



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**POLIMORFISMOS Y PRESIÓN SELECTIVA INMUNE DE LA
SECUENCIA DE PROTEÍNAS ACCESORIAS/REGULADORAS DEL
VIH CIRCULANTE EN MÉXICO.**

TESIS:
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:
DANIELA TAPIA TREJO.



MÉXICO, D.F.

AÑO 2012.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Biblioteca Central

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Francisco Javier Plasencia de la Parra.

VOCAL: Profesor: Enrique Ortega Soto.

SECRETARIO: Profesor: Santiago Ávila Ríos.

1er. SUPLENTE: Profesor: Tzvetanka Dimitrova Dinkova.

2º SUPLENTE: Profesor: Rocío Gabriela Tirado Mendoza.

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

CENTRO DE INVESTIGACIÓN DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS (CIENI).

ASESOR DEL TEMA:

Dr. SANTIAGO ÁVILA RÍOS. _____

FIRMA

SUSTENTANTE (S):

DANIELA TAPIA TREJO. _____

FIRMA

Mi compañero en los caminos de la vida,
Siempre a mi lado en esas horas de tristeza,
Siempre conmigo en los momentos de alegría.

En memoria de mi padre....

Agradecimientos:

A Coni, por ser mi madre, maestra y amiga. Gracias por protegerme con tu fortaleza y cubrirme con tu cariño!!!!

A Narcisa, por todo el amor que desde niña me ha brindado, por su confianza, por su calidez humana y por ser el pilar de la familia.

A Mauricio, por su disciplina, dedicación y empeño. Simplemente un hombre excepcional!!.

A Ericka, por ser una mujer inteligente y noble. Gracias por estar siempre a mi lado.

A Verónica, Enrique, José Luis y Juan por darme la oportunidad de vivir etapas maravillosas a su lado, por el cariño y por ser parte fundamental en mi vida.

A Abraham, por estar en mi vida, por su nobleza pero sobre todo por su gran calidez humana.

A Mildred por ser la luz que guía mi camino y por darme a diario una enseñanza de vida a través de su sonrisa. Gracias por existir!!

A Alberto, por ser un guerrero incansable, por su alegría y por demostrar que no hay obstáculo imposible de vencer.

A Georgina, porque tu mirada me da fuerza para seguir adelante. Te amo!!!

A Rosita, Susana y Marisa, por su cariño y solidaridad. Gracias por estar conmigo en los momentos más difíciles.

A Daniel, Karla, Paulina y Alejandra por cada uno de los momentos que hemos pasado juntos. Gracias por trascender en mi vida!!!!

A Laura, Mariela, Mary, Carmen, Gonzalo y José por compartir conmigo una etapa, que sin duda será inolvidable. Gracias por ser parte de esta aventura!!!

Mi más profundo agradecimiento a todos los que han colaborado en este proyecto:

Al Dr. Gustavo Reyes Terán, por creer en mí y por brindarme la oportunidad de iniciar mi desarrollo como profesionista.

Al Dr. Santiago Ávila Ríos, porque sin él esto hubiera sido mucho más difícil, por su enorme entusiasmo y por compartir conmigo sus conocimientos.

A todos mis compañeros (Maribel, Maggie, Lety, Thalia, Ana, Claudia, Daniela, Humberto, Selma, Tania, Marisa, Juan) por su valiosísima colaboración y entrega.

A cada una de las personas que conforman el Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIENI), por el apoyo, la paciencia y la disponibilidad que siempre mostraron.

Mi respeto y agradecimiento a todos y cada uno de los pacientes que forman parte del CIENI.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por la casa de estudios que me brindo las herramientas necesarias para consolidarme como profesionista.

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

INDICE.

0. RESUMEN	8
1. INTRODUCCIÓN	10
1.1 SITUACIÓN MUNDIAL DEL VIH.	10
1.2 PANORAMA DEL VIH EN MÉXICO.	11
1.3. VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA, ANTECEDENTES.	12
1.4. ESTRUCTURA Y ORGANIZACIÓN GENÓMICA DEL VIH.	13
1.5. CICLO DE REPLICACIÓN.	19
1.6. HISTORIA NATURAL DEL VIH.	22
1.7. CLASIFICACIÓN DEL VIH	25
1.8. PAPEL DE LAS PROTEÍNAS ACCESORIAS/REGULADORAS EN EL CICLO DE REPLICACIÓN DEL VIH.	
• 1.8.1. Vif.	27
• 1.8.2. Vpr.	29
• 1.8.3. Vpu.	30
• 1.8.4. Tat.	31
• 1.8.5. Rev.	32
• 1.8.6 Nef	33
1.9. ANTÍGENO LEUCOCITARIO HUMANO (HLA) Y RESPUESTA DE LOS LINFOCITOS T CITOTÓXICOS (CTLs).	35
1.10. VARIABILIDAD DE HLA.	38
1.11. PAPEL DEL HLA EN LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH).	39
1.12. EVOLUCIÓN DEL VIH.	42

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	45
3. OBJETIVOS.	47
• 3.1. GENERAL.	
• 3.2.PARTICULARES.	
4. HIPOTESIS.	48
5. METODOLOGÍA.	49
6. RESULTADOS.	
6.1. CARACTERÍSTICAS DE LA COHORTE EN ESTUDIO.	61
6.2. ANÁLISIS FILOGÉNÉTICO LA SECUENCIA DE PROTEÍNAS ACCESORIAS/REGULADORAS DEL VIH CIRCULANTE EN MÉXICO.	64
6.3. ANÁLISIS DE VARIABILIDAD DE LA SECUENCIA DE PROTEÍNAS ACCESORIAS/REGULADORAS.	66
• 6.3.1. ANÁLISIS DE ENTROPÍA DE SHANNON.	75
6.4. ANÁLISIS DE SITIOS QUE SE ENCUENTRAN BAJO PRESIÓN SELECTIVA POSITIVA.	82
6.5. BÚSQUEDA DE ASOCIACIÓN HLA – CODÓN DE VIH.	85
7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.	93
8. CONCLUSIONES.	99
9. BIBLIOGRAFÍA.	101

0. RESUMEN

Antecedentes. Las proteínas accesorias/reguladoras tienen papeles fundamentales para la patogenicidad *in vivo* del VIH. El posible uso de estas proteínas como blanco de estrategias antirretrovirales hace relevante estudiar su variabilidad en el contexto inmunogenético de distintas poblaciones del mundo. Presentamos resultados de un estudio evolutivo para evaluar la diversidad e impacto de mutaciones adaptativas en las proteínas accesorias/reguladores de VIH circulante en México.

Métodos. Se obtuvieron 200 secuencias de la región de proteínas accesorias/reguladoras, incluyendo a Vif, Vpr, Vpu y el primer exón de Tat y Rev de VIH de individuos mexicanos vírgenes a tratamiento antirretroviral, provenientes de diferentes estados de la República Mexicana. A partir de virus libre en plasma se extrajo RNA. La región de las proteínas accesorias/reguladoras se amplificó por PCR anidada y los productos de reacción fueron secuenciados con 8 primers. Las secuencias fueron ensambladas con el programa Geneious 5.3.4. Se analizó la variabilidad de las secuencias mediante la determinación de la Entropía de Shannon en cada posición. Se buscó la presencia de posiciones bajo presión selectiva positiva a través de la herramienta en línea Data Monkey, mediante razones de sustituciones sinónimas/no sinónimas. El posible papel del HLA en la evolución del VIH en la región en cuestión fue evaluado mediante el uso de mapas de epítomos óptimos de linfocitos T citotóxicos de la Base de Datos de VIH de Los Alamos.

Resultados. La variabilidad de las secuencias de las diferentes proteínas de la región varió con el orden Vif < Vpr < Vpu < Tat/Rev. Se detectaron variaciones en sitios de interés funcional en las proteínas Vif, Vpr y Vpu, con un posible impacto en la capacidad replicativa del virus. Se observó una mayor diversificación viral hacia etapas más tardías de la infección por VIH, siendo esta tendencia más marcada para Vpu, y el primer exón de Tat y Rev; y en menor grado para Vpr y Vif.

En total se encontraron 33 posiciones bajo presión selectiva positiva en la región de proteínas accesorias/reguladoras de los virus mexicanos distribuidas en frecuencias heterogéneas de acuerdo a la longitud de cada proteína: Vif (8.9%, 17/192) > Tat (8.0%, 8/100) > Vpr (6.3%, 6/96) Rev (2.0%, 1/50) > Vpu (1.2% 1/82). Cerca de un 90% de las posiciones pudieron explicarse por asociaciones putativas con HLA. Interesantemente, algunas de estas asociaciones coincidieron con alelos HLA altamente frecuentes en población mexicana como B*35 y A*68. En general, se observó una mayor presión selectiva positiva actuando sobre Vif, que sobre otras proteínas accesorias. Así mismo, Vif mostró la mayor cantidad de posiciones con tendencia a conservación en la región. Fue notorio también el bajo impacto de la presión selectiva sobre la variabilidad de Vpu y Rev.

Conclusiones: Nuestros resultados muestran una alta densidad de posiciones bajo presión selectiva en la región de proteínas accesorias/reguladoras del VIH circulante en México, muchas de las cuales pudieron ser explicadas por alelos HLA altamente frecuentes en la población mexicana, lo cual sugiere un fuerte impacto de la presión selectiva por HLA en la evolución de la región de proteínas accesorias reguladoras del VIH circulante en México. Interesantemente, las proteínas Vif, Vpr y Tat mostraron un impacto mayor del HLA en la evolución viral que Vpu y Rev. Esta información es útil para el entendimiento de la patogenicidad del virus y la identificación de posibles blancos de inmunogénos efectivos en nuestra población.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 SITUACIÓN MUNDIAL DEL VIH.

En México, al igual que en el resto de los países del mundo, la infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), causante del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), se ha convertido en un problema prioritario de salud pública muy complejo, con múltiples repercusiones psicológicas, sociales, éticas, económicas y políticas que rebasan el ámbito de la salud.

A nivel global, se estima que cerca de 33.4 millones de personas viven con la infección por VIH. La región más afectada por la pandemia de VIH/SIDA es África Subsahariana, que concentra el 67% de las infecciones de todo el mundo, y en donde el SIDA es responsable de una de cada cinco muertes, constituyendo la principal causa de mortalidad. La segunda región en importancia es el Sur y Sureste de Asia, concentrando el 11% de las personas infectadas, mientras que en tercer lugar aparece América Latina con el 6% del total de las personas que viven con VIH en todo el planeta. Numéricamente, el Caribe (0.7%) y Oceanía (0.2%) y aparecen como las regiones con el menor número de personas que viven con el VIH **(Figura 1.1) (1)**.



Figura 1.1. Personas viviendo con VIH por región, como porcentaje del total mundial en el 2009. Modificado de (1).

No obstante, la valoración epidemiológica actual tiene algunos elementos esperanzadores, ya que sugiere que:

- La prevalencia global de la infección por VIH se mantiene estable, a pesar de que la cifra global de personas con VIH está aumentando debido a la acumulación de nuevas infecciones con mayores tasas de supervivencia, medidas en el contexto de una población mundial en constante crecimiento.
- Se ha producido un descenso en las muertes asociadas al VIH, atribuible parcialmente a una mejora gradual en el acceso a los tratamientos.

1.2 PANORAMA DEL VIH EN MÉXICO.

México se clasifica como un país con una epidemia de VIH/SIDA concentrada, caracterizada por una prevalencia de infección por VIH que se ha difundido rápidamente en uno o más subgrupos de la población.

El primer caso de SIDA en México fue diagnosticado en 1983, aunque de acuerdo con

análisis retrospectivos y otras técnicas de investigación en salud pública, el inicio de la epidemia del VIH puede ubicarse en el año de 1981.

De acuerdo a estimaciones realizadas por el Centro Nacional para la Prevención y Control del SIDA (CENSIDA), de manera ligada con el ONUSIDA, en México existen 220,000 personas adultas infectadas por el VIH (2009), de las cuales el 60% corresponden a hombres que tiene sexo con otros hombres (HSH), el 23% a mujeres heterosexuales y 6% a clientes de trabajadoras sexuales, principalmente heterosexuales, el 5% a hombres heterosexuales y el 3% a trabajadoras y trabajadores sexuales. Finalmente, las personas privadas de su libertad (2%) y los usuarios de drogas inyectadas (1%) aportaron las proporciones restantes del total de personas que viven con VIH en México (Figura 1.2) (3).



Figura 1.2. Distribución de las personas que viven con VIH en México en el año del 2009. Prevalencia estimada de VIH en los distintos grupos de población de México. Modificada de (1).

