En el día 1 post-infección, se adicionó 1 mL de medio fresco y al día 2 se midió la expresión de % GFP en las células por pozo. Para ello, se tomó una alícuota de 500 μL en una placa de 96 pozos, y al igual que en la propagación de los virus, se realizaron dos lavados con PBS y EDTA al 5% en las condiciones de centrifugación previamente descritas, finalmente las células fueron fijadas en formamida al 1%.

El ensayo de titulación considera estandarizar cada virus quimérico a un valor de multiplicidad de infección (MOI) de 0.3, es decir, la cantidad de virus presentes en cultivo por cada célula, se ajustó a un valor de 0.3. De esta manera, en el ECR se adiciona la alícuota adecuada para que la curva de crecimiento y la capacidad replicativa sea comparable entre muestras. Para obtener el título de cada virus, se consideró el valor promedio de % GFP del duplicado para cada cultivo viral y se calculó la cantidad de virus necesarios para que al día 2 de infección, el porcentaje fuese de 0.3%

$$\text{cantidad de virus requerido } (\mu\text{l}) = 0.3\% \left(\frac{400 \mu\text{L}}{\%GFP} \right)$$

5.10.3 Ensayo de Capacidad Replicativa Viral

El ensayo tiene como finalidad conocer la capacidad replicativa viral, CRV, de cada virus quimérico producido, en relación a la CRV del virus de referencia NL4-3. El ensayo se realizó por infección de GXR de acuerdo al título obtenido en la sección anterior que consideró una MOI de 0.3, la infección se monitoreó diariamente por un período aproximado de 9 días. Con la amplificación gag-pro de cada individuo incluido en el estudio, la CRV dependerá de los polimorfismos y mutaciones contenidas en gag y la proteasa viral.

Día 0. Se hizo una dilución del virus quimérico de acuerdo al título determinado para cada muestra. Se tomó la cantidad de virus necesaria para lograr 0.3% de expresión de GFP al día 2 de infección y se diluyó a un volumen total de 500 μ L. En placas de 24 pozos se infectó 1×10^6 células GXR dispuestas en 100 μ L con 400 μ L de la dilución de cada virus quimérico. Las muestras se hicieron por duplicado incluyendo un control negativo y un duplicado del control positivo (virus NL4-3)

Día 1. Se adicionó de 1 mL de medio R10 fresco

Día 2-9. La curva de crecimiento para cada virus se monitoreó por citometría de flujo para conocer el valor de CRV.

Para el cálculo de la CRV, se realizó una estimación logarítmica de los valores de %GFP para obtener el valor de la pendiente de la curva de crecimiento para cada virus considerando lo siguiente:

- Si el valor de %GFP al día 6 fue <20% se tomaron los valores del día 1-6
- Si el valor de %GFP al día 6 fue >20% se tomaron los valores del día 1-5

Con el valor promedio del duplicado para cada muestra se calculó la capacidad replicativa CR, de acuerdo a la siguiente fórmula: en Excel, $\ln(\text{LOGEST}((X1,X2,X3), (Y1,Y2,Y3), 0, 0))$. El valor se dividió entre el promedio de la CR del virus de referencia NL43 para obtener la CR relativa de cada individuo.

Finalmente, se hizo un análisis de control de calidad por filogenia y secuenciación para corroborar que las mutaciones que se encontraban en los virus circulantes de cada individuo no se perdieran durante la propagación del virus quimérico correspondiente. Al ser la CR dependiente de la región gag-pro de cada virus, resultó de suma importancia corroborar que las mutaciones de resistencia a Inhibidores de Proteasa se encuentran presentes durante el ECR.

De una muestra aleatoria de virus quiméricos, se extrajo el RNA viral para amplificar y secuenciar *gag* y proteasa viral. Se realizó la misma metodología que en las secciones 5.2 a 5.8 y se construyó un árbol filogenético con las secuencias para identificar que la secuencia a partir del virus circulante y la secuencia del virus quimérico, se encontraban en la misma rama del árbol.

Las muestras cuyas mutaciones de resistencia a los proteasos se encontraban como ambigüedad en los virus circulantes y revirtieron durante la propagación del virus quimérico correspondiente, fueron excluidas del presente estudio.

5.11 Tipificación de HLA clase I

Para estudiar el impacto de los alelos HLA-I en la CRV y su interacción con mutaciones presentes en la región Gag-pro de cada individuo, se hizo la tipificación a alta resolución por secuenciación de los alelos HLA A, B y C. Se siguió la metodología publicada por (HLA class I sequence-based typing using DNA recovered from frozen plasma Cotton, L., et al. 2012) ya que la extracción de DNA a partir de células, PBMCs no era posible por contarse sólo con el plasma sanguíneo de los individuos.

La extracción de DNA se logró utilizando el kit comercial Invitrogen PureLink™ Genomic DNA kit; (Life Technologies, Burlington, ON, Canada) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La unión selectiva del DNA a una membrana de sílica-gel dispuesta en columna, fue estabilizada y lavada con buffers de alta fuerza iónica. Finalmente, el DNA se eluyó con un buffer libre de RNAsas y de baja fuerza iónica.

Se utilizaron primers locus-específicos que permitieron la amplificación de los exones 2 y 3 de cada alelo. La lista de primers utilizados se encuentran descritos en el Anexo 1. Se hicieron reacciones individuales para cada gen amplificándolos por PCR anidada y utilizando la enzima Expand™ High Fidelity Enzyme Mix, Roche (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI) en termocicladores Veriti 96 well Thermal Cycler (Life Technologies, Carlsbad, CA).

Componente	Volumen HLA-A	HLA-B y C
dH ₂ O	25µL	27.5µL
DMSO	2.5µL	-
Buffer 10x	5µL	5µL
MgCl ₂ 25 mM	2µL	2µL
dNTP's mix (25mM)	0.5µL	0.5µL
Primer "forward" (10µM)	3µL	3µL
Primer "reverse" (10µM)	3µL	3µL

Enzyme Mix, Roche HF	1µL	1µL
Volumen de DNA extraído	8µL	8µL
Volumen final	50µL	50µL

Programa en termociclador: 1 ciclo de 3min a 95°C, 35 ciclos de 20s a 95°C, 20s a 60°C y 50s a 72°C, finalmente 1 ciclo de 7min a 72°C.

La segunda ronda de amplificación se preparó de acuerdo a la siguiente mezcla de reacción y programa de amplificación:

Componente	Volumen HLA-A	HLA-B y C
dH ₂ O	11µL	12µL
DMSO	1µL	-
Buffer 10x	2µL	2µL
MgCl ₂ 25 mM	0.8µL	0.8µL
dNTP's mix (25mM)	0.16µL	0.16µL
Primer "forward" (10µM)	1.1µL	1.1µL
Primer "reverse" (10µM)	1.1µL	1.1µL
Enzyme Mix, Roche HF	0.3µL	0.3µL
DNA primera ronda	2.6µL	2.6µL
Volumen final	20µL	20µL

Programa en termociclador: 1 ciclo de 3min a 95°C, 35 ciclos de 20s a 95°C, 20s a 62°C y 50s a 72°C, finalmente 1 ciclo de 7min a 72°C.

Posterior al corrimiento electroforético de las muestras, se prepararon los amplicones para la reacción de secuencia. Los productos de amplificación de HLA-A y C se diluyeron en proporción 3:57 µL/H₂O miliQ y los productos de amplificación de HLA-B se purificaron enzimáticamente por ExoSAP-IT. Para ello, se adicionaron 4 µL de cada producto de amplificación más 1 µL de enzima y el volumen total se incubó en termociclador por 20 min a 37°C, seguidos de 20 min a 80°C para inactivación. Transcurrido el tiempo de purificación, se adicionaron 15 µL de H₂O miliQ para un volumen total de 20 µL. Para la reacción de secuenciación se tomaron 2 µL de la dilución correspondiente de HLA-A, B y C.

Para la reacción de secuencia se utilizaron 6 juegos de primers específicos para cada gen (Anexo 1). Se realizó el protocolo de secuenciación y purificación de placa de acuerdo a lo descrito previamente en la sección 5.8. Las secuencias

derivadas de cada primer fueron ensambladas y analizadas con el programa Utype Dx Sequencing Analysis Software (Thermo Fisher Scientific). El programa reconoce y acopla las secuencias correspondientes a los exones 2, 3 de cada locus obteniendo una secuencia continua, esta secuencia es comparada contra una base de datos de alelos HLA-I. El programa arroja como resultado todos aquellos alelos con los que se encontró similitud y la cantidad de diferencias (missmatches) entre cada uno. Se realizó la revisión y edición manual de cada nucleótido para evitar ambigüedades en la tipificación y se registraron únicamente alelos asignados con 100% de identidad (cero missmatches).

La tipificación a partir de la metodología descrita arrojó un alto porcentaje de homocigosis, por lo que se decidió repetir de manera paralela la metodología utilizando el RNA extraído para cada muestra. Se consideró que la sílica-gel utilizada en el kit no es específica a RNA, sino a ácidos nucleicos, y que la alta velocidad de centrifugación para la concentración de partículas virales, también favorece la concentración de DNA. El porcentaje de homocigosis disminuyó notoriamente.

5.12 Análisis estadísticos

Se realizó la prueba U de Mann-Whitney para la comparación de datos entre grupos independientes considerándose significativos, valores de $p < 0.05$. Para estudiar la existencia de correlaciones entre distintos parámetros (número de mutaciones vs. capacidad replicativa) se utilizó la regresión lineal de Spearman. Los análisis antes descritos, así como la construcción y edición de las gráficas correspondientes, se realizaron con el programa GraphPad Prism 6.0.

Para el análisis de prevalencia de HLA-I se calcularon las frecuencias alélicas utilizando la herramienta "HLA Freq Analysis"/ HLA Graphing", Base de datos de Los Alamos (http://www.hiv.lanl.gov/content/immunology/hla/hla_graph.html). Para el estudio del impacto de alelos HLA-I sobre la CR se eligieron alelos con representatividad mayor a $n=3$. Se hicieron comandos adecuados para el software STAT12.0 que realizó U Mann-Whitney para cada alelo y valor de Capacidad Replicativa. Los resultados se graficaron en GraphPad Prism 6.0.

CAPÍTULO VI. RESULTADOS

6.1 Descripción de la cohorte

Se estudió una cohorte de 103 individuos mexicanos con infección por VIH-1 con un esquema de tratamiento antirretroviral incluyendo Inhibidores de proteasa. La cohorte se extrajo del banco de pacientes del Laboratorio de Diagnóstico Viroológico del CIENI y se tomó el plasma sanguíneo de los individuos que presentaban falla virológica por la presencia de mutaciones de resistencia a IPs.

La proporción hombre:mujer fue característico de la epidemiología en México con un 80% de representatividad masculina. De acuerdo a los parámetros clínicos de cuenta de linfocitos T CD4+ y carga viral en plasma, los individuos mostraron el poco control de la viremia con cargas virales elevadas y una media baja de CD4+ 240 células/ μ L. Lo anterior es un reflejo del desgaste inmunológico y crónico de la cohorte de estudio [102]. El rango de mutaciones de resistencia a IPs por individuo en la cohorte fue de 0-7 mutaciones, con una mediana de 2 mutaciones mayores de resistencia por individuo (Tabla 6.1).

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

Proporción de mujeres (%)	20
Número de mutaciones mayores de resistencia a IPs (mediana [rango])	2 [1-7]
Carga Viral Plasmática (copias de RNA/mL) (mediana* [rango])	44,817 [864 - >100,000]
Conteo de linfocitos T CD4+ (células/ μ L) (mediana* [rango])	240 [12-984]

*Valor de la mediana con datos faltantes de 50 pacientes para la cuenta de Linfocitos T CD4+ y 5 pacientes para Carga Viral.

6.2 Análisis filogenéticos

Como primer acercamiento al estudio de la variabilidad de las secuencias *gag* y proteasa debido a la exposición por IPs, se hizo el análisis filogenético en búsqueda de agrupaciones y eventos evolutivos comunes entre sub-secuencias (Figura 6.1).





Figura 6.1 Árbol filogenético consenso para las 103 secuencias de la proteasa viral (superior) y el gen *gag* (inferior) de los virus presentes en cada individuo incluido en el estudio. El análisis filogenético fue realizado por el programa Mega 6.06. Se utilizó el método de Máxima Verosimilitud (Maximum Likelihood) tomando como representativo el árbol consenso tras 1 000 réplicas de bootstrap. La distancia evolutiva se calculó utilizando el modelo "General Time

Reversible Model (GTR)". Se muestra el nombre de la secuencia de referencia HXB2, tomada de la Base de Datos de VIH de Los Álamos. <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/html>

Los árboles filogenéticos no mostraron ninguna evidencia de clusters que sugirieran una agrupación o similitud genética clara entre subconjuntos de secuencias. Las secuencias presentaron poca divergencia en tres ídadas las ramas equidistantes a lo largo del árbol consenso, y los bajos valores de bootstrap de los nodos externos. Esto sugiere una población viral altamente homogénea.

El siguiente par de árboles se realizó con fines de control de calidad por filogenia de las secuencias de los virus quiméricos propagados en el vector plásmidico pNL43Δgag y que contiene la región *gag-proteasa* de cada individuo. Como se describió en la metodología, el valor de la capacidad replicativa se determinó con la quimera construida y es de suma importancia que durante el proceso de propagación viral, las mutaciones de resistencia y polimorfismos asociados a IPs se mantuvieran. En caso que la mutación revirtiera, el ensayo de capacidad replicativa viral no estaría reflejando la replicación de la población viral del individuo. Las secuencias de la proteasa viral y el gen *gag* obtenidas de plasma y de las quimeras se compararon y sometieron al mismo análisis filogenético.


Secuencias a partir de plasma sanguíneo


Secuencias de la quimera durante ensayo de
Capacidad Replicativa

distancia e volutiva se calculó utilizando el modelo "General Time Reversible Model (GTR)". Se muestra el nombre de la secuencia de referencia HXB2, tomada de la Base de Datos de VIH de Los Álamos. (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/html>). El árbol muestra para cada caso, que la secuencia obtenida de plasma se localiza en la misma rama que el virus quimérico construido.

La Figura 6.2 mostró que tanto las secuencias de proteasa, como las del gen *gag* obtenidas del plasma sanguíneo, se localizan en la misma rama que las secuencias de las quimeras construidas. El valor alto de bootstrap fue indicativo de la similitud entre los pares de secuencias y es un buen parámetro que indica la conservación de las mutaciones durante la propagación de las quimeras y por tanto, durante el ensayo de capacidad replicativa. El análisis de los electroferogramas para cada par de secuencias permitió identificar que en caso que la mutación asociada a IPs se encontrara como ambigüedad en el plasma sanguíneo, ésta reverte durante la propagación de la quimera correspondiente. Por tanto, las secuencias con ambigüedades se excluyeron del estudio conformando la cohorte final de 103 individuos.

6.3 Ensayos de capacidad replicativa: Comparación con una cohorte de individuos vírgenes a tratamiento antirretroviral

La determinación de la Capacidad Replicativa relativa se logró por infección de la línea celular GXR. Las quimeras construidas incluyeron la región *gag-proteasa* de cada individuo permitiendo el estudio de la co-evolución de estos genes bajo exposición a IPs (ver metodología sección 5.10). Se logró el ensayo de 98 virus, con cinco quimeras sin lograrse propagar.

El criterio de selección para la inclusión de una muestra al estudio, fue la presencia de mutaciones mayores de resistencia a Inhibidores de Proteasa en la proteasa viral, de acuerdo a la Figura 1.15. Conforme se repitió y corroboró el genotipo de resistencia para cada muestra (ver metodología 5.9), surgieron casos que no presentaban mutaciones mayores, sino únicamente mutaciones menores o secundarias (L10I/V, K20R, M36I, A71V/T/I). Aunque pudieron excluirse de los análisis, la quimera ya estaba construida por ser un paso limitante en la metodología dado el largo tiempo de propagación. El primer análisis de la CR de la cohorte incluyó a estos virus con mutaciones menores.

La mediana de CR en la cohorte de estudio fue de 0.958366 [1.375486- 0.608133]. Para conocer si las mutaciones seleccionadas en *gag-pro* bajo esta múltiple presión selectiva tenían impacto en la capacidad replicativa, se compararon con una cohorte de individuos vírgenes a tratamiento antirretroviral. Los datos de esta cohorte se obtuvieron del proyecto “Impacto de las mutaciones seleccionadas por las moléculas HLA-I sobre la capacidad replicativa del Virus de Inmunodeficiencia Humana”, por Maribel Soto-Nava en el CIENI, (datos sin publicar). La cohorte de este proyecto es superior a las 500 muestras y de varios estados de la República Mexicana; sin embargo, se seleccionaron individuos de procedencia geográfica similar a la de los incluidos en el presente estudio (DF, y Estado de México) para considerar una presión selectiva por HLA-I semejante [25].

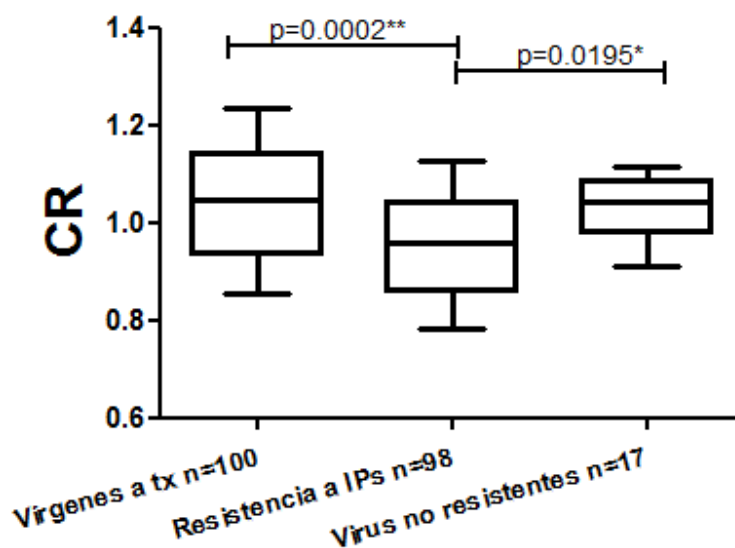


Figura 6.3 Comparación de la capacidad replicativa en tre la cohorte con mutaciones de resistencia a IPs con una cohorte vírgen a tratamiento. Los individuos que han seleccionado un gran número de mutaciones por exposición a IPs presentaron una CR significativamente menor. Se incluyó la comparación con una cohorte de individuos con mutaciones menores a IPs cuya CR fue significativamente mayor. Prueba de U de Mann-Whitney, GraphPad Prism 6.0

La CR de los individuos expuestos a IPs con mutaciones mayores de resistencia fue significativamente menor en comparación con individuos vírgenes a tratamiento ($p=0.0002$) (Figura 6.3). De igual manera, la CR de individuos con mutaciones menores o secundarias fue significativamente mayor ($p=0.0195$). Este resultado es un reflejo de la pérdida de capacidad replicativa por la selección de un gran número de mutaciones en la región *gag-proteasa* dada la exposición a IPs.

Ya que se trató del estudio de dos regiones distintas del genoma, los resultados que se describen a continuación contienen un código de colores de acuerdo a la región estudiada. Las mutaciones que hacen referencia a la proteasa viral se identificaron en negro eg. **L90M**. Las mutaciones que hacen referencia al gen *gag* se identificaron en azul eg. **A431V**

6.4 Ensayos de Capacidad Replicativa: Impacto de mutaciones secundarias en la proteasa viral y que han sido previamente asociadas a un efecto compensatorio

Se ha reportado que las mutaciones secundarias o menores dentro de la proteasa viral se seleccionan fuera del sitio activo y tienen un efecto compensatorio en la capacidad replicativa [83]. Como siguiente análisis, se evaluó si la presencia de estas mutaciones en una proteasa resistente a IPs mostraba efecto compensatorio en la cohorte de estudio. Las mutaciones que se analizaron de acuerdo a las características de la cohorte fueron: L10I/V, K20R, M36I, A71V/T/I.

Para este análisis, se consideraron dos grupos de comparación: 0-1 y más de 2 mutaciones compensatorias (panel izquierdo, Figura 6.4); menos de 2 y más de 3 mutaciones compensatorias (panel derecho, Figura 6.4). No se obtuvo una diferencia significativa entre los valores de CR de los grupos de comparación. El resultado sugiere que la presencia de estas mutaciones en la proteasa viral no tiene un efecto compensatorio significativo en la cohorte de estudio.