El grupo de 25-34 años de edad es el grupo con mayor porcentaje de casos de SIDA, seguido del grupo de 35-49 años de edad y en tercer lugar aparecen los jóvenes de 15-24 años de edad.

La tendencia histórica de la epidemia muestra una disminución en la proporción de casos de SIDA en los grupos de edad más afectados (25-44 años), y un aumento sostenido del porcentaje de casos de SIDA en jóvenes.

Las tasas de incidencia acumulada de casos de VIH por entidad federativa muestran el siguiente orden: el Distrito Federal ocupa el primer lugar como la entidad más afectada por la infección con 23811 casos; seguido del Estado de México con 16392, Veracruz con 13633, Jalisco con 11242, Puebla con 6858 y Baja California con 6712 casos **(Figura 1.3) (2).**

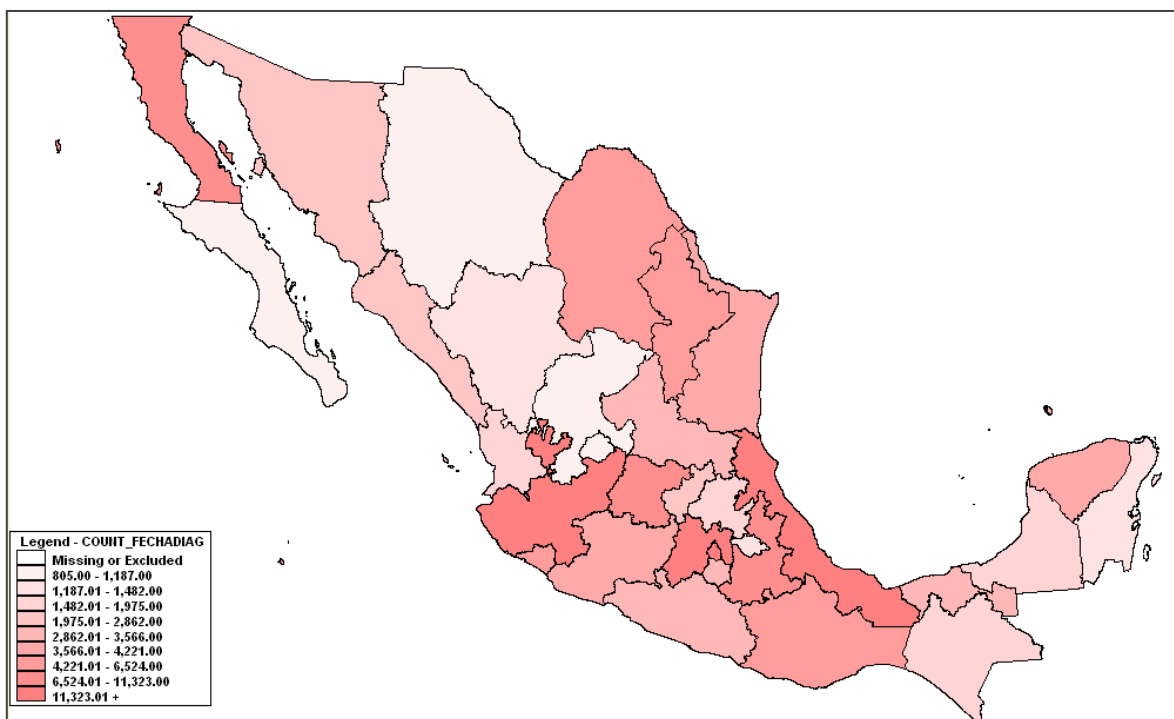


Figura 1.3. Distribución Geográfica de los casos de SIDA en México. Estados de la República Mexicana con mayor incidencia en casos de VIH. Tomada de (2).

1.3 VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA, ANTECEDENTES.

El Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) es una enfermedad caracterizada por el deterioro del sistema inmunitario, de manera que las personas infectadas pueden ser también afectadas por diversas enfermedades causadas por microorganismos llamados oportunistas. El agente causal de esta enfermedad es un retrovirus clasificado dentro del género de los lentivirus conocido como Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH). Existen dos tipos de VIH: VIH tipo 1 y VIH tipo 2.

Los retrovirus en general contienen marcos de lectura abierta (ORF por sus siglas en inglés) bastantes extensos que codifican para las poliproteínas Gag, Pol y Env, las cuales constituyen la estructura del virión y representan el repertorio enzimático viral. Los lentivirus (Tabla 1.1), se caracterizan por poseer ORF adicionales que codifican para una serie de proteínas adicionales denominadas reguladoras / accesorias, que en el caso del VIH son Tat, Rev, Vif, Vpr, Vpu y Nef.

Tabla 1.1. Características comunes de los lentivirus.

Clínicas. •Asociación con una enfermedad con un periodo de incubación largo. •Asociación con una deficiencia inmune. •Involucramiento del sistema hematopoyético. •Involucramiento del sistema nervioso.
Biológicas. •Específico de la especie del hospedero. •Exógeno y no oncogénico. •Variantes con efecto citopático en ciertas células infectadas, sincicia (células multinucleadas). •Infección de macrófagos – usualmente no citopático. •Integración del genoma viral al genoma de la célula infectada. •Acumulación de formas circulares no integradas de ADNc en células con infección no productiva. •Infección latente o persistente de algunas células, que permite el establecimiento de reservorios virales. •Cápside con morfología cónica, al ser examinado por microscopía electrónica.
Moleculares. •Genoma grande (≥9 kb) •Gen gag produce proteínas policistrónicas: varias proteínas Gag procesadas. •Las proteínas de la envoltura están altamente glicosiladas. •Alta frecuencia de polimorfismos, particularmente en la región de la envoltura. •Corrimiento del marco de lectura abierto en el genoma del virus que separa las regiones gag y pol.

1.4. ESTRUCTURA Y ORGANIZACIÓN GENÓMICA DEL VIH.

El VIH es un virus envuelto, con un genoma de ARN de cadena sencilla positiva, el cual es transcrito a ADN en la célula hospedera mediante la enzima viral llamada transcriptasa inversa. El VIH comparte los tres genes característicos que codifican para las proteínas estructurales y enzimas requeridas para infecciones productivas en todos los retrovirus: *gag* (gen antígeno grupo – específico), que codifica para las proteínas de la cápside y nucleocápside virales, *pol* (polimerasa), que codifica para las enzimas virales y *env* (envoltura) que codifica para las glicoproteínas de envoltura; además de seis genes que codifican para las llamadas proteínas reguladoras/accesorias Vif, Vpr, Vpu, Tat, Rev y Nef (Tabla 1.2) (4).

El genoma íntegro del VIH-1 es de aproximadamente 9.8 Kilobases (Kb) de longitud. Ambos extremos del genoma viral están flanqueados por unas

secuencias de repetición denominadas Long Terminal Repeats (LTRs), las cuales contienen las señales para la integración, así como para la iniciación y regulación de la transcripción (Figura 1.4).

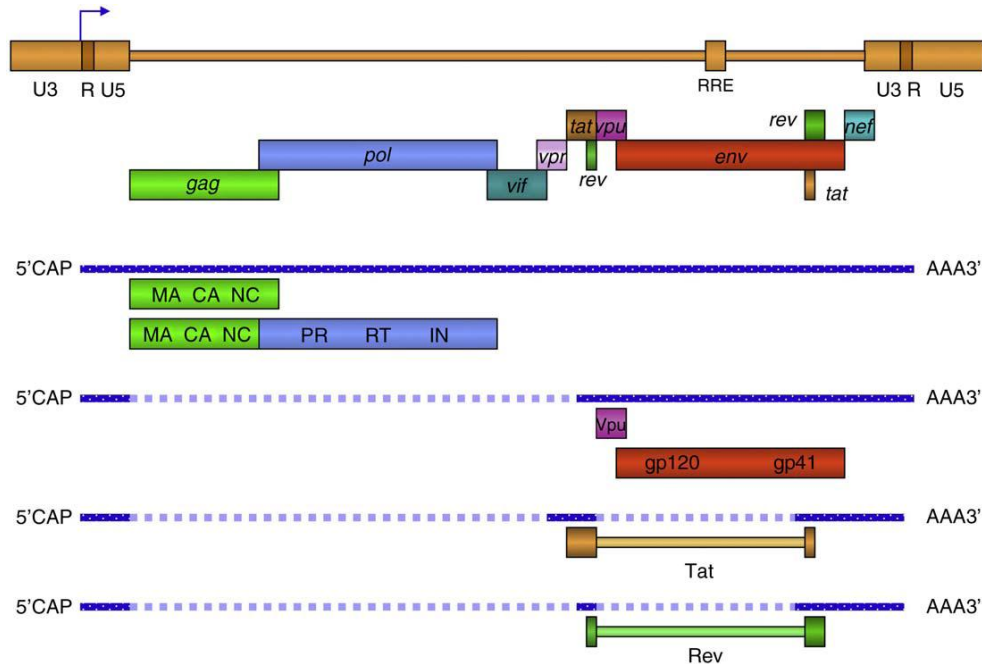


Figura 1.4. Organización Genómica del VIH. En la forma proviral el virus integrado está flanqueado por las regiones terminales repetidas (LTR) compuestas por las regiones U3, R y U5. El LTR 5' controla la expresión de los genes estructurales: *gag*, *pol* y *env*, y los accesorios: *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpu* y *vpr*. Los 9 genes de VIH-1 se expresan por medio de diferentes mensajeros a partir del provirus (ADN) integrado. Los ARNm más largos son exportados al citoplasma por un mecanismo Rev-dependiente y constituyen el genoma de nuevas partículas o son traducidos a las proteínas estructurales Gag, Pol y Env. Las proteínas reguladoras o accesorias son producto de extenso procesamiento (splicing) del ARN en el núcleo donde se producen versiones diferentes del ARN transcrito. Tomada de [15].

Visto por microscopía electrónica, el VIH-1 tiene características de un lentivirus, con una parte central cónica. El virión mide de 100 a 120nm de diámetro, con morfologías heterogéneas. Los virus infecciosos contienen la envoltura y tres proteínas estructurales de Gag: la matriz (MA, p17), CA (p24) y la nucleocápside (NC, p7). MA forma el cascarón interno en la partícula justo debajo de la

membrana viral, CA forma el centro cónico que incluyen al ARN genómico viral, y NC interacciona recíprocamente con el ARN viral dentro de la cápside. Estas proteínas virales son generadas por la proteasa viral (PR) al procesar la poliproteína precursora p55 Gag (Figura 1.5) (5).

La localización de las proteínas Gag en el precursor p55 es la siguiente: p17/p24/p2/p7/p1/p6. Gag p55, en su forma no escindida, tiene tres dominios: el que apunta a membrana (M), de interacción (I), y tardío (L). M, situado dentro de la región MA, es miristilado y dirige a la poliproteína Gag hacia la membrana plasmática. I es responsable de la interacción entre los monómeros de Gag y se encuentra dentro de NC. El dominio L, dentro de p6, media la gemación retroviral (5).

Dentro de la cápside de Gag, o nucleoide, están dos filamentos generalmente (pero no necesariamente) idénticos de ARN a los cuales se les une la polimerasa de ADN viral dependiente de ARN, también llamada transcriptasa reversa (RT) (p66/p51), y las proteínas NC (p7).

La bicapa lipídica o envoltura viral se deriva de la membrana plasmática de la célula hospedera y en ella se insertan las proteínas de la envoltura viral (Env): la glicoproteína de superficie viral gp120 y la glicoproteína transmembrana gp41. Estas glicoproteínas son las responsables del proceso de unión y fusión de la partícula viral con las células diana (5).

La proteína gp120 del virión, localizada en la superficie del virus, contiene el sitio para el acoplamiento del receptor celular y los principales dominios de anticuerpos neutralizantes.

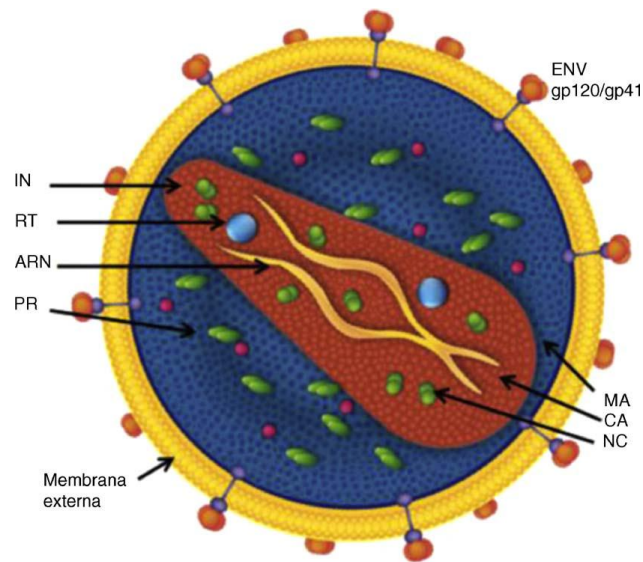


Figura 1.5. Estructura del virión. ENV: Envoltura, MA: Matriz, CA: Cápside, NC: Nucleocápside, IN: Integrasa, RT: Retrotranscriptasa, PR, Proteasa, ARN: Genoma del virus.

El VIH, al igual que otros retrovirus, posee dos formas genómicas: RNA de cadena sencilla en la fase extracelular del ciclo de vida viral (en los viriones) y una doble cadena de DNA (denominado provirus) dentro de la célula.

Tabla 1.2. Proteínas del VIH y sus funciones.

Proteínas.	Nomenclatura y tamaño (kDa).	Función.
Gag	p24 p17 p7 p6	Cápside (CA), proteína estructural. Proteína de la matriz (MA), miristilada. Proteína de la nucleocápside (NC): ayuda a la transcripción reversa. Papel en la gemación (dominio L)
Polimerasa (Pol)	p66, p51	Transcriptasa reversa (RT): ARNasa H-interior de la cápside.
Proteasa (PR)	p10	Procesamiento postraducciona de proteínas virales.
Integrasa (IN)	p32	Integración del ADNc viral.
Envoltura (Env)	gp120 gp41	Glicoproteína superficial (SU), une al receptor y correceptores del virus. Proteína transmembranal (TM) de la envoltura.
Tat	p14	Activador de la transcripción: síntesis de ARNm.
Rev	p19	Regulación de la expresión de

		ARNm viral.
Nef	p27	Regulación negativa de la presencia de CD4 y MHC-I en la membrana celular. Interferencia en la activación de linfocitos T.
Vif	p23	Incrementa la infectividad del virus y transmisión de célula a célula, ayuda a la síntesis del ADN proviral y/o en el ensamblaje del virión. Neutraliza la función de APOBEC, permitiendo que el virus pueda seguir su ciclo replicativo sin interrupción.
Vpr	p15	Transporte del complejo de preintegración al núcleo. Bloqueo del ciclo celular, en la fase G ₂ .
Vpu	p16	Ayuda en la liberación del virus, interrumpe los complejos gp160:CD4. Antagoniza la capacidad la proteína transmembrana Teterina, involucrada en la defensa innata antirretroviral.

1.5. CICLO DE REPLICACIÓN.

Al unirse gp120 a CD4, receptor principal del VIH en células del hospedero, ocurren cambios conformacionales en gp120 que exponen los dominios de unión al correceptor en gp120. Los receptores de quimiocinas CCR5 y CXCR4 funcionan como los principales correceptores del virus. La unión del correceptor causa otro cambio conformacional que expone el dominio de fusión en gp41, a través del cual se unen las membranas celular y viral, permitiendo la entrada del virus a la célula. El uso de uno u otro de los principales correceptores del VIH define el tropismo del virus. Los virus que utilizan CCR5 se denominan R5 e infectan eficientemente macrófagos, células dendríticas y linfocitos T, predominan en las etapas tempranas de la infección y no forman sincicios al cultivarse. Los virus que utilizan CXCR4 se denominan X4 e infectan exclusivamente linfocitos T, aparecen típicamente en etapas tardías de la infección, forman sincicios en cultivo y su presencia se asocia a velocidades más rápidas de caída de las cuentas de linfocitos T CD4+.

La cápside viaja a través de microtúbulos para anclarse en el poro nuclear. Al ocurrir la transcripción inversa del genoma viral y formarse el ala central de ADN, una estructura de triple cadena de ADN formada por la interacción en cis del tracto central de polipurina y la secuencia central de terminación en la parte media del genoma viral, ocurre la descapsidación del virus. La desencapsidación permite la formación del complejo de preintegración (PIC), incluyendo MA, RT, IN y Vpr. El PIC es transportado al interior del núcleo gracias a señales de localización nuclear en MA, IN y Vpr.

Una vez en el núcleo, el ADN viral puede integrarse en la cromatina por la actividad de la integrasa. Alternativamente, el ADN viral puede permanecer en forma episomal como círculos de dos LTR, círculos de un LTR y formas circulares rearrregladas. Estas formas episomales no generan infecciones productivas.

Una vez integrado, el genoma viral es transcrito, produciéndose ARN con múltiples eventos de corte y empalme (splicing) en etapas tempranas. Estos ARN tempranos originan a las proteínas reguladoras Tat, Rev y Nef. Tat funciona como transactivador de la transcripción de los genes virales, permitiendo la formación de transcritos largos. En etapas tardías de la transcripción se forman ARN con uno o ningún evento de corte y empalme, los cuales originan a las proteínas estructurales Env, Pol y Gag así como a las proteínas Vif, Vpr y Vpu. Los ARN son transportados al citoplasma por Rev. Mientras mayor cantidad de Rev esté presente, más rápidamente se sacan del núcleo los ARN, evitando así los eventos de corte y empalme. Los precursores de las proteínas estructurales y los genomas virales se ensamblan en balsas lipídicas en membranas de endosomas tardíos o en la membrana plasmática. Las poliproteína Gag, y Gag-Pol se dirige a las membranas por su característica miristilación en la región de MA.

Para la salida de nuevos viriones de la célula, el virus usurpa a los sistemas ESCRT, ordenadores del tránsito intracelular de vesículas. Gracias a interacciones con proteínas celulares ESCRT y a la contribución de la proteína viral Vpu, los nuevos viriones pueden gemar hacia el exterior a partir de la membrana plasmática o gemar hacia el lumen de cuerpos multivesiculares (MVB), para después ser liberados por fusión de éstos con la membrana plasmática.

Los nuevos viriones deben madurar para ser infecciosos. La proteasa viral lleva a cabo este proceso cortando las poliproteínas Gag y Gag-Pol, para generar proteínas maduras **(4)**.

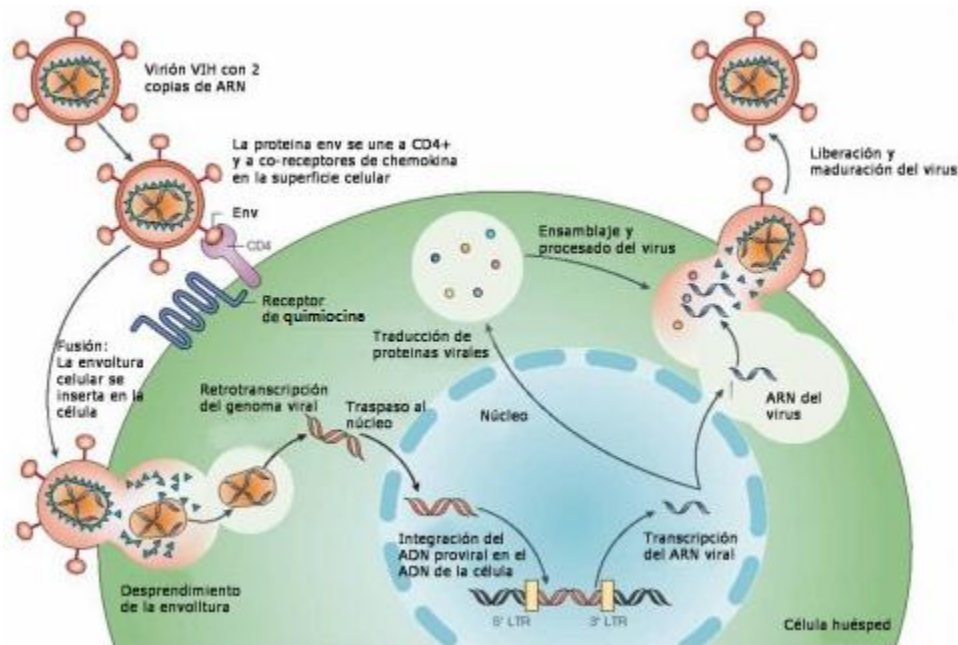


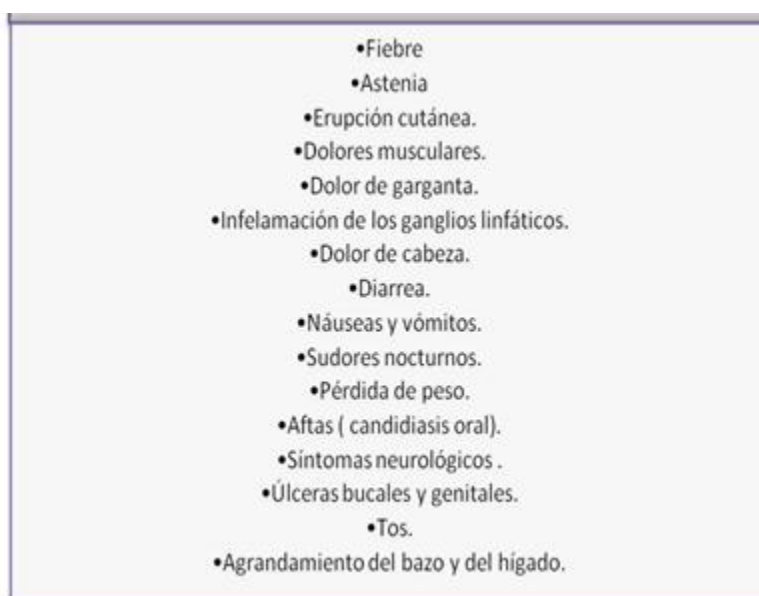
Figura 1.7. Ciclo de replicación del VIH. Una vez que el VIH ha logrado entrar al organismo, la gp 120 de la envoltura viral se une a la molécula CD4 en la membrana de los linfocitos T CD4. Posteriormente la envoltura viral se fusiona con la membrana celular permitiendo de esta manera la entrada de la cápside viral. Dentro de la célula las proteínas de la cápside permanecen asociadas al ARN viral (ARNv) mientras se copia a una cadena de ADN por medio de la ADN polimerasa dependiente de ARN ó transcriptasa reversa. Después el ARN es degradado por la ribonucleasa H y se sintetiza la cadena complementaria de ADN para generar ADN de doble cadena (provirus), el cual se integra al genoma celular mediante una serie compleja de reacciones que son catalizadas por la enzima integrasa. El provirus integrado puede permanecer latente por tiempo indefinido o puede forzar a la maquinaria celular para producir ARNv, el cual puede ser usado para la producción de proteínas virales, las que con el genoma del virus ensamblan nuevos viriones. Los nuevos viriones geman tomando parte de la membrana de la célula infectada. Una vez liberados, la proteasa viral corta la poliproteína precursora Gag para formar las subunidades que se ensamblarán formando la matriz, cápside y nucleocápside de los viriones maduros (5).

1.6. HISTORIA NATURAL DEL VIH.

La infección por VIH presenta tres fases (Figura 1.8) (5).

Fase Aguda:

La fase aguda se caracteriza por la detección de una alta viremia y síntomas clínicos inespecíficos. Además, se observa una disminución marcada del número de linfocitos T CD4+ circulantes en sangre. Una vez resuelto este periodo de entre 2-6 semanas, y coincidiendo con la aparición de inmunidad humoral y celular, la carga viral disminuye hasta alcanzar un valor que se mantendrá estable durante la mayor parte del curso de la infección. Así mismo, los conteos de linfocitos T CD4+ tienden a aumentar y estabilizarse en valores generalmente más bajos que los observados antes de la infección. La gravedad de la infección primaria difiere en cada paciente. Cerca del 50% no experimentan ningún síntoma. El cuadro 1 contiene una lista de los signos y síntomas de la infección primaria. A estos síntomas se les conoce por lo común como síndrome retroviral agudo. Es característico que los síntomas aparezcan 2 a 6 semanas después de la infección.



•Fiebre
•Astenia
•Erupción cutánea.
•Dolores musculares.
•Dolor de garganta.
•Inflamación de los ganglios linfáticos.
•Dolor de cabeza.
•Diarrea.
•Náuseas y vómitos.
•Sudores nocturnos.
•Pérdida de peso.
•Aftas (candidiasis oral).
•Síntomas neurológicos .
•Úlceras bucales y genitales.
•Tos.
•Agrandamiento del bazo y del hígado.

Cuadro 1. Signos y síntomas de la infección por VIH-1.