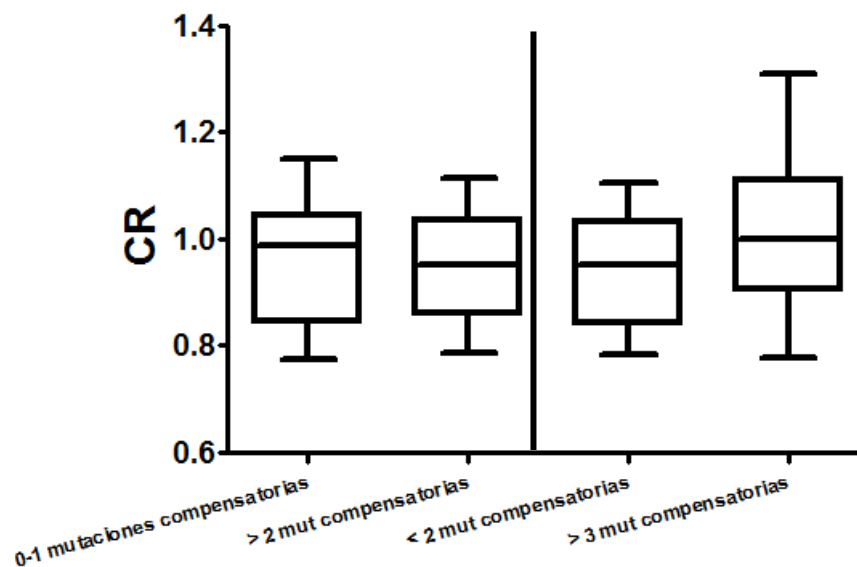


Figura 6.4. Efecto de mutaciones compensatorias en la CR de la cohorte expuesta a IPs. No hubo diferencia significativa entre los valores de CR considerando la comparación de 0-1 mutaciones compensatorias y más de 2 mutaciones, panel izquierdo. Y menos de 2 mutaciones y más de 3 mutaciones, panel derecho. Prueba de U de Mann-Whitney, GraphPad Prism 6.0

6.5 Ensayos de capacidad replicativa: Impacto de las mutaciones mayores de resistencia en la proteasa viral

A continuación se determinó la frecuencia de las mutaciones de resistencia a IPs en *pol*, características de la cohorte de estudio y su impacto en la capacidad replicativa viral. La mutación L90M fue la más frecuente de la cohorte, presente en más del 50% de los individuos (Figura 6.5).

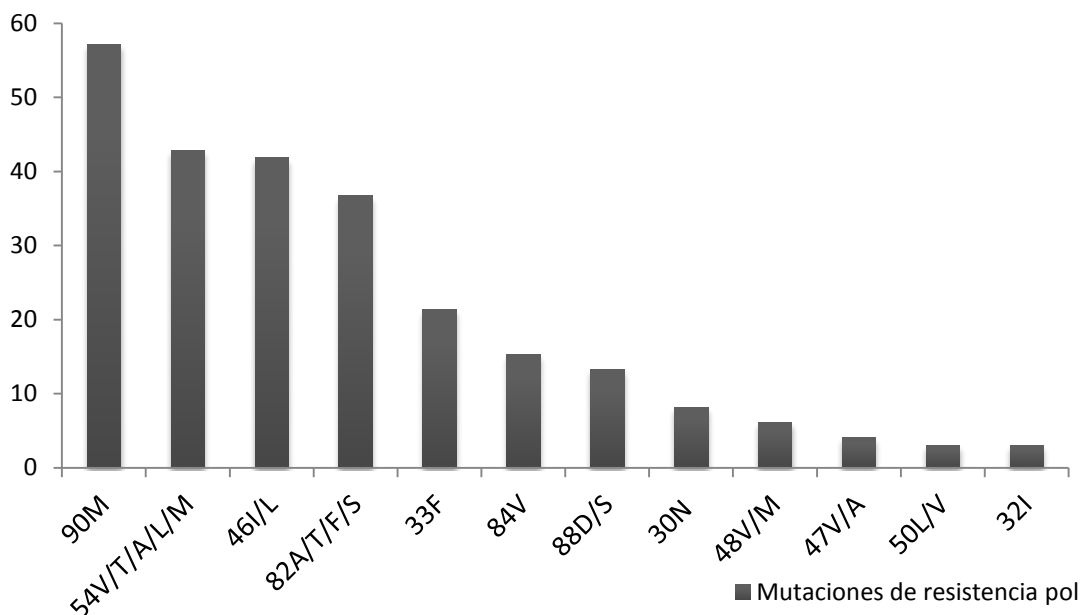


Figura 6.5. Frecuencia de mutaciones mayores de resistencia a IPs características de la cohorte. La mutación L90M fue la más frecuente en la cohorte.

Como primer acercamiento, se analizó si la presencia-ausencia de cada una de las mutaciones presentaba efecto en la CR. De todas las mutaciones presentes en la cohorte, la presencia de la mutación G48V se asoció con una CR significativamente menor ($p=0.0133$) (Figura 6.6). La mutación L90M de mayor frecuencia en la cohorte, presentó un comportamiento de aumento en la CR aunque sin significancia estadística Gráfica 6.5.

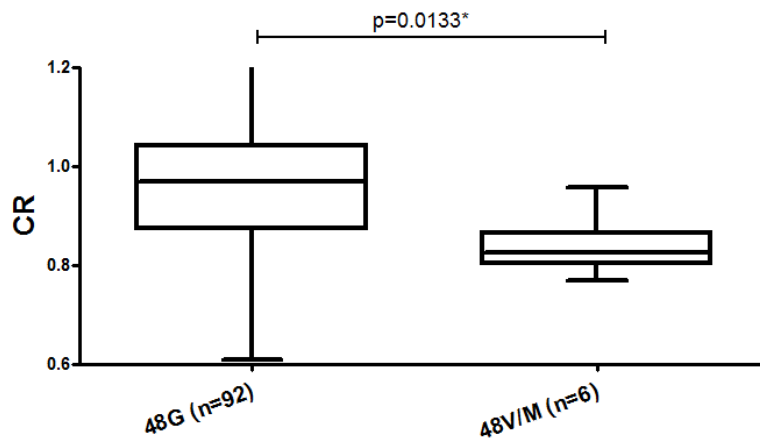


Figura 6.6. Efecto de la mutación G48V sobre la capacidad replicativa viral. La mutación G48V mostró efecto significativo en la disminución de la CR $p=0.0133$. Prueba de U de Mann-Whitney, GraphPad Prism 6.0

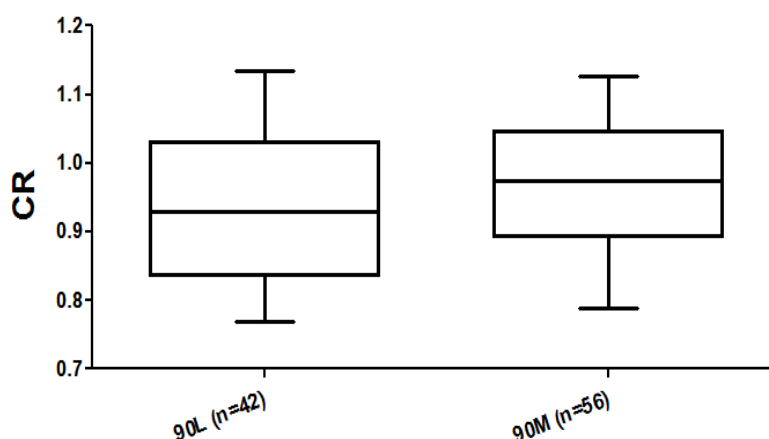


Figura 6.7. Efecto de la mutación más frecuente L90M, sobre la capacidad replicativa viral. La mutación L90M de mayor frecuencia en la cohorte, mostró un comportamiento compensatorio en la CR $p=0.0997$. Prueba de U de Mann-Whitney, GraphPad Prism 6.0

Como siguiente análisis, se buscó una posible correlación entre el número de mutaciones de resistencia en la proteasa viral y la CR que pudiera explicar su valor menor en comparación con la cohorte virgen a tratamiento (Figura 6.8). No se observó correlación entre el número de mutaciones de resistencia en la proteasa y la CR. El resultado sugiere que a pesar de seleccionarse un gran número de mutaciones de resistencia en la proteasa de algunos virus, su CR es semejante a la de aquéllos que tienen un menor número de mutaciones. Estos datos sugieren que existen mecanismos compensatorios que hacen más eficiente la capacidad de replicación en virus con un mayor número de mutaciones de resistencia a IPs.



Figura 6.8. Correlación entre el número de mutaciones mayores de resistencia a IPs en proteasa y la capacidad replicativa viral. No se observó correlación entre el número de mutaciones de resistencia a IPs y la CR. Coeficiente de correlación de Spearman, GraphPad Prism 6.0.

Adicionalmente, se realizó un análisis de comparación entre el número total de mutaciones de resistencia en proteasa y la CR (Figura 6.9). Para el análisis no se consideraron mutaciones en particular, únicamente el número total de mutaciones presentes en cada individuo. Sin embargo, tampoco se observó diferencia al hacer las comparaciones entre grupos. Este resultado igualmente sugiere que existen mecanismos compensatorios que asemejan la CR entre una proteasa con una única mutación de resistencia y una con más de 5 mutaciones de resistencia.

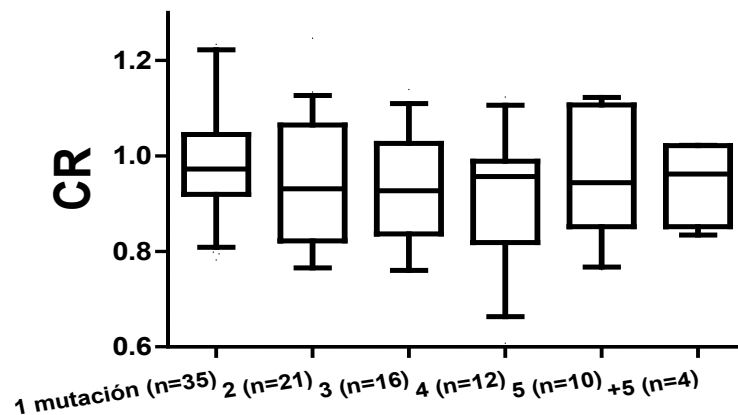


Figura 6.9. Comparación entre el número de mutaciones mayores de resistencia a IPs en proteasa y la capacidad replicativa. No se observó diferencia entre la comparación del número de mutaciones de resistencia a IPs y la CR. Prueba de U de Mann-Whitney, GraphPad Prism 6.0

6.6 Ensayos de capacidad replicativa: Impacto de mutaciones previamente reportadas en el gen *gag* asociadas al uso de IPs

Al ser el gen *gag*, sustrato de la proteasa viral, la lista de mutaciones que han sido reportadas en asociación con la exposición a IPs es extensa [67, 69, 86-88, 90, 97, 101, 103-107]. Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado efectos compensatorios en la CR o bien, aporte al fenotipo de resistencia incluso en la ausencia de mutaciones de resistencia en la proteasa viral. Se hizo una búsqueda de aquellas mutaciones características de la cohorte, encontrándose el siguiente grupo de mutaciones:

R76K, T81A, V128T/A, H219P/Q, A431V, K436E/R, I437T/V, P449L/F/P/V, P453A/L/T, E468G/S.

La Figura 6.10 muestra la frecuencia de las mutaciones en la cohorte de estudio. La mutación R76K fue la de mayor frecuencia en la cohorte, presente en un 60% de los participantes.

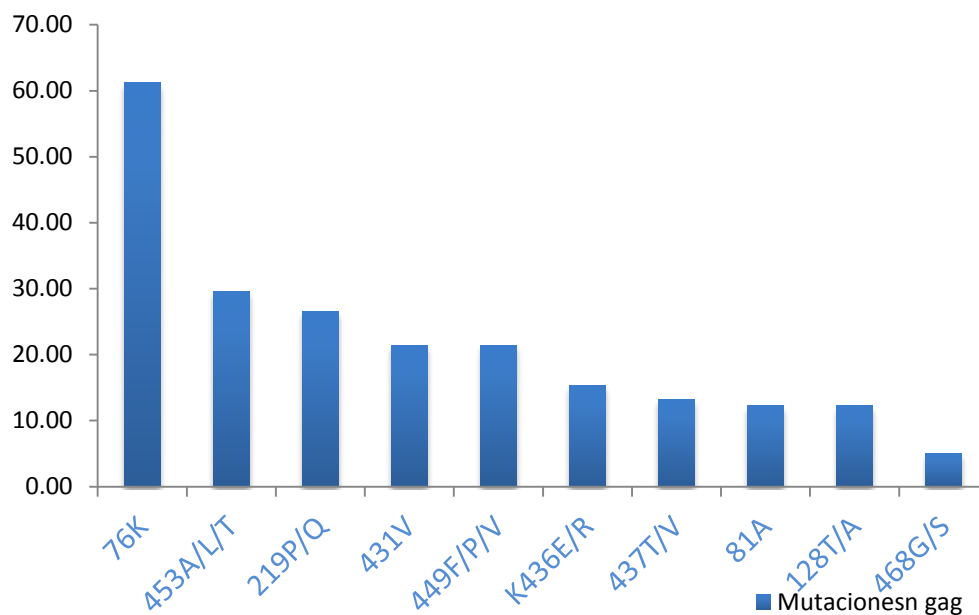


Figura 6.10. Frecuencia de mutaciones previamente reportadas en el gen *gag* asociadas al uso de IPs La mutación R76K fue la más frecuente de la cohorte de estudio.

Al igual que con las mutaciones en proteasa, se hizo el análisis de la presencia-ausencia de las mutaciones en *gag* y su impacto en la CR. La mutación **A431V** mostró efecto significativo en la disminución de la CR ($p=0.0055$), la mutación **R76K** mostró también una tendencia a la disminución de la CR ($p=0.0635$) (Figuras 6.11 y 6.12). La mutación **A431V** es una posición reportada como mutación de resistencia a IPs incluso en ausencia de mutaciones de resistencia en la proteasa viral. Se encuentra en el motivo de corte NC-p1 y también se ha propuesto como una mutación compensatoria en presencia de una proteasa resistente [50, 69, 107]. Sin embargo, en la cohorte no se observó efecto compensatorio alguno asociado a su presencia, sino el efecto contrario de disminución de la CR.

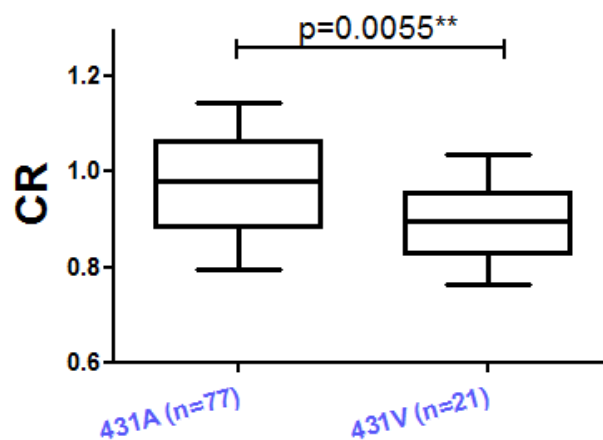


Figura 6.11. Efecto de la mutación **A431V sobre la capacidad replicativa viral.** La mutación **A431V** previamente asociada a la exposición por IPs, mostró un efecto negativo en la CR. Prueba de U de Mann-Whitney, GraphPad Prism 6.0

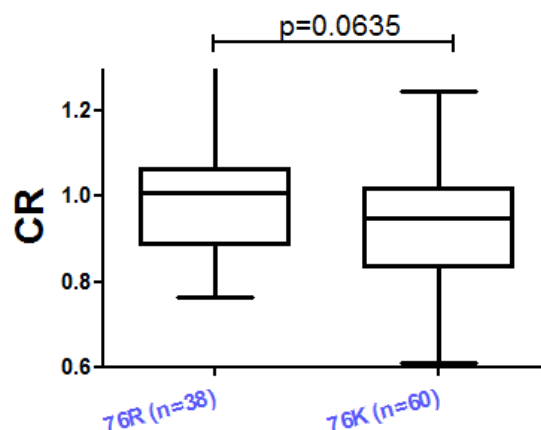


Figura 6.12. Efecto de la mutación **R76K sobre la capacidad replicativa viral.** La mutación **R76K** previamente asociada a la exposición por IPs, fue la de mayor frecuencia en la cohorte y mostró tendencia a la disminución de la CR. Prueba de U de Mann-Whitney, GraphPad Prism 6.0

El análisis conjunto de la presencia-ausencia de ambas mutaciones indicó que la mutación **R76K** por sí misma no tiene efecto sobre la capacidad replicativa, sino que el efecto en la disminución se debe a la presencia de la mutación **A431V**. (Figura 6.13). Sin embargo, se observó también, que la presencia conjunta de ambas mutaciones muestran un efecto aditivo en la disminución de la CR ($p=0.0027$).

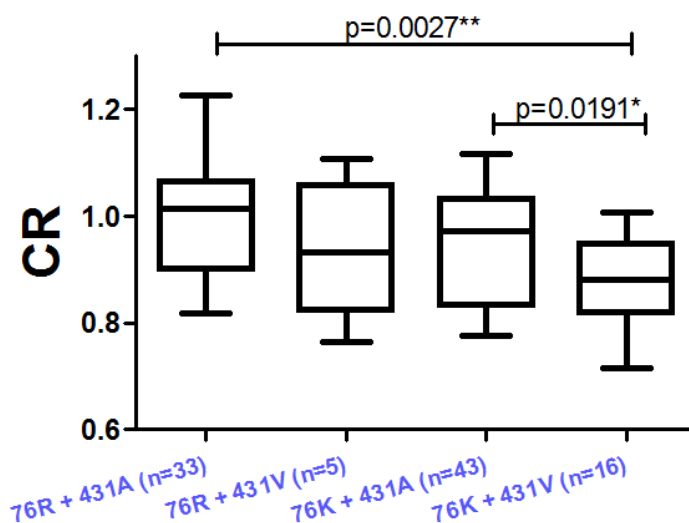


Figura 6.13. Efecto de la mutación **R76K y **A431V** sobre la capacidad replicativa viral.** La sola presencia de la mutación **R76K** no mostró efecto significativo sobre la disminución de la Capacidad Replicativa. La presencia conjunta de ambas mutaciones mostró un efecto significativo en la disminución de la Capacidad Replicativa. Prueba de U de Mann-Whitney, GraphPad Prism 6.0

De igual manera que con la proteasa, se buscó una posible correlación entre el número de mutaciones previamente reportadas en *gag* y la CR y que en este caso, también fuera reflejo de la CR menor en la cohorte en comparación con individuos vírgenes a tratamiento. No se observó correlación significativa (Figura 6.14). Sin embargo, cuando se buscó una diferencia entre el número de mutaciones seleccionadas en *gag* y la CR, se observó diferencia entre la selección de 0 vs. 1 mutación ($p=0.0088$), 0 vs. 2 y 0 vs. 3 ($p=0.0549$ en ambos casos) (Figura 6.15). La gráfica sugiere que las mutaciones en *gag* tienen un mayor impacto en la CR de los virus que han seleccionado mutaciones de resistencia a los Ps. El grupo de 1 mutación ($n=20$) tiene un 20% de la mutación **R76K + A431V** que podría explicar

los valores menores en CR. Sin embargo, no se observó ningún patrón característico de mutaciones en cada grupo de comparación, lo que indica que la posibilidad de variación en este gen es amplia y con un impacto en la CR que no puede diferenciarse a esta profundidad de análisis.

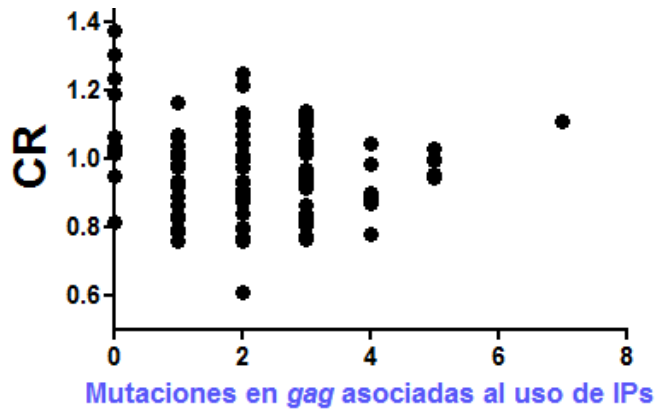


Figura 6.14. Correlación entre el número de mutaciones previamente reportadas en el gen *gag* asociadas al uso de IPs y la capacidad replicativa viral. No se observó correlación entre el número de mutaciones previamente reportadas en *gag* asociadas al uso de IPs y la CR. Coeficiente de correlación de Spearman, GraphPad Prism 6.0.