- **Etapa Crónica.**

La etapa crónica se caracteriza por valores más o menos estables de carga viral plasmática y una disminución lenta de los conteos de linfocitos T CD4+ en sangre. Aunque la mayoría de los pacientes permanecen asintomáticos durante esta fase, la replicación viral ocurre constantemente y de manera explosiva, generándose cerca de 1000 millones de viriones nuevos al día. La pérdida de las células T CD4+ ocurre generalmente dentro de un rango de 30 a 60 células/ μ L por año; sin embargo, el conteo de las células puede permanecer estable por mucho tiempo antes del periodo de rápido decremento que caracteriza a la etapa de SIDA.

Durante la fase crónica, aumenta la susceptibilidad del paciente a otras infecciones. Las respuestas del sistema inmune pueden estimular la producción del virus y acelerar la destrucción de los tejidos linfáticos, debido a que los estímulos que activan a los linfocitos T pueden favorecer la transcripción de los genes virales.

- **SIDA.**

Cuando los conteos de linfocitos T CD4+ caen por debajo de 200 células/ μ L, el riesgo de adquirir infecciones oportunistas aumenta considerablemente, definiendo la etapa terminal de la enfermedad por VIH, caracterizada por una franca inmunodeficiencia, y que es conocida como etapa de SIDA. Infecciones que rara vez afectan a personas con sistemas inmunitarios competentes, aparecen con alta frecuencia en las personas que alcanzan esta etapa, provocando finalmente la muerte si no se inicia el tratamiento antirretroviral.

Entre las infecciones y enfermedades oportunistas más frecuentes figuran:

- Enfermedades bacterianas: como la tuberculosis (causada por *Mycobacterium tuberculosis*), las infecciones por el complejo *Mycobacterium avium* (CMA), la neumonía bacteriana y la septicemia.

- Enfermedades causadas por protozoarios: como la neumonía por *Pneumocystis carinii* (NPC), la toxoplasmosis, la microsporidiosis, la criptosporidiosis, la isosporiasis y la leishmaniasis.
- Enfermedades micóticas: como la candidiasis, la criptococosis (meningitis criptococócica).
- Enfermedades víricas; tales como citomegalovirus (CMV), herpes simple y herpes zoster.
- Neoplasias asociadas al VIH, como el sarcoma de Kaposi, el linfoma y el carcinoma de células escamosas.

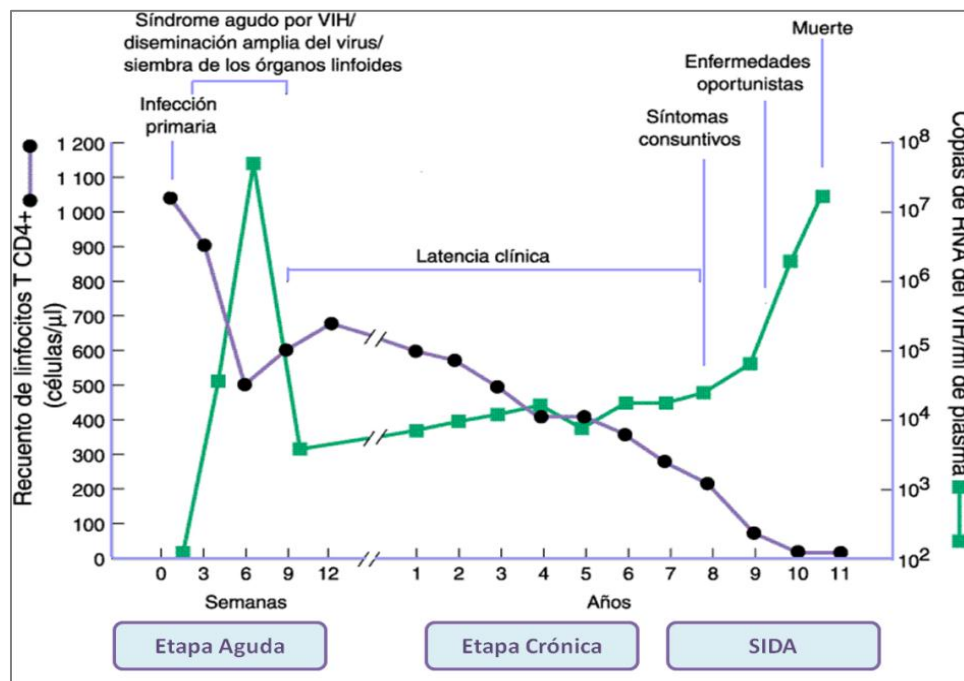


Figura 1.8. Evolución de carga viral y recuento de linfocitos T CD4+ en infección por VIH. Se muestran las tres etapas que caracterizan la historia natural típica de la infección por VIH (7).

1.7 CLASIFICACIÓN DEL VIH.

Actualmente, toda la clasificación de los diferentes aislados del VIH se basa en métodos filogenéticos que, en cierta manera, establecen grados de parentesco entre aislados, atendiendo al grado de similitud entre sus secuencias genómicas medido como distancia genética. La principal división se establece entre los dos tipos de VIH: tipo 1 (VIH-1) y el tipo 2 (VIH-2). Estos dos virus tienen orígenes evolutivos distintos al provenir de virus de inmunodeficiencia de simios (VIS) de diferentes especies. Así, el VIH-1 tuvo su origen por saltos zoonóticos del VIS del chimpancé al humano, mientras que el VIH-2 se originó por varios saltos zoonóticos del VIS del mono mangabey ahumado (sooty mangabey) al humano.

Dentro del VIH-1 se han establecido tres grupos: M (del inglés *main*, principal), O (*outlier*, distante) y N (*neither*, ni uno ni otro). El grupo M es el más diverso, y en él se han definido varios subtipos (A, B, C, D, F, G, H, J y K), aunque atendiendo a las divergencias genéticas, también estaría justificada la designación de subtipos en el grupo O (6). Los subtipos B y D son más próximos desde el punto de vista filogenético que cualquier comparación entre subtipos, pero no lo suficiente como para englobarse en un solo subtipo. De hecho, se conserva esta denominación por razones de congruencia histórica. Respecto al VIH-2 se han establecido hasta el momento seis subtipos (A, B, C, D, F y G).

Las infecciones de los subtipos pertenecientes al grupo M son las principales responsables de la pandemia global, especialmente el subtipo C. Los virus de subtipo B son los que presentan mayor prevalencia en Europa, Norteamérica, Centroamérica, Australia y Japón, aunque se ha detectado una tendencia hacia el incremento en la detección de subtipos no B y también formas recombinantes en varios países europeos. Por otra parte, los aislados de los grupos O y N son relativamente escasos y tienen una distribución prácticamente restringida a países del oeste y centro de África (**Figura 1.9**).

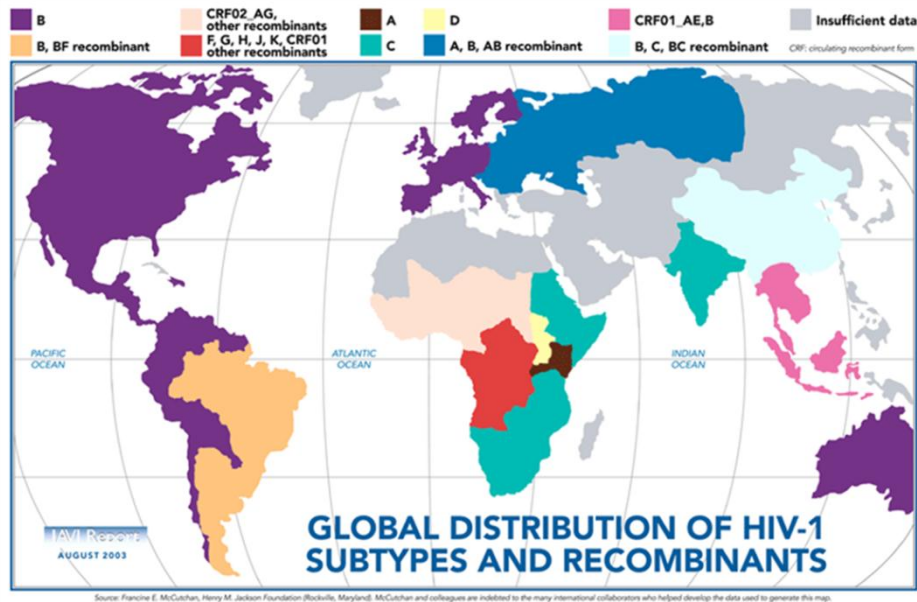


Figura 1.9. Distribución global de la diversidad del VIH. Se muestra la distribución geográfica de los subtipos del grupo M del VIH-1 y formas recombinantes importantes (6).

Anteriormente se ha descrito la recombinación genética como fuente de variación en retrovirus. De la importancia de este mecanismo da cuenta el hecho de su detección entre genomas de todos los tipos filogenéticos: entre diferentes lentivirus de primates, entre grupos de VIH, entre subtipos y dentro de subtipos (6). Algunos aislados de importancia epidemiológica están compuestos, precisamente, por virus cuyos genomas son resultado de la recombinación de diferentes subtipos y se denominan formas recombinantes circulantes (FRC, o CRF por sus iniciales en inglés). Algunas FRC constituyen virus con amplia circulación en algunas partes del mundo, como es el caso del sureste de Asia, donde predominan FRC AE, o algunos países Sudamericanos, donde se observan FRC BF con alta frecuencia.

1.8. PAPEL DE LAS PROTEÍNAS ACCESORIAS/REGULADORAS EN EL CICLO DE REPLICACIÓN DEL VIH.

Como se ha descrito anteriormente, el VIH posee en su genoma 9 genes de los cuales 5 (*gag*, *pol*, *env*, *tat* y *rev*) son esenciales para la replicación viral por su actividad estructural, enzimática o reguladora. El resto (*nef*, *vif*, *vpu* y *vpr*) son genes dedicados a varios aspectos de la evasión y manipulación de la respuesta inmune innata y adaptativa. Defectos en estos últimos han sido relacionados con la no progresión de la enfermedad al dar lugar a una infección menos patogénica (10). A continuación se detallan las funciones de las proteínas accesorias/reguladoras, así como su posible papel en la progresión de la enfermedad por VIH. Debido a la complejidad de la patogénesis del VIH y a las múltiples interacciones entre las proteínas accesorias/reguladoras y diferentes proteínas del hospedero, este grupo de proteínas virales son blancos atractivos para nuevas estrategias antirretrovirales y posibles vacunas. Así, es necesario estudiarlas exhaustivamente para describir su estructura y sitios específicos de interacción con proteínas del hospedero, así como para comprender mejor sus funciones.

1.8.1. Vif.

El factor de infectividad viral (Vif) deriva de su capacidad de promover la infectividad del virus. Vif se incorpora en los viriones en cantidades que se han calculado de 7 a 20 moléculas por partícula viral (4).

La función de Vif es la inhibición directa de un grupo de proteínas humanas que tiene un gran potencial antiviral denominadas APOBEC y principalmente de la variante APOBEC3G (A3G) y en menor medida APOBEC3F (**Figura 1.10**). Tal es la potencia de este factor antiviral que en ausencia de Vif sería suficiente para prevenir la infección productiva del VIH (15). La proteína A3G es una citidin desaminasa cuya actividad consiste en la desaminación de dC para producir dU en el ADN viral de cadena sencilla negativa que se origina en la transcripción inversa. Esta actividad tiene como resultado la hipermutación del genoma viral al

producirse sustituciones de guanina por adenina en la hebra positiva del ADN proviral. La hipermutación introduce frecuentemente cambios deletéreos, así como codones de paro que dañan irreversiblemente al virus, impidiendo su replicación (6).

Aunque este parece ser el mecanismo más importante de la acción antiviral de A3G, existen otros relacionados específicamente con el proceso de integración por los que se impide la síntesis de DNA viral independientemente de la desaminación (10).

Vif simultáneamente se une a una región específica de A3G y a una serie de proteínas celulares dando lugar a una cascada de señalización que lleva a la degradación de la proteína APOBEC dependiente de ubiquitinación por la vía del proteosoma (8). Vif causa la ubiquitinación de APOBEC vía una ligasa E3 cuyo reclutamiento depende de un complejo proteico de Culina 5 – Elonguina B – Elonguina C (Cul5-EloBC) (9). Este complejo se une a APOBEC a través de Vif, que funciona como proteína de enlace. Se sabe que Vif se une a Cul5-EloBC a través de un motivo caja BC (aminoácidos 144 a 153) y un sitio H-(X)₅-C-(X)₁₇₋₁₈-C-(X)₃₋₅-H (HCCH) de coordinación de zinc (aminoácidos 108 a 139) respectivamente. El zinc estabiliza una interfase dentro del motivo HCCH que es crucial para la unión de Vif Cul5-EloBC (9,10).