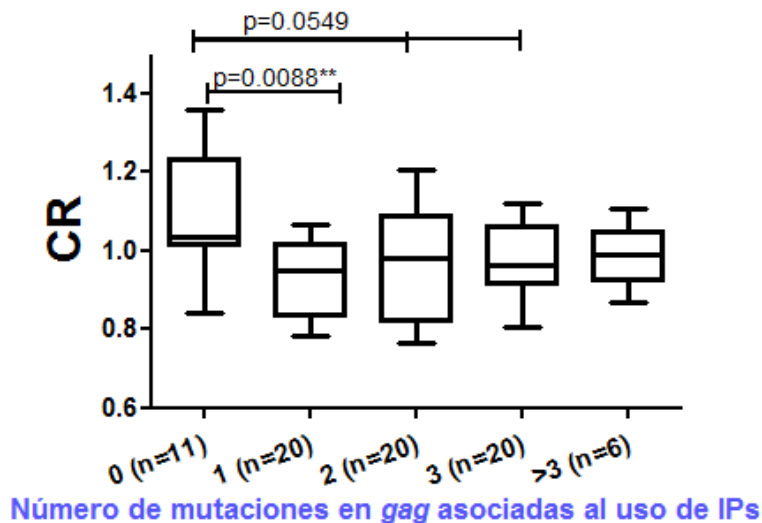


Figura 6.15. Comparación entre el número de mutaciones previamente reportadas en el gen *gag* asociadas al uso de IPs y la capacidad replicativa viral. La comparación de ninguna mutación con la presencia de una mutación en *gag* mostró diferencia significativa en la disminución de la CR ($p=0.0088$). La comparación de 0 vs 2 y 3 mutaciones seleccionadas en *gag* mostró una tendencia en la disminución de la CR ($p=0.0549$). Prueba de U de Mann-Whitney, GraphPad Prism 6.0

6.7 Búsqueda de sitios bajo presión selectiva en el gen *gag*: Análisis por modelos de razón de sustituciones sinónimas y no sinónimas

Las mutaciones en *gag* cuyo impacto en C R se ha mostrado hasta el momento, han sido previamente reportadas en la literatura. Sin embargo, la búsqueda de nuevas posiciones no descritas y que sean características de la cohorte fue un objetivo adicional del estudio. Para conocer éstas posibles posiciones, se utilizó un modelo de evolución de codones basado en la tasa de sustituciones sinónimas (dS) y no sinónimas (dN) disponible en el servidor en línea DataMonkey, utilizando el análisis SLAC (Ver Metodología).

Este análisis da como resultado dos opciones: aquéllas posiciones que tienden a la conservación del aminoácido presente en cierta posición del gen: posiciones bajo presión selectiva negativa, y las posiciones que tienden a la variación del aminoácido presente: posiciones bajo presión selectiva positiva. Se consideraron posiciones bajo presión selectiva positiva, aquéllas con $p < 0.01$.

Las secuencias se alinearon acorde a la secuencia de referencia HXB2 en el software Mega 6.06. La primera visualización del análisis utilizando el programa DataMonkey, es una gráfica que muestra los valores de la diferencia dN-dS en cada codón del alineamiento (Figura 6.16).

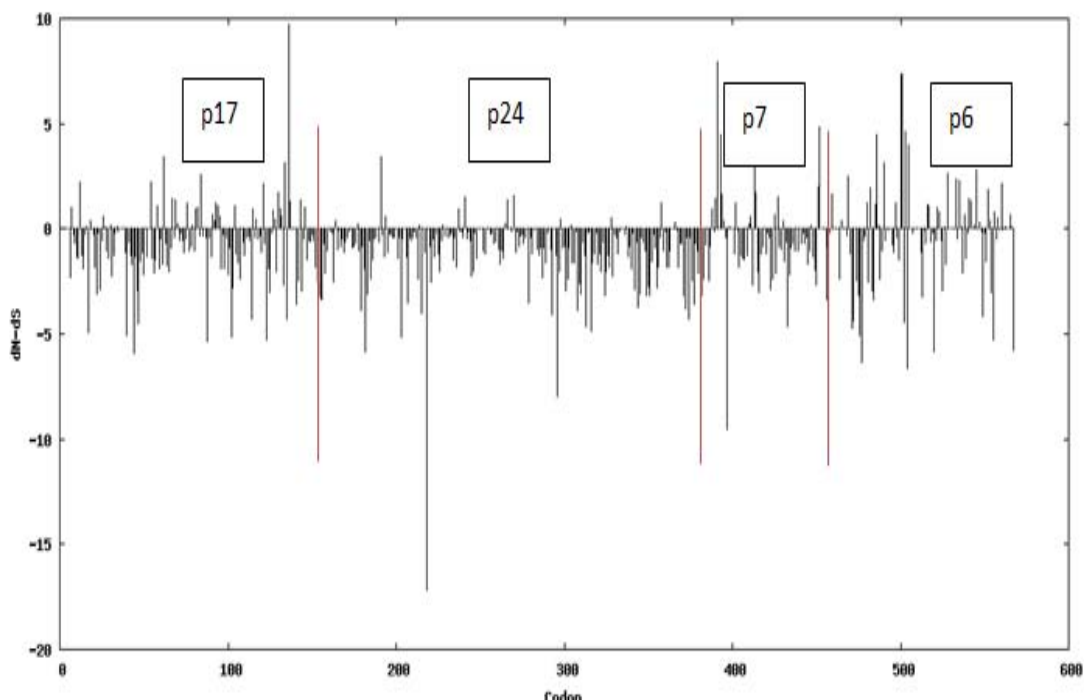


Figura 6.16. Gráfica de la diferencia dN-dS para el alineamiento del gen gag de la cohorte de estudio. Cuando la diferencia entre la razón de sustituciones no sinónimas (dN) y sinónimas (dS) es positiva se considera que la posición se encuentra bajo presión selectiva positiva y que tiende a la variación del aminoácido presente. Cuando la diferencia es negativa, se considera que la posición se encuentra bajo presión selectiva negativa y que tiende a la conservación del aminoácido. Los valores dN-dS se obtuvieron con la herramienta en línea DataMonkey. En rojo, se identificaron los sitios de corte para cada proteína viral dentro del polipéptido Pr55^{gag}, p17- Matriz, p24-Cápside, p7-Nucleocápside y la proteína p6.

De la Figura 6.16, se observó que la mayoría de las posiciones en gag tienden a la conservación del aminoácido presente dado el mayor número de posiciones con valor dN-dS negativo. Fue notoria la conservación de p24-Cápside en comparación con el resto de las proteínas. El mayor número de posiciones que tiende a la variación se concentró hacia la porción final p2p7p1p6, seguida de la proteína de Matriz, p17. De todas las posiciones con valor positivo de dN-dS, sólo 15 resultaron significativas con un valor de $p < 0.01$ (Tabla 6.2).

Tabla 6.2. Posiciones bajo presión selectiva positiva con $p < 0.01$ para el alineamiento de las secuencias gag en la cohorte de estudio.

Codón en el alineamiento	Codón en gag HXB2	Proteína en gag
12	12	Matriz
54	54	Matriz
62	62	Matriz
67	67	Matriz
84	84	Matriz
191	173	Cápside
393	373	Péptido p2
413	389	Nucleocápside
414	390	Nucleocápside
456	431	Nucleocápside
466	441	Péptido p1
479	453	p6
528	473	p6
549	483	p6
557	490	p6

La porción con el mayor número de posiciones bajo presión selectiva positiva fue p2p7p1p6 con nueve de las quince posiciones, 60% del total. De acuerdo al tamaño de la proteína se obtuvo el siguiente orden de evidencia de selección positiva en las secuencias: p6>Nucleocápside>Matriz>Cápside. El mínimo número

de selección positiva en la proteína de la Cápside es reflejo de su conservación en *gag*, dada su importancia funcional y estructural.

Para estudiar mejor el tipo de presión selectiva asociada a las posiciones bajo selección positiva en la cohorte de individuos expuestos a inhibidores de proteasa se hizo una comparación con los resultados obtenidos en la cohorte de individuos vírgenes a tratamiento del proyecto citado “ Impacto de las mutaciones seleccionadas por las moléculas HLA-I sobre la Capacidad Replicativa del Virus de Inmunodeficiencia Humana”, por Soto-Nava et.al (datos sin publicar) n=500 (Figura 6.17). Al ser una cohorte más grande, la probabilidad de encontrar un mayor número de posiciones bajo presión selectiva positiva fue mayor, con un total de 42 posiciones identificadas. En esta cohorte, se puede asumir que las posiciones bajo presión selectiva positiva son un reflejo de la presión que ejerce el sistema inmunológico, principalmente a través de respuestas restringidas por HLA-I ya que la presión por tratamiento antirretroviral está ausente.

En la cohorte de estudio, sin embargo, las fuerzas que influyen en la variación pueden ser resultado de ambas presiones selectivas: tratamiento antirretroviral, IPs y aquella mediada por HLA.-I. La comparación permitiría identificar variaciones que surgen específicamente por IPs o ambas.

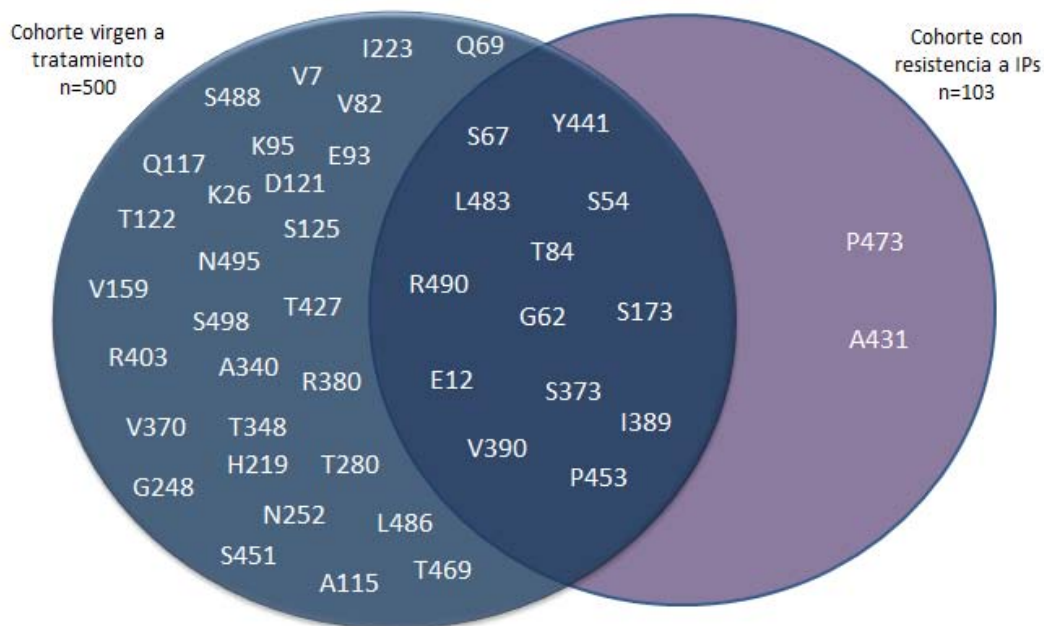


Figura 6.17. Diagrama de Venn que compara las posiciones bajo presión selectiva positiva entre la cohorte con resistencia a IPs y una cohorte virgen a tratamiento. El diagrama muestra el total de las posiciones bajo presión selectiva positiva en la cohorte con resistencia a IPs (n=15) y una cohorte virgen a tratamiento (n=42). Se identifican las 13 posiciones que se comparten entre ambas cohortes, en el extremo derecho las posiciones que son exclusivas de los individuos con resistencia y el extremo izquierdo las que no se compartieron con la cohorte virgen a tratamiento. Numeración y aminoácido de acuerdo a la referencia HXB2.

La Figura 6.17 muestra que, pese a la diferencia en el número de muestras incluidas en ambas cohortes, el análisis permitió identificar posiciones que varían por efecto exclusivo de la presión selectiva del tratamiento antirretroviral (IPs): **A431** y **P473**. La posición **A431** debida a la mutación **A431V** se analizó en la sección anterior y como ya se mencionó, ha sido previamente asociada a exposición a IPs. La posición **P473** no se ha reportado como una posición que varíe en exposición a IPs y puede ser característica de la cohorte de estudio dado el contexto inmunogenético particular. Esta posición se encuentra en la proteína p6 y las variaciones que presentó fueron: **P473S/A/H/Q/T**.

Una vez que se obtuvo la lista de posiciones, el primer análisis se enfocó al impacto del total de las variaciones bajo presión selectiva positiva sobre la CR. Se consideraron los grupos de 3, 4, 5, 6, 7 y más de 8 variaciones, siendo nueve, el número máximo de variaciones que se observó por individuo (Tabla 6. 2). Los análisis se corrigieron por la presencia de la mutación **A431V** que mostró tener un efecto negativo en la CR de acuerdo a las Gráficas 6.10 y 6.11

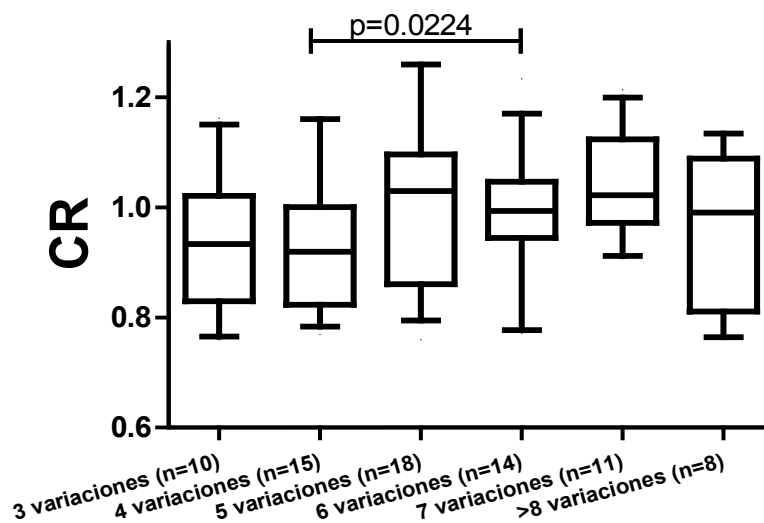


Figura 6.18. Efecto del número de variaciones bajo presión selectiva positiva por individuo, sobre la capacidad replicativa. Gráfica que muestra el efecto del número de variaciones de las posiciones bajo presión selectiva positiva por individuo. Se encontró diferencia significativa entre la comparación de 4 variaciones vs 7 variaciones. Prueba de U de Mann-Whitney, GraphPad Prism 6.0

Se encontró diferencia significativa entre el grupo de comparación de 4 vs. 7 mutaciones en posiciones bajo presión selectiva positiva. Al buscar en la cohorte un patrón de mutaciones que explicara la diferencia en CR entre los grupos, no se encontró ninguno en particular. Sin embargo, al obtener el porcentaje de variación por grupo para cada posición de las catorce posibilidades en total (A431V fue excluida del análisis por corrección) se observó que de manera global, el grupo de 7 variaciones presentó un grado de polimorfismo mayor en comparación con el grupo de 4 variaciones, en especial para 4 de las posiciones (Tabla 6.3).

Tabla 6.3. Porcentaje de variación de las posiciones bajo presión selectiva positiva en el grupo de comparación 4 vs 7 mutaciones totales.

Posición bajo presión selectiva positiva	% de variación en el grupo de 4 mutaciones	% de variación en el grupo de 7 mutaciones
S54	8%	36%
S173	25%	54%
R473	60%	80%
R390	60%	80%

El resultado sugiere que existe un equilibrio entre la selección de variaciones en *gag*, siendo 7 variaciones en adición con un alto porcentaje de incidencia de ciertas mutaciones, un número efectivo para exhibir una CR mayor. Sin embargo, la diferencia con el resto del grupo de variaciones no se mantiene. Respecto a las mutaciones de resistencia en proteasa que presentan estos grupos de comparación, tampoco se encontró un patrón que explicara la diferencia en CR entre estos grupos.

6.8 Impacto de posiciones bajo presión selectiva positiva específicas en *gag* sobre la capacidad replicativa

Cada una de las posiciones bajo presión selectiva positiva tiende a la variación del aminoácido presente y por tanto, existe más de un aminoácido seleccionado por

cada posición. El grado de polimorfismo que exhibe cada una fue distinta para cada posición, de tal modo que para conocer cuál de los cambios pudiera tener un efecto sobre la CR se analizó la presencia-ausencia de cada cambio por cada una de las 14 posibilidades. E.g. en la posición E12 se identificaron los cambios E12K, E12Q, E12D (Figura 6.19).

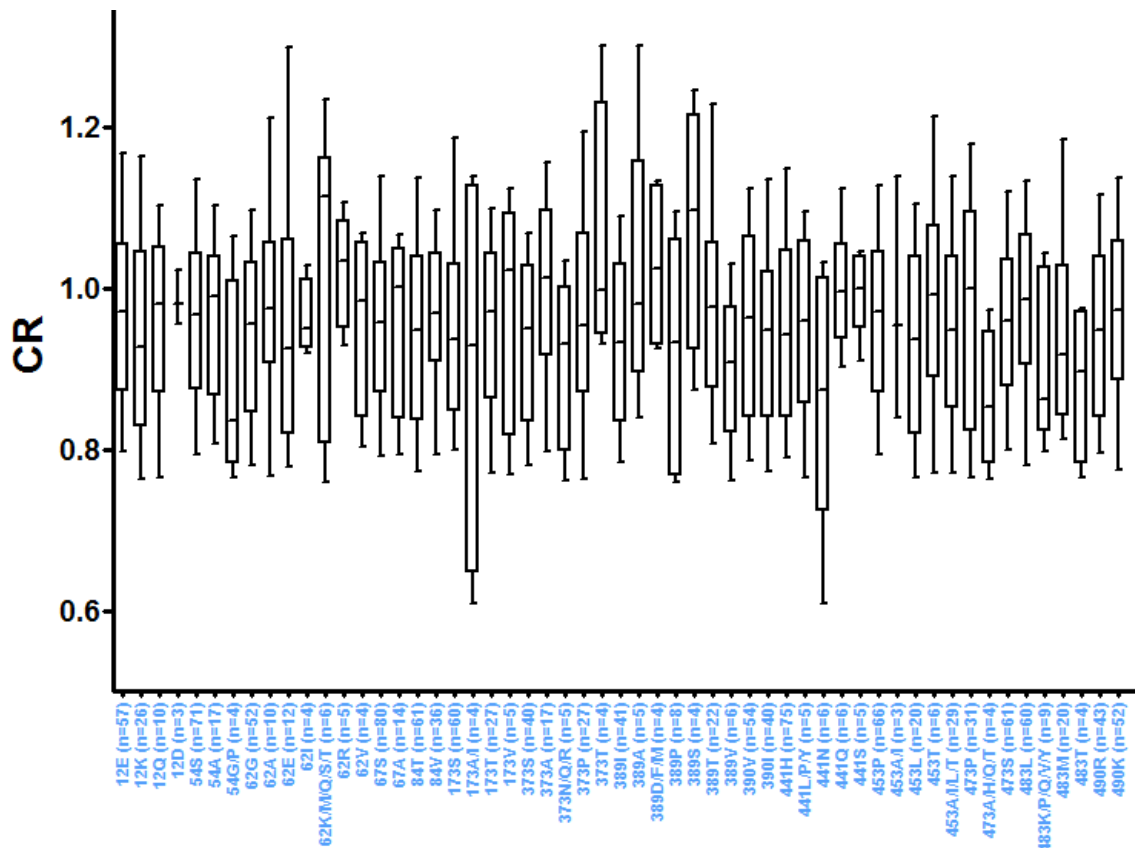


Figura 6.19. Variaciones bajo presión selectiva positiva por posición vs Capacidad Replicativa. Gráfica que muestra cada variación por cada posición bajo presión selectiva positiva contra la Capacidad Replicativa. GraphPad Prism 6.0

El análisis estadístico mostró que la selección de la mutación S373A/T tiene un efecto significativo en el aumento de la CR (Figura 6.20). Esta posición resultó interesante porque también ha mostrado el mismo efecto compensatorio en la cohorte de individuos vírgenes a tratamiento pero con la selección de un aminoácido distinto. La variante asociada a individuos vírgenes a tratamiento es S373Q, mutación que podría ser reflejo de la presión selectiva mediada por HLA-I.

La diferencia de selección de S373A/T entre los pacientes resistentes a IPs y la cohorte de individuos vírgenes a tratamiento es de $p=0.0002$. Este resultado indica

que la selección de estos aminoácidos, Alanina- Treonina, no se favorece en pacientes vírgenes a tratamiento pero sí en individuos expuestos a IPs y que además, el epítipo que contiene esta mutación sigue siendo influenciado por la presión mediada por HLA-I dado su impacto compensatorio en la cohorte de individuos vírgenes a tratamiento.

El resultado es clara evidencia de la interacción entre múltiples presiones selectivas que favorece la selección de ciertos aminoácidos en el contexto del tratamiento antirretroviral.