Las mutaciones en los residuos de histidina y cisteína en este motivo altamente conservado de Vif o en los residuos hidrofóbicos I120, A123 y L124 situados entre las dos cisteínas conservadas del motivo impiden la coordinación de zinc, la unión de Cul5 y la degradación de APOBEC.

El equilibrio entre Vif y APOBEC es dinámico y sujeto a variación. Descompensaciones de los niveles de estas proteínas o polimorfismos en las mismas se han asociado con variaciones en la progresión de la enfermedad. Esto sugiere que algunas mutaciones podrían intervenir con la función de Vif, al producir hipermutación en el virus mediante la actividad de APOBEC. El estudio

de estos sitios, que incluyen a K45, E75, E138 Y K185 podría ser interesante para el desarrollo de nuevos fármacos antirretrovirales que inhiban la función de Vif (4).

1.8.2. Vpr.

Si bien Vpr es considerada también una proteína accesoria, a pesar de su pequeño tamaño su función es la más amplia y trascendental para la replicación viral. Entre las funciones atribuidas a Vpr, destaca su efecto en la eficacia y precisión de la transcripción inversa pues tiene la capacidad de modular la tasa de mutación del VIH. Esta actividad correlaciona con la interacción de Vpr con la uracil ADN glicosilasa 2 (UNG2), una enzima que remueve residuos de uracilo del ADN que pueden incorporarse equivocadamente o generarse por desaminación de citosina (4,11).

Otra función importante de Vpr es su participación en el transporte nuclear del ADN viral como componente del complejo de preintegración al promover interacciones directas o indirectas con la maquinaria celular que regula el transporte entre el núcleo y el citoplasma (11).

Adicionalmente, Vpr modifica la progresión del ciclo celular deteniéndolo en la fase G₂ en las primeras horas de la infección, por inactivación del complejo cinasa dependiente de ciclina. Aún no se comprende totalmente esta función de Vpr, pero se cree que el LTR es más activo durante la fase G₂, lo que confiere un ambiente celular favorable para la transcripción eficiente de genes del VIH (4,11).

Además, Vpr regula la apoptosis tanto por vías dependientes, como por vías independientes de caspasas (**Figura 1.10**) (16). El objetivo final de estos procesos es favorecer la replicación viral.

Se han descrito diversos polimorfismos en esta proteína que están representados mayoritariamente en personas que no progresan a sida (4,12). Un importante e interesante hallazgo es que los pacientes no progresores tienen mutaciones más altas en el residuo R77 y Q65 de Vpr que los progresores normales (13). Estos

residuos parecen ser cruciales para que Vpr cause apoptosis por permeabilización de la membrana mitocondrial (4).

1.8.3. Vpu.

Vpu es una proteína integral de membrana que se traduce a partir de ARNm bicistrónicos *vpu-env* en cantidades intracelulares similares a Gag. Sin embargo, no se ha detectado dentro de los viriones.

Vpu posee dos dominios con diferentes actividades: el dominio transmembranal (TM) involucrado en la salida de nuevos viriones de las células infectadas y el dominio citoplasmático, implicado en la degradación de CD4 (4,14)

Vpu causa la degradación de CD4 al servir de enlace entre este receptor y proteínas de la vía de degradación del proteosoma. Se cree que esta función es importante para liberar a la proteína Env de su interacción con CD4, permitiéndole continuar su transporte hacia la membrana (4,14).

Otra función importante de Vpu es su capacidad de inhibir la acción de una proteína celular que afectaría directamente a la liberación del virus (14). Esta proteína se denomina Teterina (o BST-2, del inglés bone marrow stromal cell antigen-2) y sirve para unir las balsas lipídicas ricas en colesterol de la membrana plasmática. El virus sale de la célula a través de esa zona, donde la Teterina actúa anclando el virus a la membrana celular e impidiendo así su salida (**Figura 1.10**) (16). Vpu interacciona con Teterina, reclutando proteínas celulares que llevan a la degradación endosomal del complejo (14).

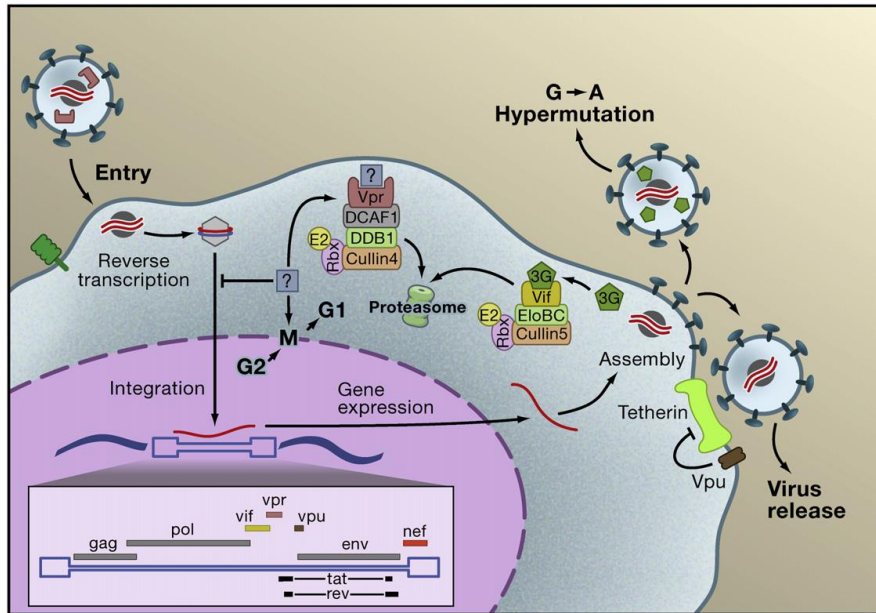


Figura 1.10. Representación de las funciones de las proteínas accesorias Vif, Vpr, Vpu. El recuadro muestra la organización genómica de VIH-1 y pone de manifiesto la presencia de genes accesorios (15).

1.8.4. Tat.

Tat es una proteína de 23-kDa nombrada por su participación en la transactivación de la transcripción de VIH. Al interactuar con proteínas celulares, Tat ayuda en la transcripción del ARN viral al unirse a la región de respuesta de transactivación (TAR) presente en el LTR del ARNm viral. Esta proteína viral funciona principalmente permitiendo la elongación de los mRNA a partir del promotor. La interacción del complejo factor positivo de la elongación de la transcripción (P-TEFb) con el complejo Tat-TAR aumenta sustancialmente la transcripción al promover la fosforilación del dominio carboxilo terminal de la ARN polimerasa celular. P-TEFB está compuesto por ciclina T1, CDK9 y 7 SK snARN (4).

Se ha implicado a Tat en diversos procesos biológicos y se sabe que esta proteína funciona de manera temprana en el proceso infeccioso. La proteína Tat es liberada por las células infectadas y puede ser tomada fácilmente por otras células, influyendo en su funcionamiento (17). Tat tiene secuencias similares a las β -quimiocinas y, por lo tanto, puede ser un potente quimioatrayente para los

monocitos, basófilos y mastocitos. Las proteínas Tat comparten receptores de superficie celular con MCP-1, MCP-3 y eoxatina y también pueden aumentar la diseminación del virus al regular positivamente la expresión de CCR5 y CXCR4. Tat soluble inhibe la interacción de los virus X4 con CXCR4 y puede estar involucrada con la selección de los virus R5 durante la infección VIH.

En términos del sistema inmune, Tat regula positivamente la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y puede aumentar la producción de IL-12, TNF- α y β -quimiocinas. Así mismo, Tat promueve la maduración y las funciones de presentación de antígeno de las células dendríticas derivadas de monocitos, lo que lleva a una respuesta inmune tipo 1. La función de las células T y las células B para procesar antígenos y la expresión de epítomos de CTL puede mejorarse a través de la infección o por el contacto con la proteína Tat soluble. Con respecto a la función de las células B, se ha demostrado que Tat inhibe la proliferación de las células B vírgenes y de memoria, pero mejora la proliferación de las células B del centro germinal inducida por anti-CD40 e IL-4 (4).

En general, las funciones específicas de Tat en las células parecen depender de su nivel de expresión y de los tipos de células infectadas. Distintos dominios de la proteína Tat son responsables de su papel en la transactivación y en la supresión de la respuesta inmune.

1.8.5. Rev.

La proteína Rev (~ 18 kD), regula la expresión del ARN viral controlando el ritmo de exportación del ARNm hacia el citoplasma. El gen *rev* codifica las proteínas que favorecen la formación del ARNm viral sin corte y empalme (splicing) o con un solo evento de corte y empalme; en su ausencia sólo se forman pequeños ARNm con dos o más eventos de corte y empalme. Rev interacciona con un asa compleja de ARN presente en el gen *env* llamada elemento de respuesta a Rev (RRE) y con las proteínas de la maquinaria de exportación de ARNm fuera del núcleo. Rev posee una región de exportación nuclear (NES) rica en leucina (18). El transporte a través del núcleo se da por la interacción de las NES de Rev con

CRM1/exportina-1, una proteína de la familia de las beta-importinas, y es mediado por RanGTP (19).

La acción sinérgica de Tat y Rev incrementa fuertemente la expresión de proteínas virales. Los papeles que desempeñan en la regulación transcripcional del VIH y en la expresión de las proteínas estructurales, respectivamente, hacen a Tat y Rev esenciales para el ciclo de vida del virus.

1.8.6. Nef.

Nef (factor negativo) es una proteína presente únicamente en lentivirus de primates que posee un papel fundamental en la patogénesis del VIH. A pesar de su nombre, ahora se sabe que Nef aumenta la replicación e infectividad virales. En general, Nef modifica el ambiente interno de la célula infectada para optimizar la replicación viral. Es notorio que macacos infectados con SIVs carentes del gen *nef* o individuos infectados por VIH con proteínas Nef codificadas por genes que contienen deleciones importantes en su secuencia y que son seleccionadas *in vivo*, típicamente progresan lentamente hacia SIDA (20, 22). La potenciación de la virulencia del VIH causada por Nef está asociada a su capacidad de funcionar como una proteína adaptadora, modulando funciones celulares como el tráfico de proteínas, transducción de cascadas de señalización y vías apoptóticas a través de interacciones proteína-proteína (21, 23).

Nef es una de las primeras proteínas virales que se producen, además de ser una de las más abundantes, y típicamente lleva a cabo sus funciones en membranas, a donde es reclutada por miristilación. Además, Nef se encuentra también dentro del virión, asociado a la cápside.

Entre las funciones específicas atribuidas a la proteína Nef se encuentra la regulación negativa de varias proteínas celulares de superficie, con importantes consecuencias para el reconocimiento inmune de las células infectadas. Es bien sabido que Nef tiene la capacidad de regular negativamente la expresión de CD4 al enlazar el dominio citoplásmico de este receptor con pozos recubiertos de clatrina a través de la interacción con la proteína adaptadora 2 (AP2). Esta

interacción promueve la endocitosis de CD4. Una vez en el endosoma, Nef conecta a CD4 con coatómeros COP-I, dirigiendo a CD4 hacia degradación lisosomal (23,24). Esta actividad de Nef limita la superinfección y mitiga los efectos inhibitorios de CD4 en la liberación de nuevos viriones y en la incorporación de Env.

Nef también regula negativamente la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I, pero a través de un mecanismo distinto al que utiliza para disminuir la expresión de CD4 (25). Este mecanismo involucra la formación de complejos Nef-MHC-I y su redireccionamiento dependiente de AP1 de la vía trans-Golgi a lisosomas (26) o alternativamente, la internalización directamente de la membrana plasmática a través de una vía dependiente del factor de ADP-ribosilación 6 (ARF6) (27).

Esta función de Nef limita la actividad de los linfocitos T citotóxicos (CTLs) para reconocer y eliminar células infectadas, proporcionando al VIH un mecanismo de evasión de esta respuesta inmune. La presencia de mutaciones que evitan la regulación negativa de MHC-I por Nef aumenta significativamente la susceptibilidad de las células infectadas a ser eliminadas por CTLs *in vitro* (28-29).

Además, aunque la disminución de expresión de MHC-I hace a las células infectadas susceptibles de ser destruidas por células NK, Nef puede evitar esta respuesta al no disminuir la expresión de HLA-C y HLA-E, moléculas MHC-I asociadas con protección a destrucción por células NK (30). Esta especificidad radica en diferencias en aminoácidos entre las colas citoplásmicas de las moléculas sensibles y resistentes a la acción de Nef.