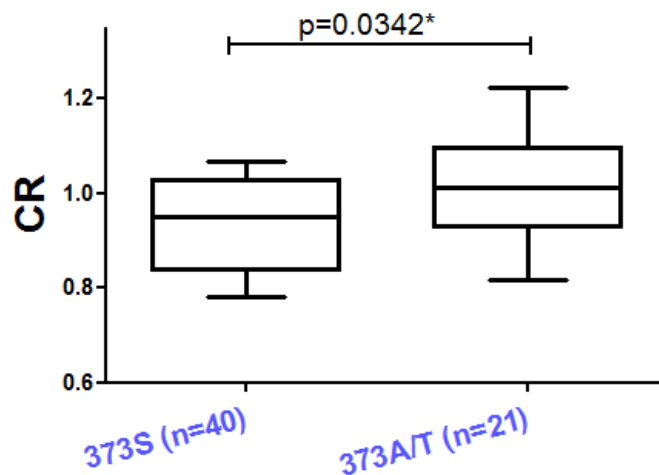


Figura 6.20. Efecto de la mutación S373A/T sobre la capacidad replicativa viral. La mutación S373A/T fue una posición bajo presión selectiva positiva de acuerdo al análisis de razón de sustituciones sinónimas y no sinónimas por Data Monkey, y mostró efecto significativo en el aumento de la CR. Prueba de U de Mann-Whitney, GraphPad Prism 6.0

Con la finalidad de analizar más a fondo esta interacción, y considerando las mutaciones de resistencia presentes en la proteasa, se hizo la combinatoria de la presencia-ausencia de S373A/T con la mutación de resistencia a IPs L90M, que fue la más frecuente en la cohorte y mostró un comportamiento compensatorio. El análisis está considerando por lo tanto, la selección de mutaciones en dos genes distintos en respuesta a la múltiple presión selectiva de la cohorte de estudio: L90M en proteasa y S373A/T en gag. Se observó un efecto sinérgico en el aumento de la CR con la selección de ambas mutaciones $p=0.0309$ (Figura 6.21). La gráfica sugiere también, que la sola presencia del cambio S373A/T es suficiente para observar una tendencia al aumento en la CR $p=0.0787$.

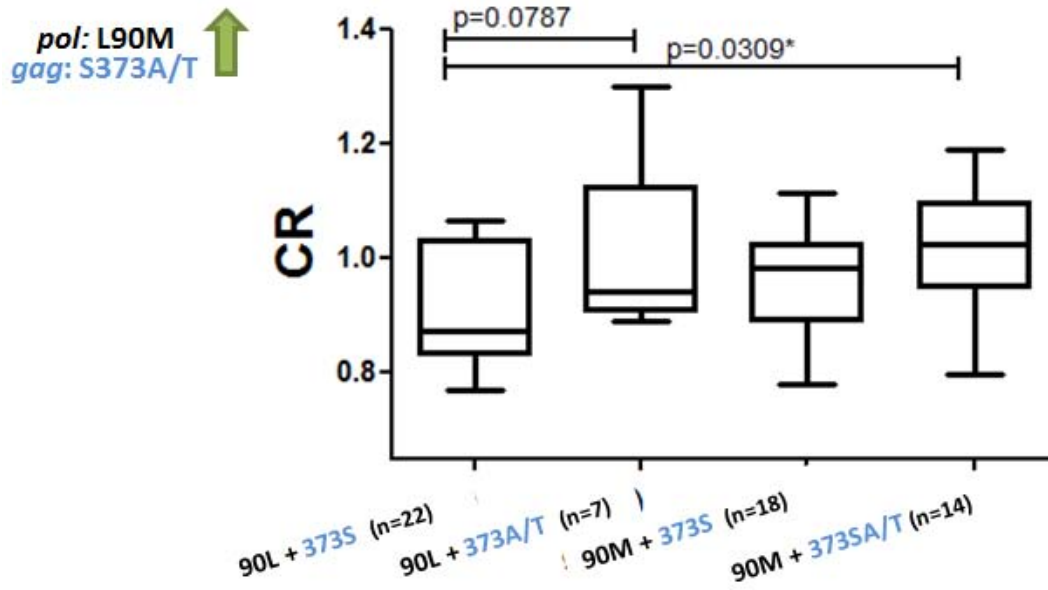


Figura 6. 21. Efecto de la combinación L 90-S373 sobre la capacidad replicativa viral. La presencia de la combinación de mutaciones L90M-S373A/T mostró el mayor efecto en el aumento de la CR. La sola presencia de la mutación S373 mostró tendencia al aumento de la CR. Prueba de U de Mann-Whitney, GraphPad Prism 6.0

Estas observaciones sugieren la interacción entre múltiples presiones selectivas, mostrándose un efecto compensatorio en la capacidad de replicación. En el contexto de exposición a IPs, se seleccionan aminoácidos específicos en *gag* que difieren de aquéllos seleccionados en individuos vírgenes a tratamiento (S373Q).

Para el siguiente análisis, se tuvo el siguiente razonamiento: Considerando el efecto compensatorio del par de mutaciones L90M-S373A/T, y que los pacientes con resistencia a IPs mostraron una menor CR en comparación con individuos vírgenes a tratamiento (Figura 6.3). Se buscó analizar si el efecto compensatorio de este par de mutaciones es comparable con la capacidad replicativa de la cohorte de individuos vírgenes a tratamiento. La Figura 6.22 muestra que la presencia del par de mutaciones L90M-S373A/T hizo comparable la media de CR con aquélla de la cohorte virgen a tratamiento e incluso con la sola presencia de S373A/T. El resultado es muestra del efecto compensatorio de la mutación seleccionada en *gag* y es evidencia de que la exposición a IPs influye en la selección de aminoácidos específicos.

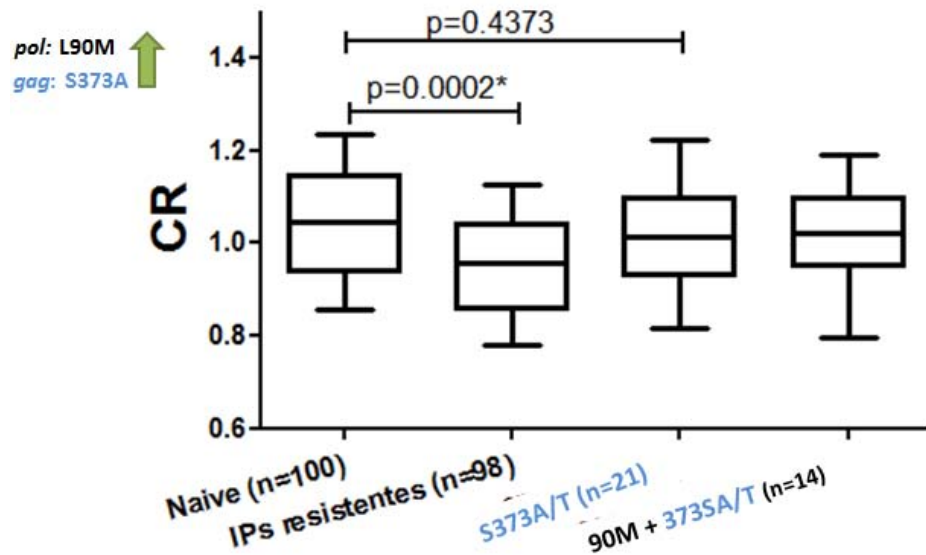


Figura 6.22. Comparación de la Capacidad Replicativa de los individuos con el par de mutaciones L90M-S373A/T y la Capacidad Replicativa de individuos vírgenes a tratamiento. La presencia de la combinación L90M-S373A/T mostró que la media de Capacidad Replicativa es comparable con aquella de individuos vírgenes a tratamiento. La gráfica muestra también la comparación general de la Capacidad Replicativa de los individuos con resistencia a IPs vs vírgenes a tratamiento $p=0.0002$ con fines ilustrativos, tomada de la gráfica 6.1. Prueba de U de Mann-Whitney, GraphPad Prism 6.0.

Para limpiar el efecto de este par de mutaciones, se hizo la corrección por la presencia de la mutación A431V que mostró tener efecto significativo en la disminución de la CR. Aunque el número de individuos en los grupos de comparación es pequeño, es clara la tendencia de estas mutaciones en compensar la CR ($p=0.0589$) (Figura 6.23).

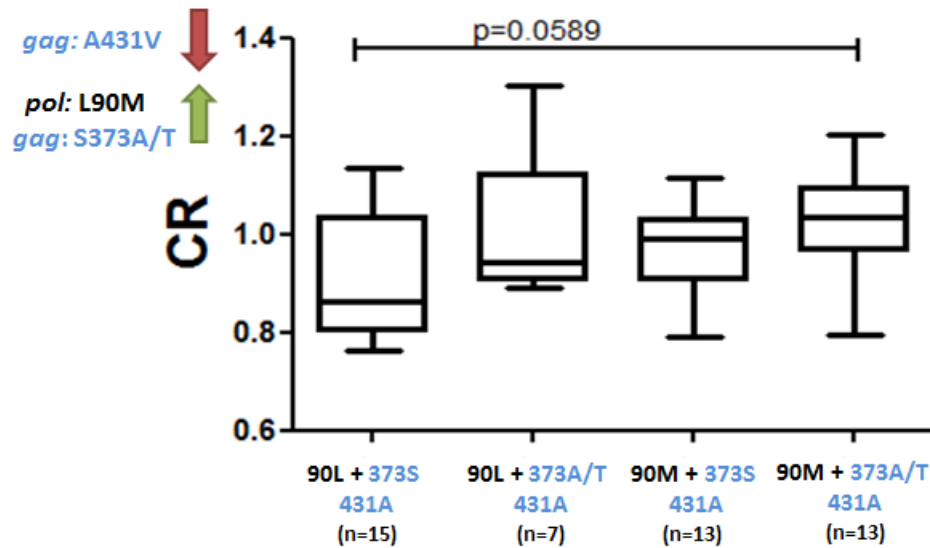


Figura 6.23. Efecto compensatorio del par de mutaciones L90M-S373A/T sobre la capacidad replicativa c orregido p or A431V. La pr esencia de l a c ombinación L 90M-S373A/T mostró tendencia al aumento de la Capacidad Replicativa cuando no se considera el efecto negativo de la mutación A431V. Prueba de U de Mann-Whitney, GraphPad Prism 6.0.

A continuación se exploró el contexto bajo el cual, la mutación S373A/T muestra efecto compensatorio. Considerando el número de mutaciones de resistencia en la proteasa y el número de mutaciones en gag se evaluó el efecto de la presencia de S373A/T. Los análisis también se corrigieron por la presencia de A431V. No se observó efecto significativo en ningún caso; sin embargo, la tendencia compensatoria de S373A/T bajo cierto número de mutaciones tanto en la proteasa como en gag fue clara (Figura 6. 24). Al hacer una búsqueda de patrones de mutaciones para los cuáles existe el efecto compensatorio de S373A/T no se encontró ninguno en particular. Este resultado sugiere que la selección de esta mutación responde a las variaciones en proteasa que la hacen resistente sin importar la naturaleza de las mutaciones que coexisten en la misma proteasa y en el sustrato gag.

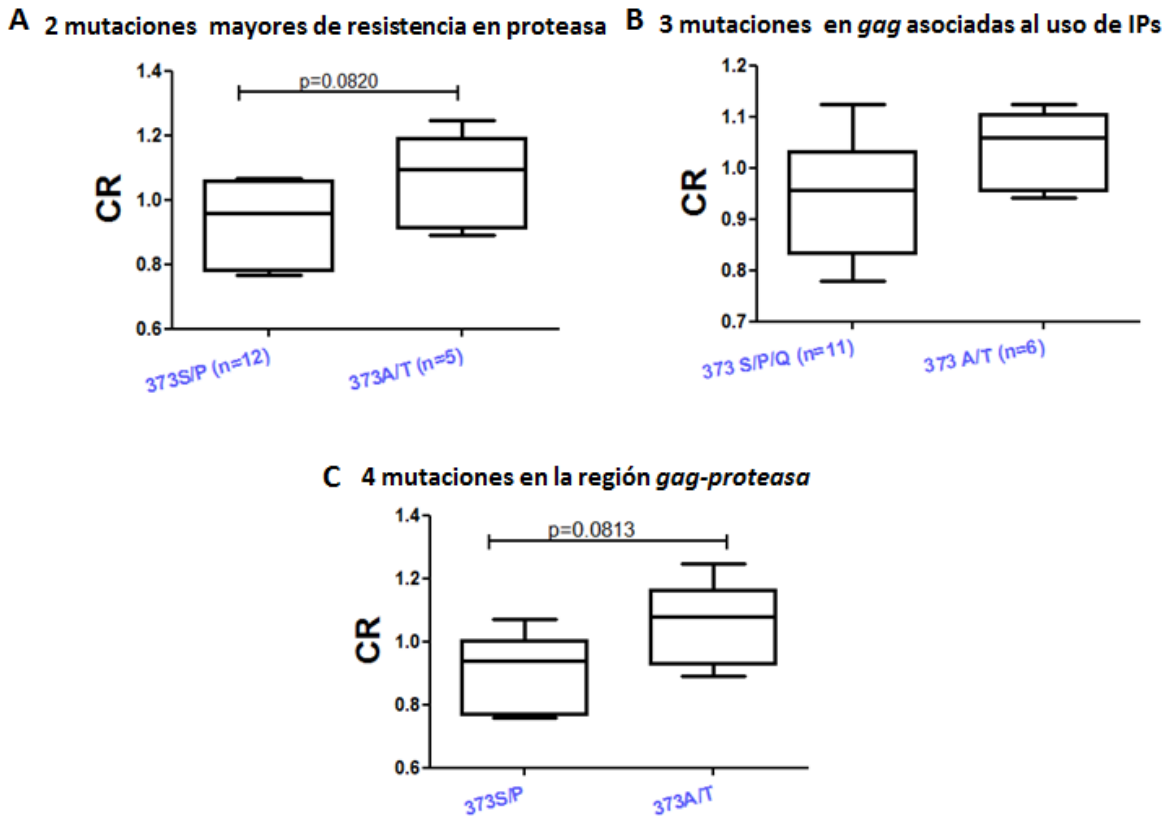


Figura 6.24. Efecto compensatorio de la mutación S373A/T sobre la capacidad replicativa en diferentes grupos de mutaciones en la región *gag-proteasa*. Bajo cierto contexto de mutaciones sin importar su naturaleza, se observó la tendencia compensatoria de la mutación S373A/T. El análisis se corrigió por la presencia de A431V. Prueba de U de Mann-Whitney, GraphPad Prism 6.0.

6.9 Variabilidad de los motivos de corte en *gag*: Relación con las mutaciones en *gag-proteasa* asociadas a exposición a IPs e impacto en la capacidad replicativa.

Los reportes de mutaciones en *gag* asociadas al uso de IPs han mostrado enriquecimiento dentro de los motivos de corte de la proteasa viral [67, 69, 86-88, 90, 97, 101, 103-107]. Los motivos de corte dentro del precursor polipeptídico son los que reconoce la enzima durante el proceso de maduración y es factible pensar que el grado de polimorfismo en estos motivos varía en respuesta a una proteasa resistente.

El siguiente análisis tuvo como finalidad hacer una descripción de los motivos de corte en la cohorte de estudio y compararlos con lo previamente reportado, y la cohorte de individuos vírgenes a tratamiento. Posteriormente se buscó una relación entre la CR, las mutaciones en la región *gag-proteasa* y la variabilidad de los motivos de corte en la cohorte de estudio.

La Figura 6.25 muestra la comparación de la variabilidad de los motivos de corte en tres grupos:

- Variabilidad natural del VIH-1 subtipo B, de acuerdo a lo reportado por Fun et al. 2012 [50].
- Variabilidad de los motivos de corte en la cohorte de individuos vírgenes a tratamiento tomada del proyecto “Impacto de las mutaciones seleccionadas por las moléculas H LA-I sobre la capacidad replicativa del Virus de Inmunodeficiencia Humana” (Soto-Nava et al, datos no publicados) (n=100).
- Variabilidad de los motivos de corte de individuos con resistencia a inhibidores de proteasa (n=103).

	MA						CA				
Amino ácido en HXB2	V	S	Q	N	Y	//	P	I	V	Q	N
Posición	128	129	130	131	132		133	134	135	136	137
% Variación de Referencia	3.5	*	4.3	*	3.5		*	*	0.9	0.9	*
% Variación vírgenes a TAR	8.7	*	3.7	*	6.3		*	2.5	*	1.3	1.3
% Variación resistencia a IPs	13	*	5.8	*	6.8		*	1	*	*	*
	CA						p2				
Amino ácido en HXB2	A	R	V	L	A	//	E	A	M	S	Q
Posición	360	361	362	363	364		365	366	367	368	369
% Variación de Referencia	3.5	*	4.3	*	3.5		*	*	0.9	0.9	*
% Variación vírgenes a TAR	8.7	*	3.7	*	6.3		*	2.5	*	1.3	1.3
% Variación resistencia a IPs	*	1	11	1	*		*	*	*	4	7
	p2						NC				
Amino ácido en HXB2	S	A	T	I	M	//	M	Q	R	G	N
Posición	373	374	375	376	377		378	379	380	381	382
% Variación de Referencia	36.3	32.6	42.7	23.6	1.8		5.5	*	40.9	5.5	2.1
% Variación vírgenes a TAR	42.7	32	61.3	16	*		*	*	33.3	8	2.7
% Variación resistencia a IPs	53	47	52	17	1.9		1.9	*	41	2.9	*
	NC						p1				
Amino ácido en HXB2	E	R	Q	A	N	//	F	L	G	K	I
Posición	428	429	430	431	432		433	434	435	436	437
% Variación de Referencia	2.3	3.5	*	0.5	*		*	0.1	*	6.3	5.5
% Variación vírgenes a TAR	6.67	4	2.67	1.33	*		*	*	*	8	8
% Variación resistencia a IPs	7.8	5.8	*	22	*		*	*	*	16	13

Amino ácido en HXB2	p1					//					
	R	P	G	N	F		L	Q	S	R	P
Posición	444	445	446	447	448		449	450	451	452	453
% Variación de Referencia	*	0.1	*	*	*		9.1	*	22.8	*	8.4
% Variación vírgenes a TAR	*	*	2.7	*	1.33		10.7	*	34.7	9.33	12
% Variación resistencia a IPs	*	*	*	*	*		20	*	19	*	30

Figura 6.25. Comparación de la variabilidad de los motivos de corte a lo largo de Gag en secuencias de pacientes con resistencia a IPs y pacientes vírgenes a tratamiento antirretroviral. Las celdas en color rosado resaltan las posiciones en las que se observó mayor variabilidad en secuencias de pacientes con resistencia a IPs. Se muestran los aminoácidos consenso de las posiciones en los sitios de corte para la secuencia de referencia HXB2. Se compara la variabilidad entre pacientes con resistencia a IPs (n=103), pacientes vírgenes a tratamiento antirretroviral del CIENI, INER (n=100) y variabilidad en cohorte de referencia de pacientes vírgenes a TAR de acuerdo al reportado por Fun et al [50]. *Indica posiciones en donde no hay variación del aminoácido.

El motivo de corte más polimórfico fue p2-NC seguido de p1-p6, NC-p1, MA-CA y CA-p2. En general, el grado de polimorfismo en los motivos de corte fue mayor en la cohorte con resistencia a IPs, eg. [V362](#), [S373](#), [A374](#), [A431](#), [K436](#), [I437](#), [L449](#), [P453](#). De manera interesante, la mayoría de estas posiciones coinciden con las posiciones que han sido asociadas en la literatura a la exposición a IPs: [A431](#), [K436](#), [I437](#), [L449](#) y [P453](#) y que explican la adaptación viral en respuesta a una proteasa resistente. Resalta también la posición S373, cuya mutación [S373A/T](#) mostró efecto compensatorio en la CR de acuerdo a los resultados expuestos arriba y es la responsable del mayor grado de variabilidad en esta posición.

El siguiente análisis se enfocó en la búsqueda de la relación entre el % de variabilidad y la CR, así como la relación de este porcentaje de variación y la presencia de mutaciones en la región *gag-proteasa*. El porcentaje de variabilidad en los motivos de corte para cada individuo se calculó con el número de variaciones totales respecto del consenso, en un total de 50 posibilidades (10 aminoácidos en los 5 motivos de corte).

No se observó correlación entre el porcentaje de variación de los motivos de corte y la CR (Figura 6.26). Sin embargo, resulta muy interesante que se obtuvo una correlación significativa entre el número de mutaciones de resistencia en proteasa ($p=0.0023$), mutaciones en *gag* asociadas al uso de IPs ($p<0.0001$) y ambas ($p<0.0001$), con el porcentaje de variación de los motivos de corte (Figura 6.27). Los resultados sugieren que *gag*, en especial los motivos de corte, se adaptan al

grado de resistencia a inhibidores de proteasa, entre mayor número de mutaciones de resistencia mayor es la variación en los motivos de corte, por esta razón probable que la correlación de la variación en estos los motivos de corte con la CR, no haya podido establecerse, ya que la CR es un reflejo de la adaptación viral dependiendo del grado de mutaciones presentes para cada individuo.

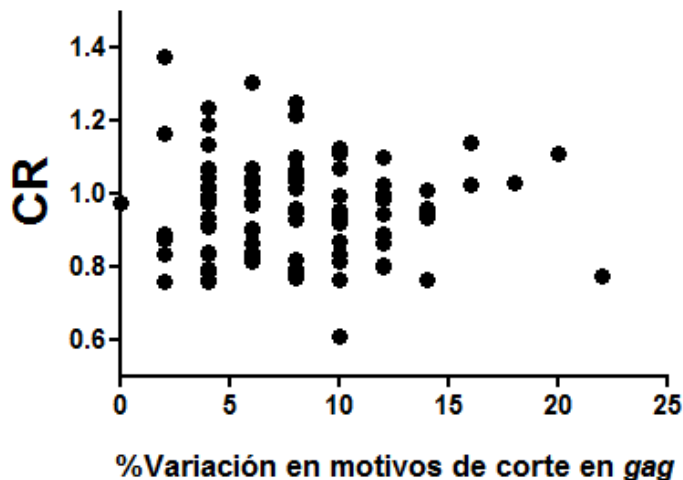
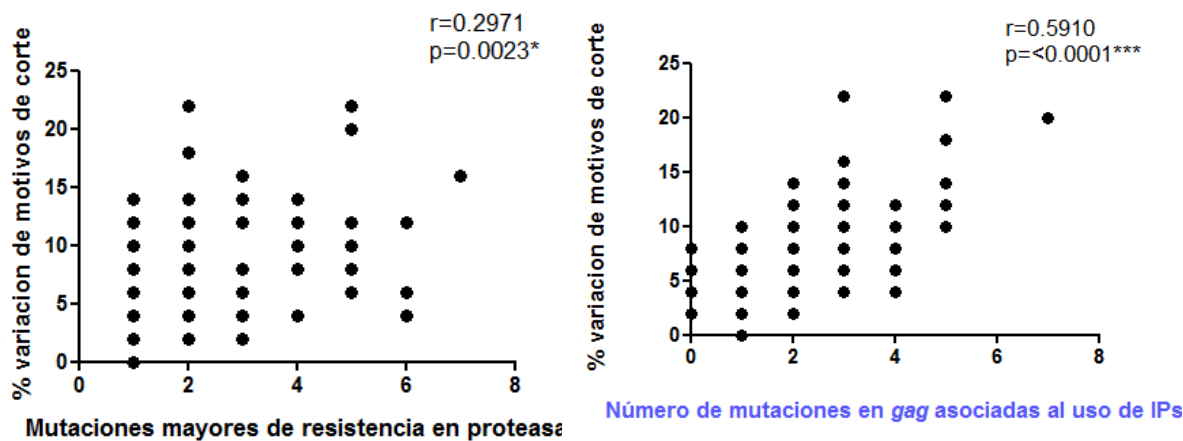
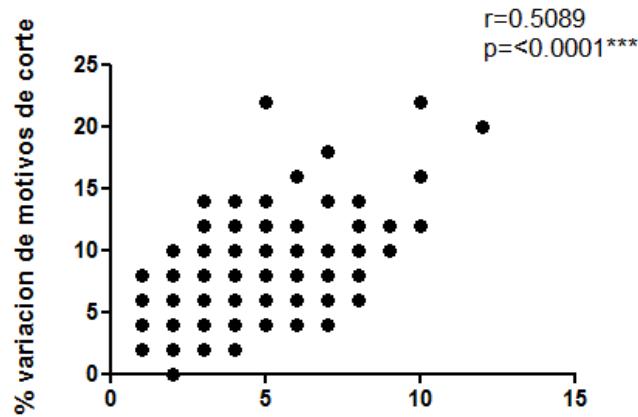


Figura 6.26. Correlación entre el porcentaje de variación de los motivos de corte y la capacidad replicativa. No se observó correlación entre el porcentaje de variación de los motivos de corte en *gag* y la Capacidad Replicativa. Coeficiente de correlación de Spearman, GraphPad Prism 6.0.





Mutaciones de resistencia en proteasa y asociadas a IPs en gag

Figura 6.27. Correlación entre el porcentaje de variación de los motivos de corte con el número de mutaciones de resistencia en proteasa, número de mutaciones en gag asociadas a IPs y ambas. Se observó correlación significativa entre el porcentaje de variación de los motivos de corte en gag y el número de mutaciones de resistencia en la proteasa, las mutaciones asociadas a IPs en gag y la suma de ambas. Coeficiente de correlación de Spearman, GraphPad Prism 6.0.

De acuerdo a la Figura 6.27, el porcentaje de variación responde en mejor medida a los cambios mutacionales en gag que a la misma proteasa resistente a IPs. Esta correlación más significativa en gag también podría explicarse porque la mayoría de las mutaciones en gag asociadas al uso de IPs, se encuentran justamente en los motivos de corte, e.g. [A431](#), [K437](#), [I437](#), [P453](#).

6.10 Descripción de los virus por cuartiles de capacidad replicativa

Como parte de los últimos análisis, se tomó a todos los virus incluidos en la cohorte y se dividieron en cuartiles de acuerdo al valor de CR. Se hizo un análisis descriptivo del cuartil alto, y se comparó con el cuartil bajo para extremar grupos. Las variables analizadas se definieron tomando en cuenta los resultados mostrados hasta ahora (Tabla 6.4).

Tabla 6.4. Descripción y comparación entre el Cuartil con los valores más altos de Capacidad Replicativa y el Cuartil con los menores valores de la cohorte de estudio.

	Cuartil alto	Cuartil bajo	Exacta Fisher
Mediana de mutaciones mayores de resistencia en proteasa	2	3	-
% L90M	64	48	-
Mediana de mutaciones en gag asociadas a IPs	2	2	-
% A431V	8	36	p=0.0374
% R76K	44	76	ns
Mediana de número de posiciones bajo presión selectiva positiva	5	5	-
% S373A/T	32	8	p=0.0673
% de variación de motivos de corte en gag	8	8	-

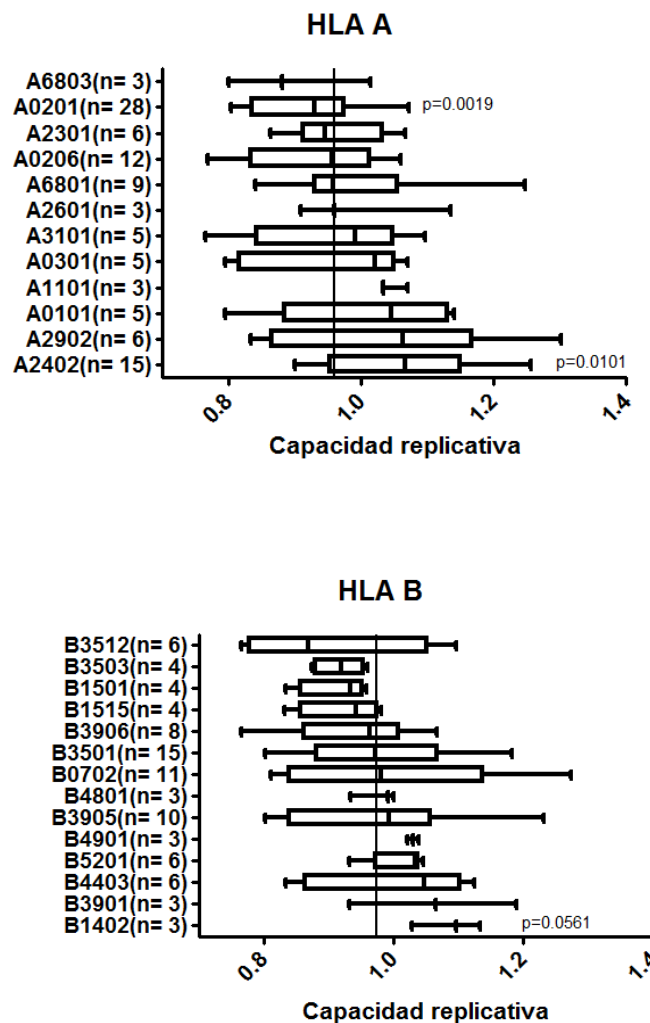
La mediana del número de mutaciones asociadas al uso de IPs tanto en proteasa como en *gag* fue similar en ambos grupos (Tabla 6. 4). La mediana de las posiciones bajo presión selectiva positiva fue la misma en ambos cuartiles. Sin embargo, el porcentaje de **S373A/T** fue claramente superior en el cuartil con los mayores valores de CR (32 vs 8% p=0.0374). De manera opuesta, la mutación **A431V** estuvo enriquecida en los individuos con los menores valores de CR (8 vs 36% p=0.0673), al igual que la mutación **R76K** (44 vs 76%) que como se describió en la Figura 6.13, mostraron efecto aditivo en la disminución significativa de la CR. El porcentaje de variación en los motivos de corte fue el mismo dada la similitud en el número de mutaciones tanto en proteasa como en *gag* (Ver correlación de la Figura 6. 27). Los resultados sugieren que las diferencias observadas en la CR dentro de los individuos expuestos a IPs, se deben a la presencia o ausencia de mutaciones específicas que son un reflejo de la posible interacción de la múltiple presión selectiva bajo la cual, está sujeta la cohorte de estudio.

6.11 Presión Selectiva mediada por HLA-I

Esta sección, trata de evidenciar y analizar la interacción de mutaciones asociadas a HLA-I características de la cohorte de estudio con la capacidad replicativa de virus con resistencia a IPs. Primero se muestra el análisis general del efecto de alelos HLA-I sobre CR, para después mostrar un análisis más específico sobre las mutaciones que presentaron efecto en la CR y su posible relación con alelos HLA-I.

La tipificación de los alelos HLA-I de cada individuo se hizo de acuerdo a la metodología descrita a partir de plasma sanguíneo. La cantidad de DNA que se encuentra en plasma es pequeña y se observó que durante la reacción de PCR, existía una amplificación preferencial para alguno de los alelos resultando en un alto grado de homocigosis. Dados estos retos metodológicos, fue posible tipificar a 56 de los individuos de la cohorte.

La Figura 6. 28 muestra el efecto de la presencia de los alelos HLA-I con una frecuencia mayor a $n=3$, sobre la capacidad replicativa. Se encontró asociación de los alelos A*24:02 ($p=0.0101$), B*14:02 ($p=0.0561$) y C*08:02 ($p=0.0561$) con valores mayores de CR y A*02:01 ($p=0.0019$) asociado a valores menores de CR.



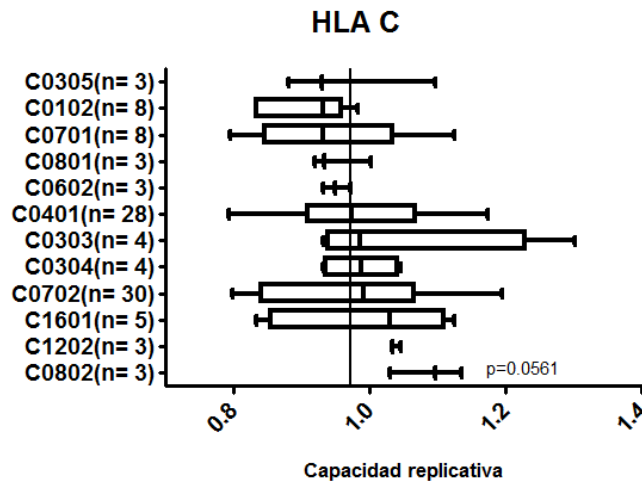


Figura 6.28. Efecto de alelos HLA-A, HLA-B y HLA-C sobre la capacidad replicativa Viral. Se muestra el efecto de la presencia de alelos HLA-A, superior izquierda, HLA-B superior derecha y HLA-C inferior sobre la capacidad replicativa de las 56 tipificaciones de la cohorte de estudio. Se grafican los alelos que tuvieron frecuencia mayor a $n=3$, la línea sobre la gráfica indica la mediana de Capacidad Replicativa. A*24:02, B*14:02 y C*08:02 con asociación a alta Capacidad Replicativa y A*02:01 con valores menores de Capacidad Replicativa.

6.11.1 Interacción entre múltiples presiones selectivas: Doble ventaja viral.

La Figura 6.29 resume los resultados que mostraron ser evidencia de interacción entre múltiples presiones selectivas, resultando en una doble ventaja viral con un aumento significativo en la capacidad de replicación viral.

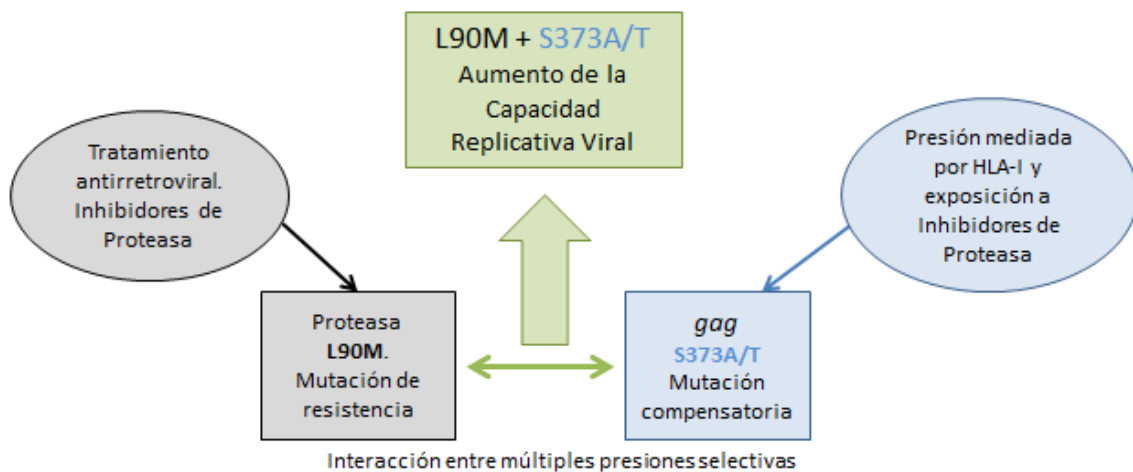


Figura 6.29. Interacción entre múltiples presiones selectivas. La selección de la mutación de resistencia L90M en proteasa direcciona la selección preferencial de la mutación S373A/T en gag. La mutación es blanco del sistema inmunológico y reconocido por Linfocitos T CD8+ citotóxicos dada la selección positiva en la posición. La presencia de ambas mutaciones induce un mecanismo compensatorio en la Capacidad de Replicación Viral.

Para buscar una posibles evidencia de las interacciones entre la presión selectiva inmunológica y farmacológica, se buscaron posibles alelos HLA-I dentro de los individuos de la cohorte de estudio, que podrían reconocer al epítope que contiene a la posición **S373A/T** y/o L90M. Para esto se hizo una búsqueda en la base de datos de los Álamos (<http://www.hiv.lanl.gov/>) [34]. Esta base de datos cuenta con epítopes que han sido probados experimentalmente frente al reconocimiento de alelos HLA-I específicos en todas las proteínas del VIH-1. No se encontraron epítopes reportados alrededor de la posición **S373**. Alternativamente, se utilizó la herramienta de predicción de epítopes, MotifScan, la cual permite buscar motivos predichos de reconocimiento de alelos HLA para los cuales existe información sobre las características químicas de los péptidos que reconocen, a lo largo de una secuencia proteica en el VIH. La herramienta resulta útil para la prueba de motivos de reconocimiento de alelos HLA-I cuya información es escasa y han sido poco caracterizados, como es el caso de alelos amerindios. Al conocerse las características químicas del péptido es posible predecir posibles motivos de reconocimiento para los alelos HLA de la cohorte. De acuerdo a este análisis se obtuvo que los alelos A*03:01, A*31:01, B*35:01 y B*35:03 presentes en la cohorte de estudio en distintas frecuencias, podrían reconocer epítopes que contienen a la posición **S373**. Más aún, de acuerdo a la herramienta Epitope Location Finder que prueba epítopes frente a HLA-I candidatos, se encontró que todos éstos alelos son potencialmente capaces de reconocer a la variante mutante **S373A/T**. (Figura 6.30).

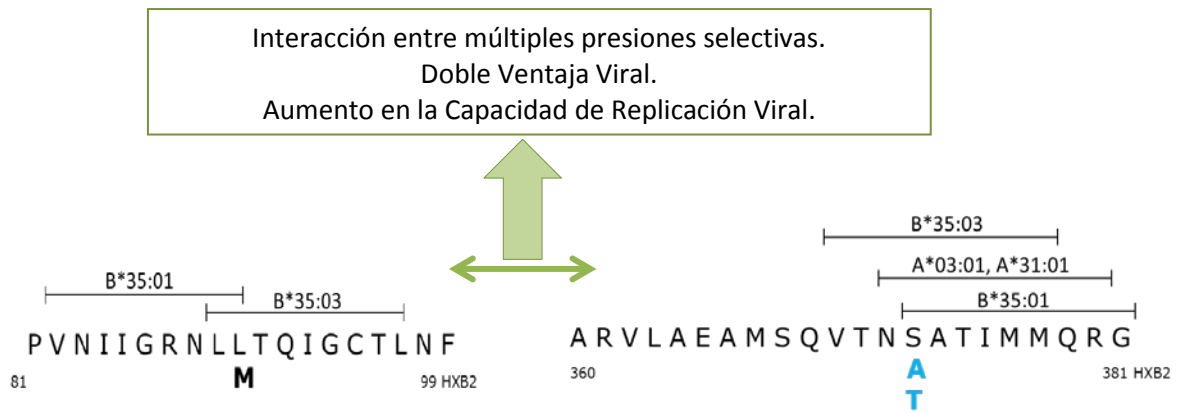


Figura 6.30. Alelos característicos de la cohorte que reconocen epítopes dentro del contexto L90M y S373A/T con evidencia de interacción entre múltiples presiones selectivas. Se muestra del lado izquierdo, el epítope que contiene la mutación de resistencia L90M en proteasa y los alelos HLA de la cohorte que pueden reconocerlo. El lado derecho muestra el epítope en el contexto S373A/T con los alelos HLA de la cohorte que pueden reconocerlo. En la parte media se recalca la interacción entre ambas mutaciones que resulta en el aumento de la Capacidad Replicativa confiriendo ventaja viral.

Por otro lado, realizando el mismo procedimiento pero aplicado a la región de la proteasa viral que contiene la posición L90, se encontró que también los alelos B*35:01 y B*35:03 pueden reconocer epítopes que contengan dicha posición. Sin embargo, a diferencia de la posición S373A/T en *gag*, la mutante L90M no puede ser reconocida por ninguno de estos alelos.

Este resultado tiene implicaciones importantes desde el punto de vista de control virológico. La mutación L90M de resistencia a IPs, además de ser la mutación más frecuente en México, una vez que se ha seleccionado, podría escapar al reconocimiento por parte del sistema inmunológico. Aunado a ello, la exposición a IPs ha mostrado selección en la posición S373 en *gag*, la cual se identificó también como un blanco del sistema inmunológico dado el posible reconocimiento por alelos HLA que forman parte de la cohorte de estudio (A*03:01, A*31:01, B*35:01 y B*35:03), siendo además una posición identificada como bajo presión selectiva positiva. Más aún, la posición S373 ha mostrado efectos compensatorios en la CR en individuos vírgenes a tratamiento, pero con la selección de un aminoácido distinto (S373Q). El efecto observado en individuos expuestos a IPs podría ser evidencia de la interacción entre múltiples presiones selectivas que dirige la selección de aminoácidos distintos y que además favorecen al virus reflejado en

valores más altos de CR. Esta compensación hizo comparable la CR con aquella de individuos vírgenes a tratamiento (Figura 6.22).

Al analizar la frecuencia de alelos HLA presentes en los individuos que tenían la mutación **S373A/T** (tipificación de 19 de los 21 individuos positivos a **S373A/T**) se encontró que el 42% de ellos poseían uno o más de los alelos candidatos que pueden reconocer este epítipo conteniendo **S373** (A*03:01, A*31:01, B*35:01 y B*35:03). De este porcentaje, resultó muy interesante que el 62% se encontró en el cuartil con los valores mayores de capacidad replicativa de la cohorte. Sin embargo, al comparar los valores de Capacidad Replicativa entre los individuos con alguno de estos alelos y los que no poseen ninguno, no se logró observar una diferencia significativa. Figura 6.25. La tipificación e inclusión de un mayor número de muestras es crucial para lograr poder estadístico.

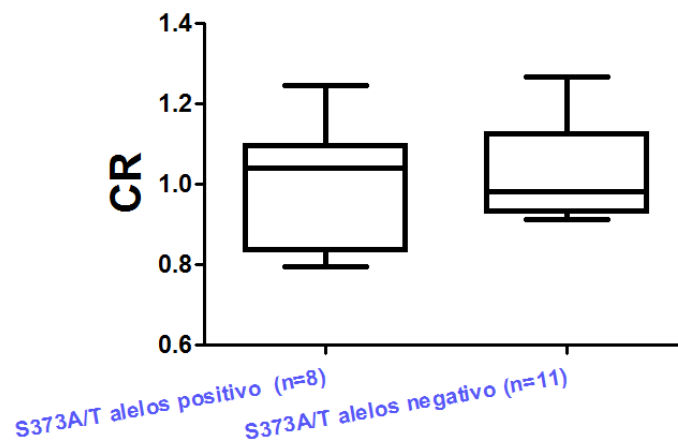


Figura 6.31. Efecto de la presencia de alelos HLA-B*35:01, B*35:03, A*03:01, A*31:01 en individuos con **S373A/T sobre la capacidad replicativa.** Se muestra el efecto de la presencia de los alelos A*03:01, A*31:01, B*35:01 y B*35:03 sobre la Capacidad Replicativa en individuos que presentan la mutación **S373A/T**. GraphPad Prism 6.0

Igualmente, el hecho de que el 58% restante de los individuos no tuvieran algún alelo HLA selector candidato, sugiere que la presión de selección de **S373A/T** podría ser exclusivamente farmacológica y que, como se ha mostrado previamente, su presencia tiene efectos compensatorios en la capacidad replicativa. Sin embargo, cuando existe la presencia conjunta de algún alelo que pueda reconocer el epítipo, la mutación puede constituirse como de escape inmunológico potenciando el efecto compensatorio y confiriendo doble ventaja viral (Figura 6.30).