Varios estudios sugieren que Nef es capaz de potenciar la infectividad del VIH, esta función de Nef parece manifestarse en etapas tempranas post-entrada del ciclo de replicación del VIH, posiblemente ayudando a la desencapsidación del virus o tal vez regulando el transporte de la cápside viral. Nef también podría intervenir en el transporte de proteínas virales o factores celulares involucrados en la entrada o salida del virus. Se ha reportado que Nef afecta el tráfico y

procesamiento proteolítico de Env. Nef aumenta la localización de Env en membranas endosomales en células productivas e incrementa su incorporación en las partículas virales. También se sabe que Nef se une a la poliproteína Gag-Pol. Sin embargo, los mecanismos a través de los cuales Nef aumenta la infectividad viral necesitan todavía ser elucidados.

1.9. ANTÍGENOS LEUCOCITARIOS HUMANOS (HLA) Y RESPUESTA DE LOS LINFOCITOS T CITOTÓXICOS (CTLs).

Los genes que codifican las moléculas HLA se encuentran agrupados en una región del brazo corto del cromosoma 6 denominada Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés). Los genes HLA se organizan en regiones que codifican para tres clases de moléculas (**Figura 1.11**):

Genes HLA de clase I: codifican para glicoproteínas que se expresan en la superficie de casi todas las células nucleadas; la principal función de los productos génicos de clase I es la presentación de péptidos antigénicos a los linfocitos T citotóxicos (CTLs).

Genes HLA de clase II: codifican para glicoproteínas que se expresan sobre todo en células presentadoras de antígeno (macrófagos, células dendríticas y células B), donde presentan péptidos antigénicos procesados a células T ayudadoras (Th).

Genes HLA de clase III: codifican, entre otros productos genéticos para varias proteínas secretadas que desempeñan funciones inmunitarias, incluyendo componentes del sistema de complemento y moléculas relacionadas con la inflamación.

Las moléculas de HLA-I se expresan en la superficie de todas las células nucleadas del organismo y llevan unidos péptidos endógenos que pueden ser propios o derivados de microorganismos. Las moléculas HLA-II se expresan en la superficie de linfocitos B, monocitos, macrófagos, células dendríticas, células de Langerhans y llevan unidos péptidos derivados de proteínas exógenas.

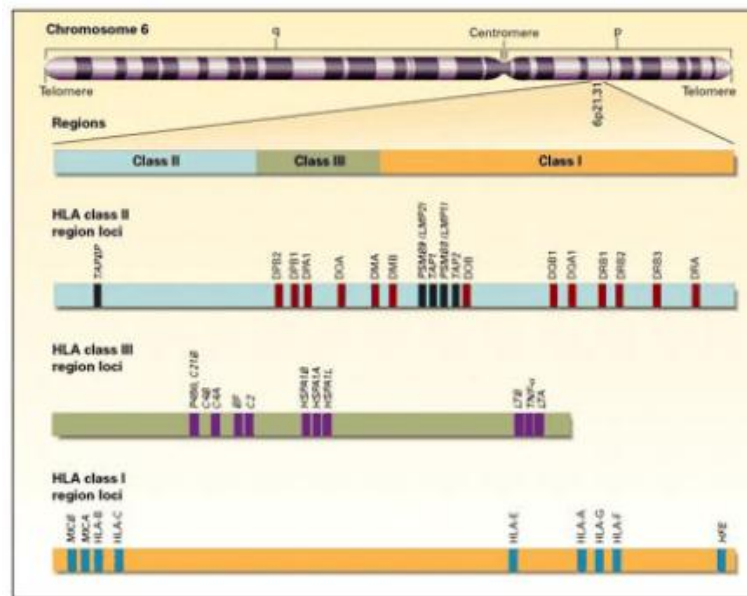


Figura 1.11. Los genes que codifican las moléculas HLA se encuentran agrupados en una región del cromosoma 6 denominada **Complejo Mayor de Histocompatibilidad**, que juega un papel fundamental en la regulación de la respuesta inmune (10).

Los genes HLA desempeñan un papel central en la respuesta inmunitaria frente antígenos proteicos, ya que los linfocitos T específicos para un antígeno no reconocen a estos en su forma libre ni en forma soluble, sino que reconocen porciones de los antígenos proteicos (es decir péptidos), unidos de forma no covalente a productos génicos del HLA.

La moléculas del HLA de clase I contienen una cadena α vinculada de manera no covalente con una molécula de microglobulina β_2 . La cadena α es una glicoproteína transmembranal codificada por los genes polimórficos dentro de las regiones A, B y C del complejo HLA. El dominio α forma una hendidura de unión al péptido, que es lo bastante grande para unir péptidos de ocho a diez aminoácidos (33).

Un aspecto fundamental del reconocimiento del antígeno por las células Th y los CTLs, es que los linfocitos reconocen antígenos peptídicos sólo cuando éstos están unidos a una forma alélica de una molécula HLA. A este fenómeno se le denomina restricción por HLA (32). Una molécula HLA particular puede unir muchos péptidos diferentes.

Como los alelos del HLA se expresan de manera codominante, un individuo heterocigoto expresa en sus células los productos génicos codificados por ambos alelos en cada locus del HLA; lo que significa que expresa alelos A, B y C de cada progenitor en la membrana de cada célula nucleada. (33)

La expresión de las seis moléculas HLA de clase I permite que cada célula tenga la capacidad de presentar un gran número de péptidos en las hendiduras de unión al péptido de sus moléculas HLA (33).

Cuando un individuo es homocigoto tiene una expresión limitada de péptidos y por lo tanto se reduce el repertorio de antígenos que pueden ser presentados a linfocitos T.

Existen dos vías de procesamiento y presentación de antígeno, la vía citosólica y la vía endocítica. Como regla general, los antígenos endógenos (los que se generan dentro de la células) se procesan en la vía citosólica y se presentan en el contexto de moléculas HLA de clase I; los antígenos exógenos (los que se captan por endocitosis) se procesan en la vía endocítica y se presentan en la membrana con moléculas HLA de clase II (33).

Por la vía citosólica o endógena, el complejo HLA de clase I se une al péptido que deriva de las proteínas virales, bacterianas y propias (que derivan del recambio normal de proteínas propias (33)). Esta vía comienza con el marcaje de las proteínas para la proteólisis con una proteína pequeña, llamada ubiquitina.

Esta marca de las proteínas es reconocida por un sistema proteolítico presente en todas las células llamada proteosoma. El proteosoma rompe enlaces peptídicos en un proceso dependiente de ATP, formando así péptidos pequeños para la

presentación con moléculas HLA clase I (32,33). Estos péptidos son transportados al retículo endoplásmico rugoso por una proteína TAP (transportador relacionado con procesamiento de antígenos), para su unión con el HLA de clase I. Una vez unido el péptido, la molécula de clase I presenta mayor estabilidad y puede salir del retículo endoplásmico y avanzar a la superficie celular vía el complejo de Golgi (32,33).

La expresión de las moléculas HLA de clase I en las células nucleadas y la presencia de la vía de carga de péptidos en dichas moléculas, a través de un mecanismo ligado a la ubiquitina para la degradación de proteínas celulares, garantiza que los péptidos de prácticamente cualquier proteína intracelular puedan ser presentados para ser reconocidos por los CTLs.

De esta manera los CTLs pueden lisar cualquier célula que produzca un antígeno extraño. Así los CTLs específicos reconocen células infectados, mediante la unión de sus receptores de células T (TCR) a los complejos HLA- péptido expresados en la superficie (33). Esto permite la activación de los CTLs, con la consecuente liberación del contenido de sus gránulos citotóxicos que incluyen citotoxinas como perforina, que forma poros en las membranas celulares y serín proteasas llamadas granzimas, que inducen a la apoptosis de la célula infectada. De esta manera la respuesta de los CTLs está definida y restringida por los genes HLA de clase I.

1.10. VARIABILIDAD DE HLA.

Como se ha mencionado arriba, la región HLA en los humanos que se localiza en el cromosoma 6, es muy polimórfica. De los tres loci HLA que codifican para moléculas clásicas de clase I con función de presentación de antígeno (HLA-A, HLA-B y HLA-C), el HLA-B es el más polimórfico. Se han descrito 1795 proteínas diferentes para HLA-B, comparados con los 1290 proteínas para HLA-A y los 946 proteínas para HLA-C (IMGT/HLA Database, <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla>).

Este alto polimorfismo de los genes HLA trae como consecuencia que los diferentes alelos HLA se distribuyan con frecuencias altamente variables en las diferentes poblaciones en el mundo (31). Este polimorfismo ha sido generado por

recombinación, mutación puntual y conversión génica, todo lo cual contribuye a la diversidad de genes HLA dentro de la población (33).

El extenso polimorfismo del HLA clase I se limita a los residuos que se encuentran en el sitio de unión al péptido de estas moléculas (31,34). De esta forma se definen los péptidos que se unirán a cada molécula HLA. El significado evolutivo del notable polimorfismo de las moléculas de las moléculas HLA de clase I radica en que pequeñas diferencias entre las múltiples moléculas de HLA y los péptidos que estas presentan conllevan a diferencias funcionales importantes en las respuestas inmunes restringidas por diferentes moléculas HLA hacia patógenos específicos, incluyendo al VIH.

Estas diferencias funcionales son blanco de selección natural, es decir, definen a individuos dentro de una población con mayor o menor susceptibilidad al avance de la enfermedad (31).

1.11. PAPEL DEL HLA EN LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH).

Los genes HLA de clase I son un componente fundamental del sistema inmune y restringen respuestas necesarias para controlar infecciones intracelulares por medio de la presentación de péptidos provenientes de organismos patógenos a CTLs. La unión del péptido a la molécula HLA es crítica, ya que el HLA actúa como un filtro que restringe los epítopes específicos dentro de un patógeno que serán reconocidos por el sistema inmune, algunos de los cuales son más eficaces que otros para controlar la replicación viral, jugando un papel importante en la velocidad de avance de la enfermedad por VIH (34).

El papel de los CTLs es eliminar las células infectadas por el virus a través del reconocimiento de péptidos lineales y cortos procesados intracelularmente y presentados en la superficie celular por moléculas HLA de clase I. De esta forma todas las proteínas virales tienen la capacidad de unirse y ser presentadas por moléculas HLA de clase I. Las respuestas de los CTLs restringidas por los genes HLA de clase I seleccionan mutaciones de escape inmune. Este hecho, aunado a

la observación de que los CTLs probablemente contribuyen más con el control inmune en la infección por VIH-1 que los anticuerpos, destaca el papel de los CTLs como una importante fuerza de selección que conduce a la evolución del virus en términos de su genoma (35).

Existe una correlación entre la aparición de las respuestas CTLs específicas contra el VIH *in vivo* y la disminución de la viremia en la fase aguda. Aunado a esto, se ha observado una fuerte correlación epidemiológica entre la presencia de alelos específicos HLA de clase I y diferentes velocidades de progresión de la enfermedad por VIH-1, lo cual sugiere que la calidad de las respuestas de los CTLs y/o las características de los epítopes blancos influyen fuertemente en la infectividad del control viral (35).

Se sabe que la mayoría de los epítopes que están relacionados con valores bajos de carga viral, son aquéllos específicos del gen *gag* (35). La razón es porque las proteínas de Gag son altamente inmunogénicas y sus secuencias son altamente conservadas, por lo que una mutación de escape dentro de ellas implica frecuentemente una reducción en la capacidad de replicación viral. De esta manera, muchos estudios de control inmune se han realizado siguiendo la aparición de mutantes de escape tempranas en Gag (35). Adicionalmente, el número de polimorfismos de aminoácidos específicos de Gag asociados con cada alelo HLA-B tiene una fuerte correlación con la media de carga viral de los individuos que presentan estos alelos y con eso en la progresión de la infección por VIH.

Por lo tanto, no sólo el número de epítopes de Gag que son presentados por cada alelo es importante sino también la presencia de respuestas de CTLs específicos de Gag que conducen a la selección de mutantes de escape que tiene un impacto en la capacidad replicativa viral. Cabe destacar que esta relación aplica predominantemente a los alelos HLA-B y las respuestas específicas de Gag (31). Es evidente que en la infección por VIH, existe un mayor impacto de las moléculas HLA-B en el establecimiento del set-point viral, en comparación con las moléculas

HLA-A y HLA-C; pues el HLA-B es el locus más polimórfico y tiene la capacidad de presentar una variedad más amplia de péptidos (31).