Por otro lado, no se puede descartar la posibilidad de que existan otros alelos HLA típicamente amerindios, responsables de ejercer presión selectiva y que no hayan sido identificados por no existir información suficiente de su especificidad en las bases de datos.

6.11.2 Interacción entre múltiples presiones selectivas: Impacto negativo en la Capacidad Replicativa.

En el sentido opuesto, dado que observamos un efecto negativo en la CR por la presencia de [A431V](#), y siendo que esta mutación se ha reportado como mutación compensatoria en virus con exposición a IPs, se buscó una posible explicación enfocada a la búsqueda de alelos HLA-I, que pudiera explicar este efecto contrario en la cohorte de estudio.

De manera interesante, se encontró que existen alelos HLA con frecuencias relativamente altas en la cohorte que podrían reconocer el epítipo que contiene tanto a la variante wildtype como a la variante mutante: A*02:06, B*35:01, C*07:02 (Figura 6.32). Más aún, de los individuos que poseían la mutación y que tenían tipificación HLA disponible (13 de los 21 individuos), el 80% contó con al menos uno de los alelos candidatos. La comparación estadística de la CR en este grupo de análisis, no fue posible por el número insuficiente de individuos sin los alelos candidatos (n=2). Sin embargo, el resultado es interesante por sí mismo y que puede ser evidencia de control inmunológico en pacientes que seleccionan resistencia y que despiertan en el epítipo una respuesta más avida que ocasiona la disminución de la CR. De igual manera, cabe recordar que existen alelos HLA típicamente amerindios que no han sido descritos y que también podrían explicar este efecto negativo en la capacidad de replicación.

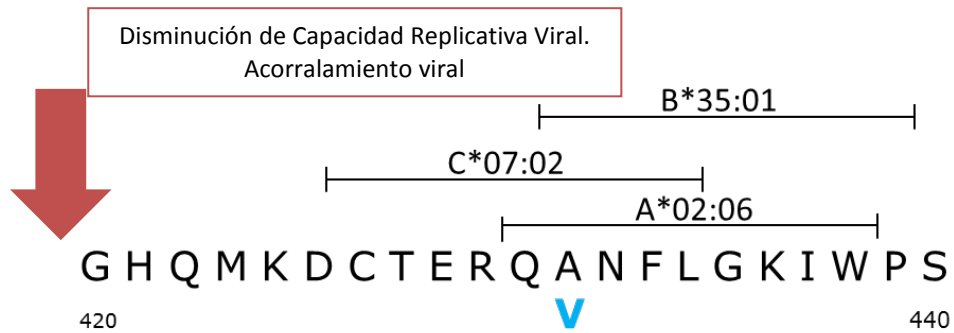


Figura 6. 32. A los HLA característicos de la cohorte que reconocen epítopes dentro del contexto A431V con evidencia de interacción entre múltiples presiones selectivas. Se muestra el epítipo que contiene a la mutación A431V, mutación asociada a la exposición IPs, con los alelos HLA dentro de la cohorte de estudio que pueden reconocerlo.

Resulta necesario la inclusión de una mayor cantidad de individuos tipificados que incluyan esta mutación para poder establecer una mejor asociación con los HLA-I, y observar diferencias significativas.

CAPÍTULO VII. DISCUSIÓN.

La respuesta citotóxica mediada por CTLs, definida y restringida por alelos HLA de clase I, es un mecanismo antiviral eficaz que implica la imposición de una fuerte presión selectiva sobre el VIH y que ha jugado un papel crucial en la variabilidad del virus desde el establecimiento de la epidemia [12, 58, 108]. Numerosos estudios se han enfocado al estudio de la evolución viral asociada a HLA-I; sin embargo, una vez que se inicia con un esquema de tratamiento antirretroviral, la evolución viral estará influenciada también por la presión selectiva farmacológica.

Con el acceso universal al tratamiento antirretroviral, las consecuencias negativas debidas al mal apego y la selección de mutaciones de resistencia son cada vez más frecuentes y representan un reto tanto para el control de la viremia como para la elección de un óptimo tratamiento. La elección de esquemas de tratamiento de rescate en individuos multi-drogo resistentes no es una tarea fácil y se complica en países de ingresos bajos-medios, donde las opciones de fármacos disponibles son limitadas [11, 13]. De manera óptima, el seguimiento clínico de individuos bajo esquemas de tratamiento antirretroviral debería seguir una frecuencia establecida y programada. Sin embargo, la realidad es que en un gran porcentaje de individuos, la identificación de virus resistentes y por tanto el control virológico, no es el adecuado. Los pacientes en muchas ocasiones mantienen cargas virales elevadas por periodos prolongados, lo que le permite al virus evolucionar en presencia no solo de la presión selectiva inmunológica, sino también de la presión farmacológica. De esta manera, el estudio de individuos en falla virológica permite explorar mecanismos de adaptación viral y su impacto en la capacidad de replicación en respuesta a ambas presiones selectivas. En este trabajo, se buscaron posibles interacciones entre estas presiones selectivas, que pudieran dar lugar a mecanismos de control virológico o de doble ventaja para el virus, con el objetivo de proponer estrategias que aprovechen estas interacciones para establecer esquemas de tratamiento más personalizados de acuerdo al contexto inmunogenético del individuo.

Así, el presente trabajo, contribuye al entendimiento de la evolución y adaptación viral en un contexto inmunogenético particular y frente a la exposición de

tratamiento antirretroviral. Así mismo, se estudió la capacidad replicativa de virus provenientes de 98 individuos mexicanos del Distrito Federal, infectados por VIH-1, clado B, que presentaban falla virológica con resistencia a inhibidores de proteasa. Se estudió la capacidad replicativa dependiente de la región *gag-proteasa* de cada individuo y a que existe una co-evolución del gen *gag* y una proteasa resistente al ser este gen sustrato natural de la enzima durante el proceso de maduración viral [43, 50]. Actualmente existen numerosos estudios que se han enfocado al estudio de la adaptación viral asociada al gen *gag*, en presencia de IPs. Se ha demostrado que en presencia de una proteasa resistente, *gag* co-evolucionan mediante la selección de mutaciones especialmente en los motivos de corte que son reconocidos por la proteasa, y que algunas de estas mutaciones, pueden incluso aportar al fenotipo de resistencia, e.g. la mutación [A431V](#) que se ha reportado como mutación de resistencia incluso en ausencia de mutaciones en la proteasa [67, 69, 86-88, 90, 97, 101, 103-107]. El proyecto se centró por tanto, en el estudio del impacto de ambas regiones del genoma mediante la construcción de virus quiméricos conteniendo la región *gag-proteasa* y donde la capacidad replicativa relativa viral, fue comparada con la capacidad replicativa de una cepa viral de referencia NL43.

Las características de la cohorte fueron representativas de la epidemia en México, donde existe un 80% de representatividad masculina [102]. Los parámetros clínicos de recuento de linfocitos T CD4+ y carga viral en plasma, fueron evidencia del estado crónico de la infección y el pobre control virológico por la resistencia al tratamiento antirretroviral (Tabla 6. 1). El rango de número de mutaciones de resistencia en proteasa fue amplio, con hasta 7 mutaciones de resistencia por individuo. Esto es un reflejo de la exposición prolongada a fármacos en los individuos en falla virológica, que provoca la selección continua de mutaciones y disminuye las opciones de tratamiento para los individuos.

El primer acercamiento al estudio de las secuencias incluidas en el estudio fue la construcción de un árbol filogenético para *gag* y la proteasa viral (Figura 6. 1). Se observó una población viral homogénea, sin la formación de clústers o agrupaciones asociados a características mutacionales o clínicas/demográficas de

cada individuo, que sugieren la ausencia de transmisión de virus entre los pacientes participantes. Esto indica que, aunque se seleccionen mutaciones de resistencia comunes en los virus como respuesta a esquemas similares de tratamiento antirretroviral, las vías mutacionales en cada virus son únicas, muy probablemente por la adaptación a otras presiones selectivas como la inmunológica. De igual manera, tampoco se formaron agrupaciones por niveles de células T CD4 en sangre o de carga viral, ya que estos parámetros dependen en gran medida del estado de falla virológica en los individuos. El árbol en cada caso, se probó con una significancia de 1000 réplicas de bootstrap que nos da un alto nivel de confianza en cuanto a relación de cercanía genética de los virus estudiados.

El segundo par de árboles (Figura 6.2) estuvo enfocado al control de calidad de las secuencias antes y durante los ensayos de capacidad replicativa. Este control de calidad por filogenia, permitió validar que la propagación de virus quiméricos es capaz de evaluar la capacidad replicativa de los virus resistentes presentes en el individuo al momento de la falla virológica. En efecto, al haberse utilizado un ensayo de capacidad replicativa con rondas múltiples de replicación, existía la posibilidad de evolución viral *in vitro*, al momento de construcción de los virus quiméricos que expresaban la región *gag-proteasa* de cada paciente, especialmente por la posible reversión de las mutaciones de resistencia en ambas regiones del genoma. Este control de calidad mostró que cada par de secuencias, antes y después de la construcción del correspondiente virus quimérico, se localizó en la misma rama del árbol. Al verificar la conservación de las mutaciones de resistencia por la obtención del genotipo de cada quimera, se comprobó que durante el ensayo de capacidad replicativa, los virus que se estudiaron fueron un reflejo de la población viral presente en cada individuo. Sin embargo, esta genotipificación a partir de los virus quiméricos construidos también nos permitió identificar reversión de algunas mutaciones de resistencia en la proteasa viral. El análisis de los electroferogramas en estos casos, mostró que las variantes virales con mutaciones de resistencia coexistían con variantes wild type, observándose como ambigüedad en las secuencias de los virus de plasma. En estos casos, durante la amplificación y propagación de virus quiméricos *in vitro*, hubo

selección de la cepa wild type. Estos virus fueron excluidos del estudio y se incluyeron únicamente las mutantes que no presentaran ninguna señal de ambigüedad en las secuencias de virus de plasma. En el caso del gen *gag*, el grado de polimorfismo en los virus quiméricos también disminuyó, por lo que sólo se consideraron virus con posiciones de mutaciones sin ambigüedades para evitar resultados espurios.

El primer acercamiento al análisis de la CR dependiente de la región *gag-pro*, comparó la adaptación de los virus de la cohorte de estudio con una cohorte control de individuos vírgenes a tratamiento antirretroviral. Esta cohorte (n=100) había sido previamente caracterizada en el marco del proyecto “Impacto de las mutaciones seleccionadas por las moléculas HLA-I sobre la capacidad replicativa del Virus de Inmunodeficiencia Humana” (Soto-Nava et al, datos no publicados). Este proyecto incluye a más de 600 virus de distintas partes de la República Mexicana; sin embargo, para este trabajo se seleccionó una muestra que consideró una distribución geográfica similar a la de la cohorte estudiada, con individuos del Distrito Federal y Estado de México. Es conocido que incluso dentro de la República Mexicana existe una distribución diferencial de alelos HLA-I de acuerdo a la región geográfica, y fue importante considerar una distribución alélica similar que hiciera comparables los grupos de estudio [25, 61].

En la Figura 6.3, se comparó la CR de esta cohorte control con la de individuos expuestos a inhibidores de proteasa. La CR de los virus de la cohorte estudiada fue significativamente menor. El resultado es esperado ya que la población viral posee en su genoma, un gran número de mutaciones seleccionadas por la presión selectiva farmacológica, y que en ausencia del fármaco selector, representan una desventaja para los virus, reflejándose en una menor capacidad replicativa relativa. Así mismo, *gag* se ha reportado como un gen cuyas mutaciones tienen alto impacto en la capacidad de replicación [31, 67, 109, 110]; y al existir una co-evolución de *gag* con una proteasa resistente a inhibidores de proteasa, la selección en *gag*, también pueden reflejarse en una CR menor en ausencia del fármaco antirretroviral.

De acuerdo a bases de datos que recopilan información sobre la selección de mutaciones de resistencia a las diferentes familias de fármacos antirretrovirales [83]. Se identificaron las mutaciones mayores de resistencia presentes en los virus de la cohorte estudiada (Figura 6.5). También se identificaron mutaciones menores o secundarias que se han reportado en la proteasa y que si bien, no aportan resistencia por sí mismas, son capaces de incrementar el fenotipo de resistencia y actúan como mutaciones compensatorias frente a la pérdida de CR asociada a la selección de mutaciones mayores de resistencia que se localizan en el sitio activo de la enzima [11, 73, 91].

La Figura 6.4 muestra el efecto de estas mutaciones secundarias en la CR, L10I/V, K20R, M36I, A71V/T/I. A pesar de estar presentes una o más de estas mutaciones por cada individuo, no se encontró un efecto compensatorio en la CR. Es posible que el análisis individual de cada secuencia, pudiera ser capaz de identificar el efecto compensatorio de estas mutaciones en un contexto mutacional particular y a lo largo del tiempo, es decir, evaluando si la selección de alguna de estas mutaciones sirvió como mecanismo compensatorio en esa cepa viral en particular, una vez adquiridas mutaciones de resistencia al tratamiento. Sin embargo, en el contexto de la evolución real de los virus de la población de estudio, no se observaron efectos significativos en la CR.

En cuanto a las mutaciones mayores de resistencia en proteasa, existen a la fecha trece mutaciones clasificadas en este grupo, cuya presencia por sí sola disminuye la susceptibilidad a IPs (Figura 1.15). De estas trece, doce se encontraron en la cohorte con diferentes frecuencias, siendo la mutación L90M la más frecuente (Figura 6.5). Esta diversidad de mutaciones puede ser un reflejo del tiempo prolongado en el que los individuos permanecen en falla virológica permitiendo que el virus seleccione un mayor número de mutaciones que le confieren resistencia. Esta exposición prolongada dificulta la selección de futuros esquemas de tratamiento, y a que como se mencionó previamente, estas mutaciones de resistencia se localizan en el sitio activo de la enzima y una sola mutación confiere resistencia cruzada a más de un fármaco de la familia. Ejemplo de ello es la misma mutación L90M que confiere resistencia a 7 de los 9 inhibidores de proteasa

aprobados por la FDA incluido Lopinavir/ritonavir (KALETRA) que es el IP mayormente prescrito en México [15].

Un buen acercamiento para estudiar el efecto de las mutaciones asociadas a la exposición a IPs sobre la CR, es el análisis de la ausencia-presencia de cada una de ellas. Al tratarse del estudio de dos regiones distintas en el genoma viral, el análisis se hizo tanto para la proteasa como para el gen *gag* de acuerdo al código de colores descrito en los resultados. El análisis de las mutaciones mayores de resistencia en proteasa, mostró a la mutación G48V asociada con una disminución significativa de la CR (Figura 6.6). Sin embargo, la frecuencia de esta mutación fue baja, observándose en 4 de los 98 virus analizados. Es posible que en este caso el efecto en la disminución de la CR estuviera asociado a la presencia de otras mutaciones; y en efecto, cada uno de estos virus poseía además, la mutación [A431V](#) la cual se asoció con un efecto significativo de disminución de la CR (Figura 6.11 y 6.13). La mutación de resistencia más frecuente, L90M, mostró una asociación con el aumento de la CR (Figura 6.7). Esta mutación, en conjunto con M46I/L, son las que presentan el mayor porcentaje e impacto en cuanto a resistencia transmitida en México [23], y es importante considerar que, según las observaciones del presente trabajo, esta mutación puede además conferir ventaja al virus, lo que en parte explicaría la mayor factibilidad de transmisión sin reversión.

Resultó interesante no obtener una correlación ni una diferencia significativa entre el número de mutaciones mayores de resistencia en proteasa por individuo, y la CR (Figuras 6.8 y 6.9). En la proteasa, se ha reportado que la selección de múltiples mutaciones de resistencia tiene consecuencias negativas en la capacidad de replicación, fuera del contexto del tratamiento antirretroviral, ya que se localizan dentro del sitio activo de la enzima. Sin embargo, estos estudios sólo han considerado a la proteasa viral y no otras regiones del genoma [42, 76, 79, 82, 111]. Nuestro proyecto de investigación consideró además, la influencia del gen *gag* en la CR y nuestros resultados sugieren que podrían existir mecanismos compensatorios, que muy probablemente se encuentran fuera de la proteasa, explicando las diferencias de capacidad replicativa dentro de la cohorte de estudio.

El impacto de la selección de mutaciones en *gag* frente a la exposición a IPs es de gran importancia para estudiar la adaptación viral en presencia de esta familia de fármacos dada la co-evolución bien documentada de este gen frente a una proteasa resistente. A la fecha, se ha reportado un gran número de mutaciones en *gag* que se han asociado a la exposición a IPs, algunas de ellas se han reportado como mutaciones compensatorias, otras más, como mutaciones que aportan al fenotipo de resistencia y otras como [A431V](#) que aportan resistencia por sí mismas y compensan los efectos negativos en la capacidad de replicación [67, 69, 86-88, 90, 97, 101, 103-107]. Muchas de estas mutaciones se han reportado en los motivos que reconoce la proteasa para escindir a cada una de las proteínas de *gag* durante el proceso de maduración viral. Los motivos de corte que han mostrado la mayor cantidad de cambios se concentran hacia la porción final del gen p2p7p1p6. En nuestro estudio, posterior a una búsqueda exhaustiva en la literatura, se caracterizaron las mutaciones asociadas a exposición a IPs presentes en la cohorte. No se encontró representación de todas las mutaciones que han sido reportadas, sin embargo hubo un número importante de ellas: [R76K](#), [T81A](#), [V128T/A](#), [H219P/Q](#), [A431V](#), [K436E/R](#), [I437T/V](#), [P449L/F/P/V](#), [P453A/L/T](#), [E468G/S](#) (Figura 6.10).

El estudio de la presencia-ausencia de cada una de estas mutaciones y su impacto sobre la CR, mostró que la mutación [A431V](#) tiene impacto significativo en la disminución de la CR (Figura 6.11 y 6.13). Considerando la combinación con la mutación más frecuente [R76K](#), que también mostró tendencia (aunque no con diferencia significativa) a la disminución de la CR (Gráfica 6.12), se observó que la mutación [A431V](#) es la responsable de una disminución significativa en la CR pero que en combinación con [R76K](#), el efecto es mayor (Gráfica 6.13). Al hacer la corrección por [A431V](#) se observó que la sola mutación [R76K](#) no tiene efecto en la CR, y es posible que el efecto de la presencia [A431V + R76K](#) se deba a interacciones a nivel de proteína que se reflejan en una disminución en la capacidad de replicación en la cohorte. Estudios de modelaje *in silico* podrían ayudar al entendimiento de este efecto e identificar posibles interacciones. Respecto a la mutación [A431V](#) se sabe que es parte del motivo de reconocimiento para el corte p7 (NC)-p1. Cada motivo de corte en *gag* tiene una tasa de escisión

distinta y se clasifica de acuerdo a velocidad de corte en motivos primarios, secundarios y terciarios para completar el proceso de maduración viral. El corte de p7 (NC)-p1 es secundario y no es considerado como un paso limitante en la cascada de maduración. La mutación [A431V](#) es considerada como mutación compensatoria en exposición a IPs; sin embargo, en nuestra cohorte de estudio, se asoció con un efecto significativo en la disminución significativa de la CR [87, 90, 97]. Este resultado sugiere que podrían existir mecanismos adicionales que influyen en la selección de esta mutación reflejándose en una CR menor. Ejemplo de ello puede ser la influencia de la presión selectiva inmunológica, donde alelos específicos que podrían reconocer al epítopo conteniendo a la posición [A431](#) pueden derivar en un reconocimiento más ávido que de secuencia un a citotoxicidad más eficiente (Figura 6.32). No existen alelos reportados en bases de datos que reconozcan un epítopo incluyendo esta posición, sin embargo en nuestro estudio identificamos posibles alelos selectores que son característicos de nuestra cohorte, Ver mas adelante, sección Interacción entre múltiples presiones selectivas.

El análisis de correlación entre las mutaciones en *gag* asociadas a IPs y la CR no mostró resultados significativos (Figura 6.14). Sin embargo, al comparar grupos de individuos con diferente número de mutaciones en *gag*, se observó de manera general, que la selección de incluso 1 mutación, probablemente por la presencia de [A431V](#), tiene un efecto negativo en la CR $p=0.0088$ (Figura 6.15). No se identificó ningún patrón de mutaciones en *gag* que explicara las diferencias entre cada grupo, sin embargo la mayoría de ellas se localizan en el gen de los motivos de corte del gen. El resultado sugiere que son las mutaciones seleccionadas en *gag* las que tienen un mayor impacto en la capacidad de replicación.