El cambio de un aminoácido, aparentemente insignificante, entre alelos HLA cercanos puede ser crucial para la resolución de una infección. En el caso de la infección por VIH, un ejemplo muy claro es la asociación del HLA-B *3502 y HLA-B*3503 con una progresión rápida de la enfermedad, lo que no sucede con el alelo HLA-B*3501, el cual difiere de HLA-B *3502 y HLA-B*3503 por sólo tres y un aminoácido respectivamente (31). En el caso del gen HLA-B*35, los pequeños cambios observados en los aminoácidos que conforman la hendidura de unión al péptido de los diferentes alelos pueden afectar la unión del aminoácido carboxilo-terminal del péptido antigénico; el residuo preferencial para la unión del péptido en la hendidura del HLA-B*3501 es tirosina, mientras que un residuo hidrofóbico es preferido para la unión de péptidos a la hendidura del HLA-B*3502 y HLA-B*3503. Así los péptidos capaces de unirse a la hendidura de la molécula HLA-B*3501 que incluyen los epítopes de Gag p24, no son reconocidos por los alelos HLA-B*3502 y HLA-B*3503. Estas diferencias traen como consecuencia una ausencia de respuestas de CTLs específicas para Gag en pacientes con los alelos HLA-B*3502 y HLA-B*3503, las cuales son cruciales para el control viral (31).

Algunos estudios han logrado darles una jerarquía a ciertos péptidos del VIH (péptidos inmunodominantes) que, en asociación con alelos específicos del HLA-I, favorecen una respuesta inmune protectora o limitante en cuanto al avance de la enfermedad (**Tabla 1.3.**).

Tabla 1.3. Asociaciones entre alelos HLA de clase I y el grado de avance de la infección por VIH-1. Modificada de (31).

Alelo HLA de clase I	Avance de la enfermedad	Setpoint de carga viral.
HLA B*1302	Lento	Bajo
HLA B*1801	Rápido	Alto
HLA B*2705	Lento	Bajo
HLA B*3502 HLA B*3503	Rápido	Alto
HLA B*5101	Lento	Bajo
HLA B*5701 HLA B*5701 HLA B*5701	Lento	Bajo
HLA B*5801	Lento	Bajo
HLA B*5802	Rápido	Alto
HLA B*8101	Lento	Bajo

1.12. EVOLUCIÓN DEL VIH.

En el curso natural de la infección por VIH, la respuesta inmune del hospedero actúa como una presión de selección, que dirige la evolución del VIH-1 en un proceso dinámico y continuo conocido como “escape inmune” (36). La respuesta de los CTLs restringida por los genes HLA, es el principal mediador del control antiviral del hospedero durante la infección por VIH-1 (36) y su aparición está relacionada con la disminución de la viremia en la fase aguda (34).

Dado que cada alelo HLA reconoce un repertorio definido de péptidos, las mutaciones de escape reflejarán el repertorio de alelos presentes en el individuo.

Esta presión selectiva dirigida por los genes HLA sobre el VIH puede también observarse a nivel poblacional, de acuerdo a las distribuciones de frecuencias alélicas observadas en la población. Estudios iniciales establecieron la posibilidad de la evolución adaptativa en el VIH, mostrando el papel de los CTLs en el control de la infección, la aparición de mutantes de escape y su capacidad de ser transmitidas y acumularse (36). Posteriormente, el hallazgo de una asociación en un nivel poblacional entre los polimorfismos en la secuencia del virus y ciertos alelos HLA se consideró una huella de la selección por CTLs, cuyos mecanismos inmunológicos y su acción actual han sido también descritos (38, 39).

Framh y colaboradores, demostraron a través de un análisis de respuestas de CTLs hacia VIH en cohortes de pacientes de varios grupos étnicos, empleando péptidos sobrelapados de todo el genoma del virus, que el 88% de los péptidos utilizados fueron reconocidos, y que Nef y Gag dominaban el total de respuestas específicas de CTLs en cada uno de los grupos étnicos, tanto en términos de amplitud como magnitud (40). Sin embargo, en el caso de México y como parte de un estudio preliminar realizado en el Centro de Investigación de Enfermedades Infecciosas (CIENI) del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) para caracterizar las respuestas de CTLs a nivel poblacional en el contexto inmunogenético de la población mexicana, se observó una frecuencia respuestas de CTLs especialmente alta en la región de proteínas accesorias (41). Aunque la alta densidad de respuestas en las regiones en Gag y Nef previamente reportada se conservó para la cohorte mexicana, la alta frecuencia de respuestas en la zona de proteínas accesorias característica de la cohorte mexicana no se había observado en otros estudios. Es importante estudiar el impacto de la respuesta inmune en la variabilidad y función de las diversas proteínas accesorias, dada su importancia para la replicación del virus *in vivo*. Los resultados preliminares del estudio mexicano abren la posibilidad de inclusión de respuestas inmunes dirigidas a la región de proteínas accesorias en una vacuna efectiva en la población mexicana y hacen necesario estudiar más a fondo la evolución de la región de proteínas accesorias de los virus circulantes en la región.

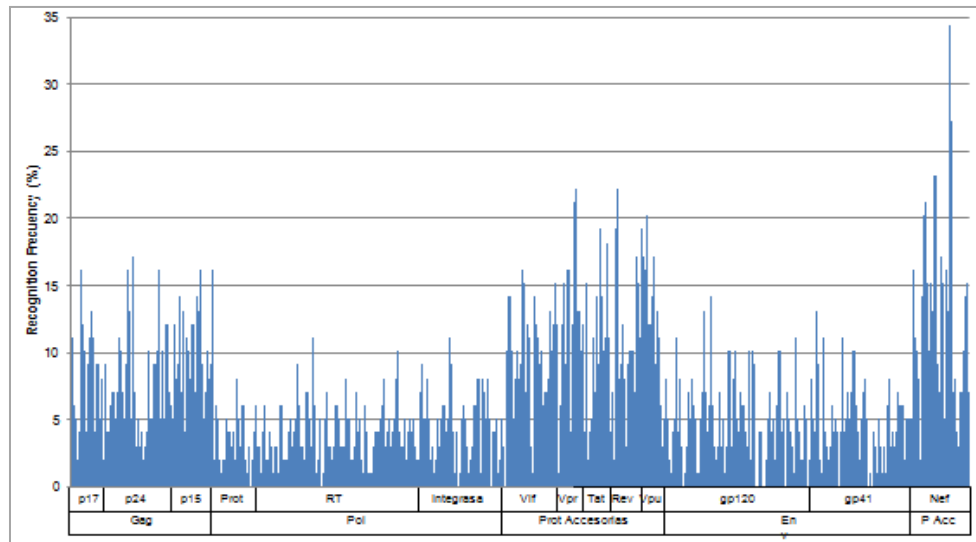


Figura 1.12. Respuestas de CTLs a todo el proteoma del VIH en México. Se probó un panel de 780 péptidos superpuestos, cubriendo todo el proteoma viral, en una cohorte de 100 pacientes mexicanos. Las respuestas de CTLs fueron medidas ex vivo en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de los pacientes, estimuladas con un panel de pools de péptidos. Las respuestas se identificaron por ELISPOT de interferón gamma. Se muestra una alta densidad de respuestas en la región de proteínas accesorias/reguladoras del VIH circulante en México (Valenzuela-Ponce et al, datos no publicados).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Diversos estudios establecen que la gran capacidad de variación del VIH permite al virus adaptarse muy eficientemente a diversas presiones selectivas impuestas sobre él. Es bien sabido que la principal presión selectiva sobre este virus consiste en el reconocimiento por linfocitos T citotóxicos (CTLs), de péptidos virales en células infectadas asociados a moléculas HLA de clase I. Dado que cada alelo HLA reconoce un repertorio definido de péptidos, las mutaciones de escape seleccionadas en el VIH serán específicas para los alelos HLA presentes en el individuo. Las variantes del virus capaces de evadir la acción de los CTLs presentarán una ventaja en presencia del alelo HLA selector.

Así mismo, existe evidencia abundante de que la presión selectiva por HLA puede observarse a nivel poblacional en los virus circulantes, dirigiendo la evolución del virus de manera diferente en diferentes poblaciones, de acuerdo a sus características inmunogenéticas. La acumulación o reversión de las mutaciones de adaptación a distintos alelos HLA dependerá de la frecuencia de dichos alelos en la población y del costo de dichas mutaciones en la aptitud replicativa del virus. La presencia del alelo HLA selector en un número importante de personas en una población hará que la mayoría de los virus circulantes mantengan la mutación de escape, mientras que las mutaciones con bajos costos en la capacidad replicativa del virus tenderán a acumularse en los virus circulantes a medida que la epidemia avanza, al no revertir en individuos carentes del alelo HLA selector.

La variabilidad de la región de proteínas accesorias/reguladoras, así como el impacto de la presión selectiva por HLA en esta región genética del VIH no han sido estudiadas en el contexto inmunogenético de la población mexicana. Estudios previos (40) han mostrado la existencia de características únicas en la evolución dirigida por HLA del VIH circulante en México, en comparación con la estudiada en poblaciones caucásicas y africanas. Estas observaciones, aunadas a las observaciones preliminares de una alta densidad de respuestas de CTLs hacia la región de proteínas accesorias/reguladoras medidas ex vivo en pacientes mexicanos (Valenzuela-Ponce, et al, datos no publicados), hacen especialmente

relevante estudiar el impacto de la presión selectiva por HLA en esta región del VIH a nivel poblacional en nuestro país. Estos estudios son relevantes dada la importancia funcional de las proteínas accesorias para la replicación viral y su posible implicación en tratamientos antirretrovirales novedosos o en vacunas candidatas.

En el presente proyecto se evaluará por primera vez la diversidad de la región genética de las proteínas accesorias/reguladoras en VIH circulante en México, atendiendo especialmente a sitios funcionalmente importantes para cada una de las proteínas virales. Así mismo, se evaluará el posible impacto de la presión selectiva por HLA sobre esta región genética del VIH en el contexto inmunogenético de la población mexicana.

3. Objetivos.

3.1. Objetivo General.

- Estudiar la variabilidad genética dentro de la región de proteínas accesorias/reguladoras en VIH circulante en México y su relación con la adaptación del VIH a las respuestas inmunes restringidas por HLA de la población mexicana.

3.2. Objetivos Particulares.

- Secuenciar la región de las proteínas accesorias / reguladoras del VIH en una cohorte de pacientes mexicanos, evaluando la variabilidad y diversidad de los virus en esta región genética.
- Asociar la presencia de polimorfismos en la región de proteínas accesorias / reguladoras con posibles puntos de presión selectiva por respuestas inmunes altamente frecuentes en la población mexicana.
- Establecer posibles sitios de interés funcional en las proteínas accesorias / reguladoras, cuya variabilidad pueda afectar a la capacidad replicativa del virus.

4. Hipótesis.

Dada la observación previa de una alta densidad de respuestas de CTLs en la región de proteínas accesorias / reguladoras del VIH de pacientes mexicanos, se espera una alta cantidad de posiciones bajo presión selectiva por alelos HLA característicos de la población mexicana en esta región del genoma del virus circulante en el país. Es factible que algunas de estas posiciones bajo presión selectiva por HLA se encuentren en regiones funcionalmente importantes para la actividad de las diferentes proteínas accesorias / reguladoras y que por tanto impacten en la capacidad replicativa del virus. Estos sitios podrían representar blancos de interés para el desarrollo de tratamientos antirretrovirales y vacunas candidatas en el contexto inmunogenético específico de la población mexicana. Más aún, el estudio del impacto de diversas presiones selectivas sobre la región de proteínas accesorias / reguladoras del VIH circulante en México podría correlacionarse con características de patogenicidad del virus, cuyo conocimiento es importante para entender los mecanismos de control viral.

5. Metodología.

Pacientes.

En el presente estudio participaron 200 personas de la cohorte de Epidemiología y Evolución del Centro de Investigación de Enfermedades Infecciosas (CIENI) del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), vírgenes a tratamiento antirretroviral. Los participantes fueron reclutados en clínicas de atención a personas que viven con VIH de diversos estados de la República Mexicana; entre los que destacan: (Norte) Baja California, Nuevo León, Sonora, Tijuana; (Sur) Chiapas, Guerrero, Oaxaca; (Centro) Estado de México, Distrito Federal, Hidalgo, Morelos, Puebla; (Este) Veracruz, (Oeste) Jalisco. Todos los pacientes firmaron consentimiento escrito antes de participar en el estudio. El estudio fue aprobado por el Comité de Ciencia y Bioética del INER. Todos los pacientes donaron muestras de sangre, las cuales fueron enviadas a y procesadas en los laboratorios del CIENI, INER. Para todos los pacientes participantes se realizaron las pruebas de carga viral plasmática de VIH y de conteo de linfocitos T CD4+, rutinariamente practicadas en el laboratorio de diagnóstico virológico del CIENI, INER.