Los resultados descritos han incluido mutaciones previamente reportadas en *gag*. Para identificar posiciones adicionales características de la cohorte de estudio, se utilizó una herramienta bioinformática evolutiva para evaluar la presencia de presión selectiva en *gag*. Se utilizó un modelo de razón de sustituciones sinónimas y no sinónimas para cada codón en el alineamiento de las secuencias de *gag* resultando en un total de 15 posiciones bajo presión selectiva positiva ($p<0.5$),

Tabla 6.2). De acuerdo a estos resultados y en conformidad con la literatura, se observó que la región más variable se concentró hacia la porción final del gen con una mayor proporción de sitios bajo presión selectiva positiva en la proteína p6. La proteína de Matriz fue la proteína más conservada dada su importancia funcional y estructural (Figura 6.16) [58, 67].

La comparación de las 15 posiciones bajo presión selectiva positiva con aquellas que resultaron del análisis para la cohorte control virgen a tratamiento, da un buen acercamiento al entendimiento de la presión selectiva inmune y farmacológica que distingue a la cohorte estudiada. La Figura 6.17 mostró que fue posible identificar posiciones exclusivas de los individuos con resistencia al TAR y que por tanto varían por la presión selectiva del tratamiento antirretroviral A431 y P476. El resto de las posiciones se compartieron con individuos vírgenes a tratamiento y son muy probablemente reflejo de la variabilidad mediada por la presión selectiva inmune, en particularidad las respuestas restringidas por HLA-I, como se ha descrito previamente para *gag* [31, 57, 58, 86, 112, 113]. Cabe mencionar que el poder para encontrar posiciones bajo presión selectiva positiva

Igualmente, se analizó el impacto en CV de la presencia-ausencia de cada una de las 15 mutaciones bajo presión selectiva con cada una de las variaciones presentes por posición (Tabla 6.2, Figura 6.19). El resultado fue sumamente interesante al identificar a la posición S373 con efecto compensatorio en la CR. Esta posición, como se describió en la sección de Resultados, ha mostrado el mismo efecto compensatorio en individuos vírgenes a tratamiento pero con la selección de un aminoácido distinto S373Q. La diferencia de selección para estos aminoácidos fue significativa con $p=0.0002$, lo que sugiere una selección preferencial debida a la exposición del tratamiento antirretroviral S373A/T.

Respecto a la posición S373, se localiza en el motivo de corte p2-NC. Este motivo de corte se ha reportado como primario y es el de primero y de mayor velocidad en la cascada de maduración de *gag*. Se ha asociado con la estabilidad y maduración del dímero de RNA en las partículas virales, cuyas mutaciones influyen en la estabilidad del genoma viral [114]. La importancia de este motivo de corte para la capacidad de replicación indica que la mutación S373A/T podría tener influencia en

la interacción con el genoma mejorando su estabilidad y reflejándose en el efecto compensatorio observado en la cohorte (Figura 21, 22 y 23). La asociación [S373A/T](#) + L90M, permitió identificar además a la presión selectiva farmacológica como principal influyente en la selección preferencial de [S373A/T](#). Sin embargo, al ser también blanco de la presión selectiva inmunológica, nuestro trabajo fue capaz de evidenciar la interacción entre múltiples presiones selectivas reflejadas en una doble ventaja viral. Esta doble ventaja hizo comparable la CR con aquella obtenida en la cohorte control de individuos vírgenes a tratamiento (Figura 6. 22). La transmisión de una cepa viral con estas mutaciones impacta en la susceptibilidad del desarrollo de resistencia más tempranamente, lo cual dificulta la elección de un esquema de tratamiento óptimo e influye en la progresión de la enfermedad al poseer el virus una mayor CR.

Al observarse que las mutaciones seleccionadas en *gag* tienen un mayor impacto en la CR, se estudió la variabilidad de los motivos de corte. La Figura 6.25 evidenció que existe una adaptación viral a la presión selectiva farmacológica en *gag*, reflejándose en un mayor grado de polimorfismo a lo largo de los motivos de corte. Son precisamente estos aminoácidos los que reconoce la proteasa durante la maduración viral y es esperado observar un grado de adaptación cuando se seleccionan mutaciones de resistencia en la proteasa. Se ha reportado que en el sustrato *gag*, se seleccionan variantes que mejoran la afinidad con una proteasa resistente y con ello, mantienen la eficiencia del proceso de maduración [42, 80, 87, 97, 103, 109].

Se analizó la correlación entre la variabilidad de los motivos de corte y la CR. Sin embargo, de manera interesante no se obtuvo resultado significativo (Figura 6.26). Se observó que existe una correlación entre la variabilidad de los motivos de corte y las mutaciones asociadas a la exposición a IPs, tanto en proteasa como en *gag* (Figura 6. 27) y que por tanto, influyen los valores de CR. Los resultados sugieren que a medida que exista un mayor número de mutaciones seleccionadas debido a la exposición por IPs, mayor será la adaptación en cuanto a la variación en los motivos de corte y por lo tanto, la CR se verá compensada. Más aún, no

hubo situación en la que pudiera analizarse un alto grado de resistencia con poca variabilidad en los motivos de corte.

La división por cuartiles de acuerdo a los valores de CR, nos permitió extremar grupos para identificar las posibles características asociadas a diferencias en CR. La Tabla 6.4 muestra que mutaciones específicas son responsables de compensar o disminuir la capacidad replicativa, e.g. [A431V](#), $p=0.0374$ entre cuartil alto y bajo. Y que más allá de la presencia de estas mutaciones es una probable evidencia de la interacción entre la presión farmacológica e inmunológica.

Interacción entre múltiples presiones selectivas: Doble ventaja viral.

La interacción entre múltiples presiones selectivas se hace evidente cuando existen casos de tasas variables de adquisición de resistencia a TAR que no pueden explicarse por la dosis o tiempo de exposición al fármaco. En estos casos, la presión inmunológica podría estar involucrada en la selección de mutaciones de escape que también proporcionan resistencia a fármacos antirretrovirales [95]. Ejemplo de estudios enfocados a esta múltiple presión selectiva, fue un estudio enfocado en la mutación de resistencia en proteasa V82A, presente en un epítipo reconocido por el supertipo HLA-A2. El estudio demostró que la cepa mutante no era reconocida por los alelos del supertipo HLA-A2 y funcionaba por lo tanto, como mutación de escape inmunológico y mutación de resistencia al tratamiento de manera simultánea [93].

La integración de nuestros resultados mostró que la mutación L90M no puede ser reconocida por los alelos B*35 presentes en la cohorte y por tanto confiere doble ventaja al funcionar como mutación de resistencia y de escape inmunológico. El grupo B*35 además, exhibe una alta frecuencia y polimorfismo en el contexto inmunogenético de los mexicanos, donde la mayoría de los alelos se comportan como posibles alelos HLA de riesgo (en particular B*35:01, Valenzuela-Ponce et al., manuscrito en preparación) (Figura 1.10 y 6.30). Se requieren estudios futuros que evalúen los patrones mutacionales de escape inmunológico para este grupo HLA por ensayos de citotoxicidad.

Los resultados observados para la mutación L90M en conjunto con la posición S373, sugieren que el repertorio alélico HLA del individuo podría hacerlo más susceptible a desarrollar falla virológica cuando existe interacción entre el gen *pol*, el gen *gag* y alelos candidatos como A*03:01, A*31:01, B*35:01 y B*35:03. No se encontró una completa correspondencia entre la presencia de S373A/T, valores altos de capacidad replicativa y presencia de los alelos que potencialmente pueden reconocer el epítotope (sólo en el 48% de los individuos). Sin embargo, no se descarta la posibilidad que en individuos que posean alguno de estos alelos, la ganancia en CR sea más alta (Figura 6.30).

Así, como ejemplo se tiene el siguiente escenario: Si un individuo presenta dichos alelos HLA e inicia un esquema de tratamiento antirretroviral con IPs podría ser más propenso a desarrollar y mantener las mutaciones L90M y S373A/T, que se reflejarían en la resistencia del virus a IPs, mejoran la CR y escapan al sistema inmune con la mutación L90M que escapa al reconocimiento de CTLs eg. B*35.

Un estudio más profundo sobre la presencia conjunta de S373A/T + L90M, podría ser por un acercamiento longitudinal que responda a la pregunta si la selección de la mutación S373A/T es compensatoria una vez que se selecciona la mutación de resistencia L90M. O bien, que las mutaciones de resistencia en la proteasa influyan a que la mutación se mantenga una vez que S373A/T se haya seleccionado por influencia de alelos HLA-I. Para responder a esta pregunta, se hizo un pequeño análisis de individuos con resistencia transmitida a IPs por L90M (García-Morales et al., datos no publicados) a partir de una cohorte que incluye a más de 1500 individuos vírgenes a tratamiento de México. En esta cohorte, la mutación L90M se encontró en 15 individuos (frecuencia 1%). Así mismo, se buscó la presencia de S373A/T, pero ninguno de los 15 individuos con la mutación L90M la presentó. Interesantemente, el 60% de ellos se clasificó como con infección reciente, lo que abre la posibilidad de un mayor tiempo de co-evolución para la selección diferencial de S373A/T. O bien, que un estado de falla virológica prolongada que favorece la selección de más mutaciones de resistencia, favorezca también la selección de S373A/T en *gag*.

Interacción entre múltiples presiones selectivas: Impacto negativo en la CR.

Por otro lado, se ha observado que individuos que poseen virus multi-drogo resistentes, se mantienen bajo cierto control virológico con valores de carga viral que no corresponderían al grado de resistencia, probablemente por la selección de mutaciones que pueden conferir resistencia pero que son reconocidas por el sistema inmune acorralando al virus entre presiones selectivas opuestas [93]. En nuestro caso, la interacción que se observó con la mutación **A431V**, mostró tener efectos negativos en la CR a pesar de ser una mutación reportada como compensatoria [50, 88, 97]. Se identificaron alelos HLA presentes en la cohorte que teóricamente pueden reconocer al epítipo conteniendo **A431**, tanto a la variante wild type como la mutante, A*02:06, B*35:01, C*07:02. Así, un individuo con los alelos candidatos y bajo esquema de IPs, seleccionaría la mutación **A431V** que como efecto principal conferiría resistencia, sin embargo, al ser reconocida por el sistema inmune, la viremia podría estar más controlada en comparación con individuos que carecen de estos alelos. La selección de esta mutación además, poseería un efecto negativo en la CR. Más aún, los alelos responsables de este reconocimiento son comunes en el contexto inmunogenético mexicano y en nuestra cohorte, se encuentran en los primeros tres lugares de frecuencia (Figura 6.28).

Queda abierta la interrogante de no observar un mayor porcentaje de selección de la mutación **A431V** en los individuos con los alelos A*02:06, B*35:02 o C*07:02. Sin embargo, es una evidencia más de que la evolución viral es compleja y no responde en todos los casos a la presencia del tratamiento antirretroviral ni a posibles alelos selectores, sobre todo, si tienen impacto en la CR. La posibilidad de encontrar sitios en el genoma que originen efectos negativos para la capacidad de replicación, ofrece alternativas al desarrollo de inmunógenos profilácticos considerando la carga alélica de los individuos.

En el estudio existe la limitante del bajo número de tipificaciones HLA y es probable que los efectos significativos de la presencia de alelos sobre la CR se deban a un bajo poder estadístico para encontrar asociaciones (Figura 6.28).

Finalmente, se ha demostrado que la inclusión de un gran número de individuos es necesario para establecer asociaciones significativas con HLA-I y CD4+, carga viral o en este caso, CR, [57, 58, 61, 62, 64, 65, 112]. Resulta esencial incluir más muestras en el estudio y tipificar a la totalidad de los participantes. Así mismo, es importante considerar que existen alelos HLA presentes en la cohorte para los que la información sobre especificidad de unión y posibles epítomos es incompleta, al ser típicamente amerindios y por lo tanto poco estudiados, e.g. A*23:01, A*68:03. Y por lo tanto, no se descarta la posibilidad que alguno de ellos puedan reconocer epítomos que son importantes para el control virológico y que no han sido descritos.

Las causas que dictan la eficiencia de replicación en una población viral dependen de muchos factores, y aunque no todos los valores de CR pueden explicarse con los datos que aquí se muestran, nuestro estudio proporciona información específica que abre el panorama de la complejidad de la evolución viral en la infección por VIH y en el contexto de tratamiento antirretroviral. Más aún, reportes recientes han propuesto que la capacidad de replicación de un virus transmitido es un factor adicional e independiente que influye en la progresión de la infección. Así, un virus con alta capacidad replicativa, ocasionará un estado de inflamación más severo, acompañado de una mayor activación inmune y con un impacto en la carga proviral en los linfocitos T CD4+ de memoria, responsables del establecimiento de un reservorio [96]. Nuestro trabajo impacta directamente en el campo de estrategias de prevención para evitar la transmisión, una vez que se detecte la falla virológica; evidencia mecanismos que le confieren ventaja al VIH dentro del contexto inmunogenético de un hospedero particular, y resulta importante considerarlos para hacer la mejor elección de tratamiento antirretroviral de acuerdo a la diversidad genética del individuo con opciones de tratamiento más personalizado.

CAPÍTULO VIII. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.

Se obtuvo la capacidad replicativa relativa dependiente de la región *gag-proteasa* de individuos con falla virológica por resistencia al uso de inhibidores de proteasa. Esta capacidad de replicación resultó significativamente menor al compararla con una cohorte control de individuos vírgenes a tratamiento siendo un reflejo de la alta selección de mutaciones asociadas a la presión selectiva inmune y farmacológica.

De acuerdo a los resultados de CR, no se observó impacto compensatorio por la presencia de mutaciones ya reportadas como compensatorias en la proteasa viral, y que estuvieron presentes en la cohorte: L10I/V, K20R, M36I, A71V/T/I.

Se encontraron mutaciones específicas con impacto significativo en la CR: [A431V](#), [A431V + R76K](#), asociadas con una disminución en la CR; [S373A/T](#), [S373A/T + L90M](#) asociadas con el aumento o compensación de la CR. No se encontró correlación entre el número total de mutaciones de resistencia tanto en proteasa como en *gag*, y la CR. Sin embargo, se encontró diferencia entre la no selección y la selección de una o más mutaciones de resistencia en *gag*, pero no en proteasa.

La posición [S373](#) se identificó por el análisis evolutivo de las secuencias de *gag* para la identificación de posiciones en el genoma con tendencia a la variabilidad. De las 15 posiciones con evidencia de presión selectiva positiva, fue la mutación [S373A/T](#) que se asoció con un efecto significativo en el aumento de la CR. La selección de este aminoácido fue significativamente distinta en comparación con individuos vírgenes a tratamiento siendo favorecida en la cohorte con resistencia a IPs ($p=0.0002$). El resultado es evidencia de la interacción entre múltiples presiones selectivas donde la presión farmacológica influye en la selección diferencial de aminoácidos que se encuentran en epitopes blanco del sistema inmune.

La presencia conjunta de las mutaciones [S373A/T + L90M](#), asociada al aumento significativo de la CR, hizo comparable la media de capacidad de replicación de la cohorte de estudio, con aquella obtenida en individuos vírgenes a tratamiento.

Se encontró que los alelos A*03:01, A*31:01, B*35:01 y B*35:03 presentan reconocimiento potencial a S373A/T. La presencia de S373A/T + L90M con la presencia de alguno de los alelos HLA selectores, resultó en una doble ventaja para el virus, con valores de CR que se encontraron en el rango máximo de CR dentro de la cohorte.

Por otro lado, el posible reconocimiento de la posición A431 por alelos como A*02:06, B*35:01, C*07:02 podría explicar el efecto en la disminución de la CR, siendo que se ha reportado como mutación compensatoria asociada al uso de inhibidores de proteasa evidenciando un mecanismo adicional de interacción donde la consecuencia implica defectos en la CR.

Los alelos que pueden reconocer a las posiciones S373, A431, L90, exhiben una alta frecuencia en el contexto inmunogenético mexicano. Sin embargo, varios de los alelos HLA presentes en la cohorte han sido pobremente explorados para establecer una posible asociación con la selección de mutaciones de escape.

El estudio de la presencia de mutaciones de resistencia en la proteasa y mutaciones asociadas al uso de IPs en *gag*, mostró que la diferencia en valores de CR dentro de la cohorte, se debe principalmente a cambios en *gag* más que en la selección de mutaciones en la proteasa. La conclusión se apoya en la correlación significativa entre el porcentaje de variación de los motivos de corte en *gag* y las mutaciones de resistencia en la región *gag-pro*.

Nuestro trabajo de muestra que existe una co-evolución entre una proteasa resistente y su sustrato *gag*. Evidencia además, que esta co-evolución impacta en la capacidad replicativa viral y más aún, muestra evidencia de la interacción entre múltiples presiones selectivas que pueden conferir doble ventaja al virus, o bien, limitar su variabilidad.

Perspectivas

Ampliar tanto el número de individuos incluidos en la cohorte como la tipificación de alelos HLA-I para lograr un mayor poder estadístico y mejorar las asociaciones con CR. Incluir las células polimorfonucleares de cada individuo, PBMCs, para mejorar el poder de tipificación y disminuir el grado de homocigosis.

Someter las secuencias de *gag* a un análisis de selección positiva por corrección de filogenia. Ejemplo de ellos es el análisis PDN o red de dependencia filogenética. El resultado mostrará asociaciones de escape o conservación de cada aminoácido dentro de la secuencia de *gag* con los alelos HLA-I obtenidos en la tipificación de la cohorte. Se identificarán aquellas asociaciones que son estadísticamente significativas.

Desarrollar ensayos de mutagénesis dirigida para las mutaciones que mostraron efecto significativo en la CR y comparar los resultados con los mostrados en el presente trabajo: [A431V](#), [A431V + R76K](#), asociadas con una disminución en la CR; [S373A/T](#), [S373A/T + L90M](#) asociadas con el aumento o compensación de la CR. Esto permitiría identificar el efecto mismo de las mutaciones sobre el virus excluyendo el contexto de múltiples mutaciones presentes en los individuos con tiempo de evolución y exposición a tratamiento antirretroviral.

Desarrollar ensayos de reconocimiento de epítopes por CTLs para las mutaciones que tuvieron impacto en la CR. Ensayos de ELISPOT por ejemplo, tanto para la mutante como para la variante *wildtype*, permitiría explorar la respuesta celular de aquellas alelos que son típicamente merindios y que han sido previamente descritos. El mismo ensayo puede aplicarse para CTL's previamente caracterizados y compara la respuesta de reconocimiento con lo obtenido en la cohorte de estudio.

CAPÍTULO IX. LITERATURA CITADA.

1. Bernard N. Fields, P.M.H., *Virology fields*, 2007: USA. p. 3177.
2. Infecciosas, C.d.I.e.E., *30 años del VIH-SIDA perspectivas desde México*, 2011: México. p. 240.
3. Córdoba Villalobos, V.J., *25 años de SIDA en México. Logros desaciertos y retos*, 2009: México. p. 450.
4. Hulswit, R., *HIV adaptation to HLA- Loss of proteccion?*, 2013: USA. p. 24.
5. Van Heuverswyn, F. and M. Peeters, *The origins of HIV and implications for the global epidemic*. *Curr Infect Dis Rep*, 2007. **9**(4): p. 338-46.
6. McMichael, A.J. and S.L. Rowland-Jones, *Cellular immune responses to HIV*. *Nature*, 2001. **410**(6831): p. 980-7.
7. Freed, E.O., *HIV-1 and the host cell: an intimate association*. *Trends Microbiol*, 2004. **12**(4): p. 170-7.
8. UNAIDS, *The Gap report*, 2014.
9. ONUSIDA, *Hoja informartiva de datos estadísticos mundiales sobre VIH*. 2014: p. 7.
10. Hoffman-Rockstroh-Kamps, *HIV, Medicine*, Amedeo, Editor 2006. p. 825.
11. Hull, M.W., et al., *Epidemiology of treatment failure: a focus on recent trends*. *Curr Opin HIV AIDS*, 2009. **4**(6): p. 467-73.
12. Carlson, J.M., et al., *HIV-1 adaptation to HLA: a window into virus-host immune interactions*. *Trends Microbiol*, 2015. **23**(4): p. 212-24.
13. Rowland-Jones, S.L., *Timeline: AIDS pathogenesis: what have two decades of HIV research taught us?* *Nat Rev Immunol*, 2003. **3**(4): p. 343-8.
14. SIDA., C.N.p.l.p.y.e.C.d.V.y.e., *Informe Nacional de avances en respuesta al VIH y el SIDA . Actualización 2013*, 2014. p. 320.
15. VIH/SIDA, C.N.p.l.P.y.e.C.d., *Guía de manejo Antirretroviral de las personas con VIH*, 2012: México. p. 285.
16. Bernard N. Fields, D.M.K., Peter M. Howley, *Virology Fields*. Quinta edición ed. Vol. volume 2. 2007, USA. 3177.
17. Rambaut, A., et al., *Human immunodeficiency virus. Phylogeny and the origin of HIV-1*. *Nature*, 2001. **410**(6832): p. 1047-8.
18. Sharp, P.M. and B.H. Hahn, *Origins of HIV and the AIDS pandemic*. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2011. **1**(1): p. a006841.
19. Córdoba Villalobos, J.A.P.d.L.R.S., Valdespino, J. L. , *25 años de SIDA en México. Logros, desaciertos y retos*. Segunda edición ed2009, México: México: Instituto Nacional de Salud Pública. 450.
20. Hoffmann-Rockstroh-Kamps, *HIV Medicine*. 14 ed2006: Amedeo. 825.
21. Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas, C., *30 AÑOS DEL VIH-SIDA PERSPECTIVAS DESDE MÉXICO*. Primera edición ed2011, México. 240.
22. Geretti, A.M., *HIV-1 subtypes: epidemiology and significance for HIV management*. *Curr Opin Infect Dis*, 2006. **19**(1): p. 1-7.
23. Avila-Rios, S., et al., *National prevalence and trends of HIV transmitted drug resistance in Mexico*. *PLoS One*, 2011. **6**(11): p. e27812.
24. McCutchan, F.E., *Global distribution of HIV-1 recombinants and subtypes*. *IAVA report*, 2003.
25. Avila-Rios, S., et al., *Unique features of HLA-mediated HIV evolution in a Mexican cohort: a comparative study*. *Retrovirology*, 2009. **6**: p. 72.
26. Gómez -Carrillo M.; Salomon, H.P., M.A.; Kijak, G.; Avila *Distribución de subtipos y recombinantes del HIV situación en la Argentina*. 2001. **61**, 881-889.

27. Hemelaar, J., et al., *Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000-2007*. AIDS, 2011. **25**(5): p. 679-89.
28. Buonaguro, L., M.L. Tornesello, and F.M. Buonaguro, *Human immunodeficiency virus type 1 subtype distribution in the worldwide epidemic: pathogenetic and therapeutic implications*. J Virol, 2007. **81**(19): p. 10209-19.
29. Altfeld, M., et al., *DCs and NK cells: critical effectors in the immune response to HIV-1*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(3): p. 176-86.
30. Wilen, C.B., J.C. Tilton, and R.W. Doms, *HIV: cell binding and entry*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(8).
31. Freed, E.O., *HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle*. Virology, 1998. **251**(1): p. 1-15.
32. Briggs, J.A. and H.G. Krausslich, *The molecular architecture of HIV*. J Mol Biol, 2011. **410**(4): p. 491-500.
33. Turner, B.G. and M.F. Summers, *Structural biology of HIV*. J Mol Biol, 1999. **285**(1): p. 1-32.
34. database, L.A., 2015.
35. Gottlinger, H.G., et al., *Effect of mutations affecting the p6 gag protein on human immunodeficiency virus particle release*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(8): p. 3195-9.
36. Fujii, K., J.H. Hurley, and E.O. Freed, *Beyond Tsg101: the role of Alix in 'ESCRTing' HIV-1*. Nat Rev Microbiol, 2007. **5**(12): p. 912-6.
37. Garrus, J.E., et al., *Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding*. Cell, 2001. **107**(1): p. 55-65.
38. Chiu, H.C., et al., *Effects of human immunodeficiency virus type 1 transframe protein p6* mutations on viral protease-mediated Gag processing*. J Gen Virol, 2006. **87**(Pt 7): p. 2041-6.
39. Paulus, C., C. Ludwig, and R. Wagner, *Contribution of the Gag-Pol transframe domain p6* and its coding sequence to morphogenesis and replication of human immunodeficiency virus type 1*. Virology, 2004. **330**(1): p. 271-83.
40. Girnary, R., et al., *Structure-function analysis of the ribosomal frameshifting signal of two human immunodeficiency virus type 1 isolates with increased resistance to viral protease inhibitors*. J Gen Virol, 2007. **88**(Pt 1): p. 226-35.
41. Peng, C., et al., *Role of human immunodeficiency virus type 1-specific protease in core protein maturation and viral infectivity*. J Virol, 1989. **63**(6): p. 2550-6.
42. Nijhuis, M., N.M. van Maarseveen, and C.A. Boucher, *HIV protease resistance and viral fitness*. Curr Opin HIV AIDS, 2007. **2**(2): p. 108-15.
43. Sundquist, W.I. and H.G. Krausslich, *HIV-1 assembly, budding, and maturation*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(7): p. a006924.
44. Shafer, R.W. and J.M. Schapiro, *HIV-1 drug resistance mutations: an updated framework for the second decade of HAART*. AIDS Rev, 2008. **10**(2): p. 67-84.
45. Karn, J. and C.M. Stoltzfus, *Transcriptional and posttranscriptional regulation of HIV-1 gene expression*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(2): p. a006916.
46. Xing, S. and R.F. Siliciano, *Targeting HIV latency: pharmacologic strategies toward eradication*. Drug Discov Today, 2013. **18**(11-12): p. 541-51.
47. Hu, W.S. and S.H. Hughes, *HIV-1 reverse transcription*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(10).
48. Ambrose, Z. and C. Aiken, *HIV-1 uncoating: connection to nuclear entry and regulation by host proteins*. Virology, 2014. **454-455**: p. 371-9.
49. Craigie, R. and F.D. Bushman, *HIV DNA integration*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(7): p. a006890.

50. Fun, A., et al., *Human Immunodeficiency Virus Gag and protease: partners in resistance*. *Retrovirology*, 2012. **9**: p. 63.
51. McMichael, A.J., et al., *The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development*. *Nat Rev Immunol*, 2010. **10**(1): p. 11-23.
52. Fauci, A.S.K., D.L.; Braunvald, E.; Hauser S.L.; Longo, D.L.; Jameson, J.L.; Loscalzo, J, *Harrison principios de medicina interna*. 17 edición ed2006.
53. Alter, G., et al., *HIV-1 adaptation to NK-cell-mediated immune pressure*. *Nature*, 2011. **476**(7358): p. 96-100.
54. Abbas, A.K.L., A.H., Pillai, S., *Cellular and Molecular Immunology*, Elsevier, Editor 2012. p. 513.
55. Espinosa, E., *[Finding the traces of the HIV selection]*. *Rev Latinoam Microbiol*, 2006. **48**(2): p. 84-90.
56. Brockman, M.A., et al., *Escape and compensation from early HLA-B57-mediated cytotoxic T-lymphocyte pressure on human immunodeficiency virus type 1 Gag alter capsid interactions with cyclophilin A*. *J Virol*, 2007. **81**(22): p. 12608-18.
57. Kawashima, Y., et al., *Adaptation of HIV-1 to human leukocyte antigen class I*. *Nature*, 2009. **458**(7238): p. 641-5.
58. Carlson, J.M., et al., *Phylogenetic dependency networks: inferring patterns of CTL escape and codon covariation in HIV-1 Gag*. *PLoS Comput Biol*, 2008. **4**(11): p. e1000225.
59. 1. Abbas, A.K.L., A.H.; Pillai, S. , *Cellular and Molecular Immunology*. seventh ed2012, United States: Elsevier. 513.
60. Brumme, Z.L., et al., *Human leukocyte antigen-specific polymorphisms in HIV-1 Gag and their association with viral load in chronic untreated infection*. *AIDS*, 2008. **22**(11): p. 1277-86.
61. Goulder, P.J. and D.I. Watkins, *Impact of MHC class I diversity on immune control of immunodeficiency virus replication*. *Nat Rev Immunol*, 2008. **8**(8): p. 619-30.
62. Kiepiela, P., et al., *Dominant influence of HLA-B in mediating the potential co-evolution of HIV and HLA*. *Nature*, 2004. **432**(7018): p. 769-75.
63. Bezemer, D., et al., *Evolution of transmitted HIV-1 with drug-resistance mutations in the absence of therapy: effects on CD4+ T-cell count and HIV-1 RNA load*. *Antivir Ther*, 2006. **11**(2): p. 173-8.
64. Juarez-Molina, C.I., et al., *Impact of HLA selection pressure on HIV fitness at a population level in Mexico and Barbados*. *J Virol*, 2014. **88**(18): p. 10392-8.
65. Leslie, A., et al., *Additive contribution of HLA class I alleles in the immune control of HIV-1 infection*. *J Virol*, 2010. **84**(19): p. 9879-88.
66. Goepfert, P.A., et al., *Transmission of HIV-1 Gag immune escape mutations is associated with reduced viral load in linked recipients*. *J Exp Med*, 2008. **205**(5): p. 1009-17.
67. Martinez-Picado, J., et al., *Fitness cost of escape mutations in p24 Gag in association with control of human immunodeficiency virus type 1*. *J Virol*, 2006. **80**(7): p. 3617-23.
68. Avila-Rios, S., G. Reyes-Teran, and E. Espinosa, *Cornering HIV: taking advantage of interactions between selective pressures*. *Med Hypotheses*, 2007. **69**(2): p. 422-31.
69. Dam, E., et al., *Gag mutations strongly contribute to HIV-1 resistance to protease inhibitors in highly drug-experienced patients besides compensating for fitness loss*. *PLoS Pathog*, 2009. **5**(3): p. e1000345.
70. Deeks, S.G., R. Tracy, and D.C. Douek, *Systemic effects of inflammation on health during chronic HIV infection*. *Immunity*, 2013. **39**(4): p. 633-45.
71. Douek, D.C., M. Roederer, and R.A. Koup, *Emerging concepts in the immunopathogenesis of AIDS*. *Annu Rev Med*, 2009. **60**: p. 471-84.
72. Clavel, F. and A.J. Hance, *HIV drug resistance*. *N Engl J Med*, 2004. **350**(10): p. 1023-35.

73. Arts, E.J. and D.J. Hazuda, *HIV-1 antiretroviral drug therapy*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(4): p. a007161.
74. Fun, A., *Determinants of the development and evolution of HIV-1 drug resistance*, 2012: Netherlands. p. 152.
75. Sida, C.N.p.I.P.y.C.d., *Guía de Manejo Antirretroviral de las Personas con VIH*, 2012: México. p. 285.
76. Wlodawer, A. and J. Vondrasek, *Inhibitors of HIV-1 protease: a major success of structure-assisted drug design*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 1998. **27**: p. 249-84.
77. Shafer, R.W., R. Kantor, and M.J. Gonzales, *The Genetic Basis of HIV-1 Resistance to Reverse Transcriptase and Protease Inhibitors*. AIDS Rev, 2000. **2**(4): p. 211-228.
78. Bailey, J., et al., *Mechanisms of HIV-1 escape from immune responses and antiretroviral drugs*. Curr Opin Immunol, 2004. **16**(4): p. 470-6.
79. King, N.M., et al., *Combating susceptibility to drug resistance: lessons from HIV-1 protease*. Chem Biol, 2004. **11**(10): p. 1333-8.
80. Mammano, F., C. Petit, and F. Clavel, *Resistance-associated loss of viral fitness in human immunodeficiency virus type 1: phenotypic analysis of protease and gag coevolution in protease inhibitor-treated patients*. J Virol, 1998. **72**(9): p. 7632-7.
81. Nijhuis, M., et al., *Increased fitness of drug resistant HIV-1 protease as a result of acquisition of compensatory mutations during suboptimal therapy*. AIDS, 1999. **13**(17): p. 2349-59.
82. Mammano, F., et al., *Retracing the evolutionary pathways of human immunodeficiency virus type 1 resistance to protease inhibitors: virus fitness in the absence and in the presence of drug*. J Virol, 2000. **74**(18): p. 8524-31.
83. University, H.D.R.D.-S., *HIV Drug Resistance Database - Stanford University*, 2012.
84. Aoki, M., et al., *Non-cleavage site gag mutations in amprenavir-resistant human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) predispose HIV-1 to rapid acquisition of amprenavir resistance but delay development of resistance to other protease inhibitors*. J Virol, 2009. **83**(7): p. 3059-68.
85. Larrouy, L., et al., *Gag mutations can impact virological response to dual-boosted protease inhibitor combinations in antiretroviral-naïve HIV-infected patients*. Antimicrob Agents Chemother, 2010. **54**(7): p. 2910-9.
86. Barrie, K.A., et al., *Natural variation in HIV-1 protease, Gag p7 and p6, and protease cleavage sites within gag/pol polyproteins: amino acid substitutions in the absence of protease inhibitors in mothers and children infected by human immunodeficiency virus type 1*. Virology, 1996. **219**(2): p. 407-16.
87. Verheyen, J., et al., *Compensatory mutations at the HIV cleavage sites p7/p1 and p1/p6-gag in therapy-naïve and therapy-experienced patients*. Antivir Ther, 2006. **11**(7): p. 879-87.
88. Kolli, M., S. Lastere, and C.A. Schiffer, *Co-evolution of nelfinavir-resistant HIV-1 protease and the p1-p6 substrate*. Virology, 2006. **347**(2): p. 405-9.
89. Zhang, Y.M., et al., *Drug resistance during indinavir therapy is caused by mutations in the protease gene and in its Gag substrate cleavage sites*. J Virol, 1997. **71**(9): p. 6662-70.
90. Ho, S.K., et al., *Drug-associated changes in amino acid residues in Gag p2, p7(NC), and p6(Gag)/p6(Pol) in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) display a dominant effect on replicative fitness and drug response*. Virology, 2008. **378**(2): p. 272-81.
91. Fun A, e.a., *Determinants of the development and evolution of HIV-1 drug resistance*, 2012: Netherlands. p. 152.

92. Mueller, S.M., et al., *Dual selection pressure by drugs and HLA class I-restricted immune responses on human immunodeficiency virus type 1 protease*. J Virol, 2007. **81**(6): p. 2887-98.
93. Karlsson, A.C., et al., *Dual pressure from antiretroviral therapy and cell-mediated immune response on the human immunodeficiency virus type 1 protease gene*. J Virol, 2003. **77**(12): p. 6743-52.
94. Mason, R.D., et al., *Antiretroviral drug resistance mutations sustain or enhance CTL recognition of common HIV-1 Pol epitopes*. J Immunol, 2004. **172**(11): p. 7212-9.
95. John, M., et al., *Interactive selective pressures of HLA-restricted immune responses and antiretroviral drugs on HIV-1*. Antivir Ther, 2005. **10**(4): p. 551-5.
96. Claiborne, D.T., et al., *Replicative fitness of transmitted HIV-1 drives acute immune activation, proviral load in memory CD4+ T cells, and disease progression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(12): p. E1480-9.
97. Bally, F., et al., *Polymorphism of HIV type 1 gag p7/p1 and p1/p6 cleavage sites: clinical significance and implications for resistance to protease inhibitors*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2000. **16**(13): p. 1209-13.
98. Brockman, M.A., et al., *Use of a novel GFP reporter cell line to examine replication capacity of CXCR4- and CCR5-tropic HIV-1 by flow cytometry*. J Virol Methods, 2006. **131**(2): p. 134-42.
99. Miura, T., et al., *HLA-associated alterations in replication capacity of chimeric NL4-3 viruses carrying gag-protease from elite controllers of human immunodeficiency virus type 1*. J Virol, 2009. **83**(1): p. 140-9.
100. Brockman, M.A., et al., *Early selection in Gag by protective HLA alleles contributes to reduced HIV-1 replication capacity that may be largely compensated for in chronic infection*. J Virol, 2010. **84**(22): p. 11937-49.
101. Wright, J.K., et al., *Influence of Gag-protease-mediated replication capacity on disease progression in individuals recently infected with HIV-1 subtype C*. J Virol, 2011. **85**(8): p. 3996-4006.
102. Centro Nacional para la Prevención y el Control del VIH y el SIDA, C., *PANORAMA EPIDEMIOLOGICO DEL VIH/SIDA E ITS EN MÉXICO. REGISTRO NACIONAL DE CASOS DE SIDA - ACTUALIZACIÓN PRELIMINAR HASTA LA SEMANA 52 DEL 2012*, 2012: México. p. 50.
103. Gatanaga, H., et al., *Amino acid substitutions in Gag protein at non-cleavage sites are indispensable for the development of a high multitude of HIV-1 resistance against protease inhibitors*. J Biol Chem, 2002. **277**(8): p. 5952-61.
104. Maguire, M.F., et al., *Changes in human immunodeficiency virus type 1 Gag at positions L449 and P453 are linked to I50V protease mutants in vivo and cause reduction of sensitivity to amprenavir and improved viral fitness in vitro*. J Virol, 2002. **76**(15): p. 7398-406.
105. Malet, I., et al., *Association of Gag cleavage sites to protease mutations and to virological response in HIV-1 treated patients*. J Infect, 2007. **54**(4): p. 367-74.
106. Parry, C.M., et al., *Gag determinants of fitness and drug susceptibility in protease inhibitor-resistant human immunodeficiency virus type 1*. J Virol, 2009. **83**(18): p. 9094-101.
107. van Maarseveen, N.M., et al., *Modulation of HIV-1 Gag NC/p1 cleavage efficiency affects protease inhibitor resistance and viral replicative capacity*. Retrovirology, 2012. **9**: p. 29.
108. Payne, R., et al., *Impact of HLA-driven HIV adaptation on virulence in populations of high HIV seroprevalence*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(50): p. E5393-400.
109. Zennou, V., et al., *Loss of viral fitness associated with multiple Gag and Gag-Pol processing defects in human immunodeficiency virus type 1 variants selected for resistance to protease inhibitors in vivo*. J Virol, 1998. **72**(4): p. 3300-6.

110. Myint, L., et al., *Gag non-cleavage site mutations contribute to full recovery of viral fitness in protease inhibitor-resistant human immunodeficiency virus type 1*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004. **48**(2): p. 444-52.
111. Wlodawer, A., *Structure-based design of AIDS drugs and the development of resistance*. *Vox Sang*, 2002. **83 Suppl 1**: p. 23-6.
112. Frahm, N., et al., *Consistent cytotoxic-T-lymphocyte targeting of immunodominant regions in human immunodeficiency virus across multiple ethnicities*. *J Virol*, 2004. **78**(5): p. 2187-200.
113. Miura, T., et al., *HLA-B57/B*5801 human immunodeficiency virus type 1 elite controllers select for rare gag variants associated with reduced viral replication capacity and strong cytotoxic T-lymphocyte [corrected] recognition*. *J Virol*, 2009. **83**(6): p. 2743-55.
114. Shehu-Xhilaga, M., et al., *Proteolytic processing of the p2/nucleocapsid cleavage site is critical for human immunodeficiency virus type 1 RNA dimer maturation*. *J Virol*, 2001. **75**(19): p. 9156-64.

ANEXO I.

Se muestra la secuencia y nombre de los primers para la amplificación y secuenciación de los alelos HLA-I de acuerdo a: HLA class I sequence-based typing using DNA recovered from frozen plasma Cotton, L., et al. 2012

Nombre de primer	Secuencia	Concentración.
AF	GAAACSGCCTCTGYGGGGAGAAGCAA	50 nmol
AR	TGTTGGTCCCAATTCTCTCCCCTC	50 nmol
BF_mod	GGGAGGAGMRAGGGGACCSCAG	50 nmol
BR	GGAGGCCATCCCCGGCGACCTAT	50 nmol
CF	ARCGAGGKGCCCKCCCGGCGA	50 nmol
CR	GGAGATRGGGAAGGCTCCCCACT	50 nmol
AS1F	AGCCGCGCCKGGASGAGGGTC	50 nmol
AS4R	TGTGGGAGGCCAGCCCGGGAGA	50 nmol
BnewF	GCAGGCGGGGGCGCAGGACC	50 nmol
BS4R	GGAGATGGGGAAGGCTCCCCACT	50 nmol
CS1F	GGAGCCGCGCAGGGAGGWGGGTC	50 nmol
CS7R	GGCTCCCCACTGCCCYTGGTAC	50 nmol
AS2R	GGCCCGTCCGTGGGGGATGAG	50 nmol
AS5F	CTACGTGGACGACACGCAGTT	50 nmol
AS6F	ACAGTCTCCGGGTCCGAGAT	50 nmol
AS7R	TTTGGCCTMAACYSAAAATGAAAC	50 nmol
AS8R	TTCCCGTTCTCCAGGTRTCTGC	50 nmol
BS1F	GGAGCCGCGCCGGGAGGAGGGTC	50 nmol
BS2R	GGATGGGGAGTCGTGACCT	50 nmol
BS3F	ACKGKGCTGACCGCGGGG	50 nmol
BS11R	CGGGGTCACTCACCGKCCTC	50 nmol
BS12F	GGSCKGGGCCAGGGTCTCAC	50 nmol
BS13R	ACTGCCCTGGTACCMGCGC	50 nmol
CS7R	GGCTCCCCACTGCCCYTGGTAC	50 nmol
CS8F	CGGGTCTCAGCCMCTCCTC	50 nmol
CS9R	TGGATCTCAGACSGGGAGACT	50 nmol
CS10F	GGGCTGACRCGGGGGCG	50 nmol
CS11F	CGGGGCCAGGKTCTCACAYC	50 nmol