El procedimiento de análisis de los genes accesorios/reguladores del VIH se desarrolló en cinco etapas básicamente, la primera consistió en la extracción del RNA viral (QIAquick viral RNA extraction kit, QIAGEN, Valencia, CA), seguida de la amplificación de la secuencia de los genes accesorios (*Vif/Vpr/Vpu*) del VIH mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Posteriormente se llevó a cabo la detección del fragmento amplificado por electroforesis en gel de agarosa al 1%. En la cuarta etapa se purificó el producto de PCR (QIAquick PCR purification kit, QIAGEN, Valencia, CA). Por último, se realizó la secuenciación de las proteínas accesorias (*Vif/Vpr/Vpu*) por el método de Sanger terminador fluorescente utilizando el Kit Big Dye® Terminator v.3.1 Cycle Sequencing (Life Technologies, Carlsbad, CA).

Etapas 1. Extracción de RNA viral.

La extracción de RNA viral a partir del plasma humano, requiere de los siguientes pasos: la muestra de plasma debe centrifugarse durante un periodo de 2 horas a 17000 rpm a una temperatura de 4°C con el propósito de concentrar las partículas virales en un pellet. Después de eliminar el sobrenadante, las partículas virales son lisadas para liberar el RNA viral con un buffer de lisis que tiene como función solubilizar los componentes e inactivar las RNAasas para evitar su degradación. En seguida, el RNA viral se une a una columna de sílice. Posteriormente es necesario realizar una serie de lavados con la finalidad de eliminar contaminantes celulares además de proteínas. Por último es importante eluir el RNA viral con un buffer de baja fuerza iónica para su utilización y almacenamiento.

Etapas 2. Amplificación de la secuencia de proteínas accesorias/reguladoras.

El proceso de amplificación del fragmento de aproximadamente 1.65 Kpb, se llevo a cabo en dos etapas mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR) anidada.

Primera Vuelta.

En la primera amplificación se llevó a cabo una transcripción inversa mediante una RT-PCR. Los primers utilizados fueron: Vif 4888F (forward) y VPU R (reverse).

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un ciclo de 50° C por 3 min, un ciclo de 94° C por 2 min, seguida de 35 ciclos de 94° C por 15 s, 58° C por 30 s y 72° C por 90 s y un ciclo de 72° C por 5 min. **(Figura 5.1).**

Primers.

Vif 4888F (forward)	5'- TTCAAATTTTCGGGTTTATTACAG – 3'	4888-4912
VPU-R (reverse)	5' – AGGTACCCCATAGACTGTGA – 3'	6353-6331

Mezcla de PCR.

Mix de PCR		Conc. Final
dH ₂ O	6.0 µL	—
Buffer 2x	12.5 µL	1x
PF Vif4888F (20 uM)	0.5 µL	0.4 umol/ µl
PR VPU-R (20 uM)	0.5 µL	0.4 umol/ µl
Invitrogen SS One-Step RT – PCR	0.5 µL	—
RNA viral	5 µL	—
Volumen Final	25 µL	—

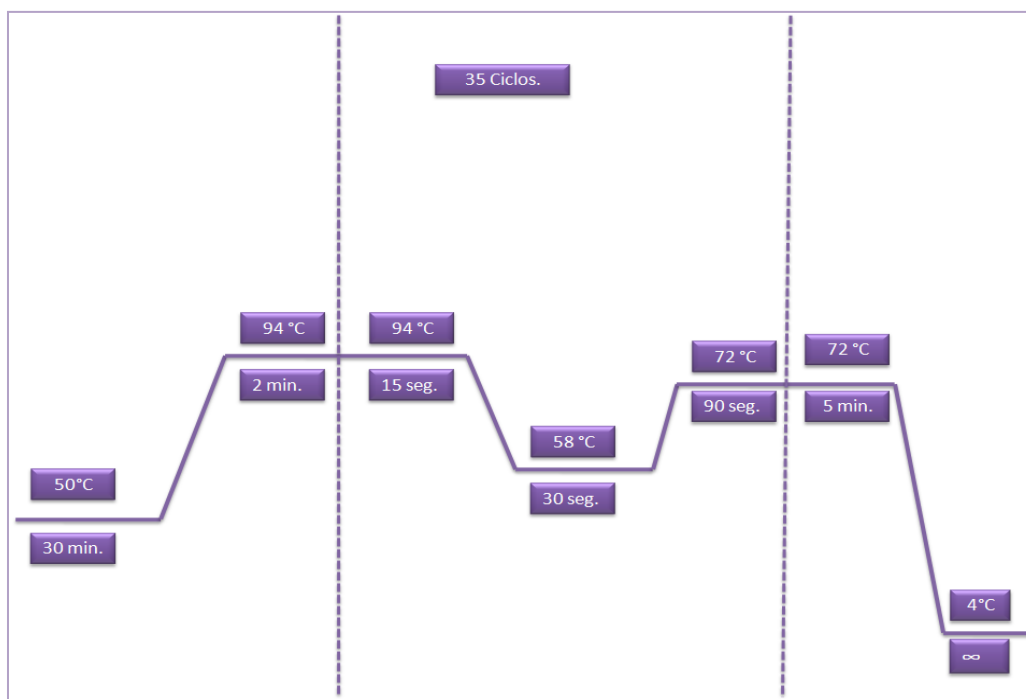


Figura 5.1. Condiciones de tiempo y temperatura para la primera vuelta de PCR.

Segunda Vuelta.

Para la segunda amplificación los primers utilizados fueron: Vif4952F (forward) y VVd (reverse).

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un ciclo de 50° C por 3 min, un ciclo de 94° C por 2 min, seguida de 35 ciclos de 94° C por 30 s, 55° C por 30 s y 72° C por 90 s y un ciclo de 72° C por 5 min. **(Figura. 5.2).**

Primers.

Vif4952F (forward)	5' – CTCTGGAAAGGTGAAGGGGCAGT – 3'	4953-4975
VVd (reverse)	5'- CCATAATAGACTGTGACCCACAA – 3'	6346-6324

Mezcla de PCR.

Mix de PCR		Concentración final.
dH ₂ O	13.75 µL	—
Buffer 10x	2.5 µL	1
MgCl ₂	1 µL	2.0
dNTP's	4 µL	1.6
PF Vif4952F (20 uM)	0.5 µL	0.4 umol/ µl
PR VVd (20 uM)	0.5 µL	0.4 umol/ µl
Platinum Taq		
DNA polimerasa (5 U/µL)	0.25 µL	1.25U
DNA (1 ^{ra} vuelta)	2.5 µL	—
Volumen Final	25 µL	—

Programa para el termociclador.

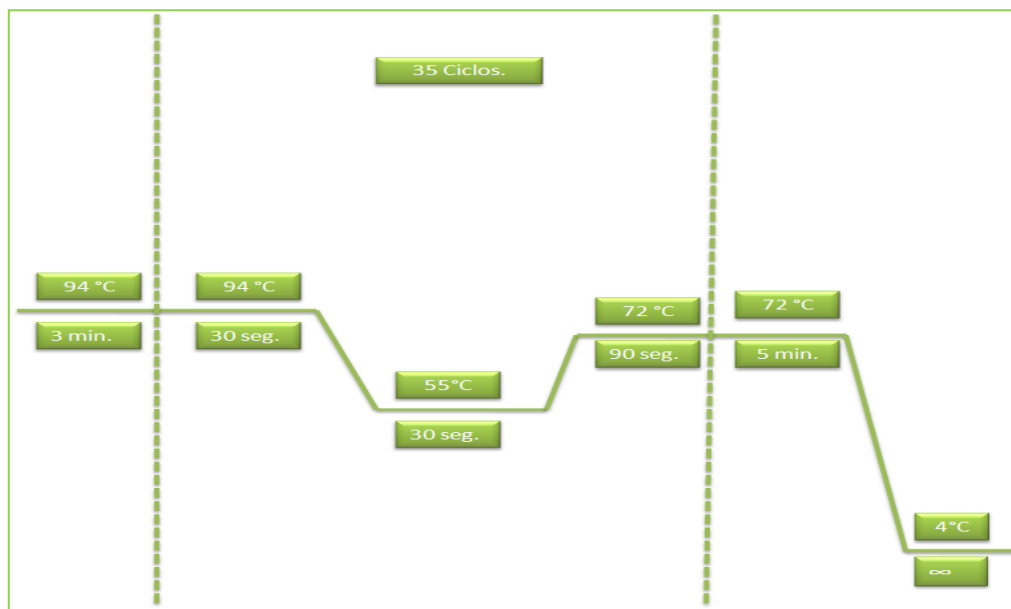


Figura 5.2. Condiciones de tiempo y temperatura para la segunda vuelta de PCR.

Etapa 3. Visualización del producto de PCR.

La detección del fragmento amplificado de 1650 pb, se llevó cabo por electroforesis en gel de agarosa al 1% (**Figura 5.3**); en donde la migración de las partículas o moléculas cargadas ocurre cuando se establece un campo eléctrico. Se visualizó mediante tinción con bromuro de etidio, un colorante que se une a la doble cadena de ADN intercalándose entre las pares de bases y emite luz fluorescente cuando se irradia en la parte UV del espectro.

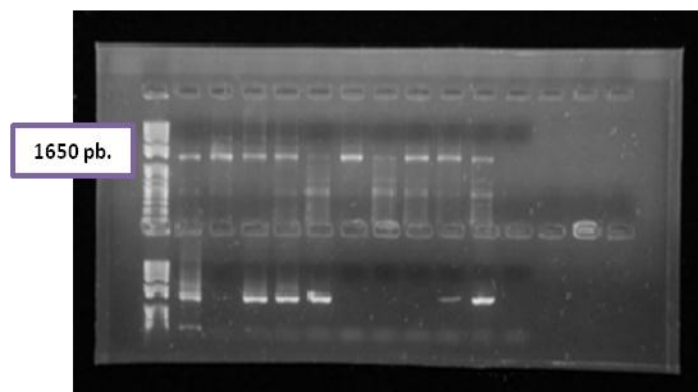


Figura 5.3. Detección del fragmento amplificado en gel de agarosa al 1%.

Etapla 4. Purificación del producto de PCR.

Los productos de PCR fueron purificados con el objeto de eliminar subproductos, primers y dNTPs contaminantes. Para ello se utilizó el kit (QIAquick PCR purification kit, QIAGEN, Valencia, CA) que brevemente implica la unión del producto de PCR a una columna de sílice, un lavado para eliminar contaminantes y elución del producto de PCR purificado con un buffer de baja fuerza iónica.

Etapla 5. Reacción de secuenciencia.

Para la reacción de secuenciación se trabajó con los amplicones purificados anteriormente, el Kit *Big Dye® Terminator v.3.1 Cycle Sequencing* (Life Technologies, Carlsbad, CA), y ocho primers (Vif4952F (Fw), 4eFx (Fw), 4eRx (Rv), SCO4R (Rv), SCO2F (Fw), 5cRx (Rv), VVd (Rv)) con el objetivo de asegurar de que se cubriera toda la región sometida a análisis.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un ciclo de 96° C por 1 minuto (desnaturalización), seguida de 25 ciclos de 96°C por 10 s, 50°C por 5 s y 60° C por 4 minutos (alineación) y un ciclo de 4°C por ∞ (extensión final). **(Figura 5.4.).**

Mezcla para reacción de secuencia (por pozo).

Mix		
Reactivo	1x	Concentración. Final.
dH ₂ O	2 µL	--
Sequencing Buffer 5x	2 µL	4x
Big Dye v3.1	2 µL	--
Primer (2 uM)	2 µL	0.4 umol/ µl
DNA	2 µL	10 a 40 ng
Volumen Final	10 µL	--

Primers.

Vif4952F (Fw)	CTCTGGAAAGGTGAAGGGGCAGT	4953-4975
4eFx (Fw)	CTGCATACAGGAGAAAGAGACTGG	5254-5277
4eRx (Rv)	TTGGTCTTCTGGGGCTTGTTCC	5582-5561
5cFx-2 (Fw)	GATACTTGGGCAGGAGTGGAAGC	5712-5734
SCO4R (Rv)	TAGGCTGACTTCCTGGATGCTTC	5885-5863
SCO2F (Fw)	AGICTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAA	5952-5979
5cRx (Rv)	CACTCTCATTGCCACTGTCTTCTGC	6233-6209
VVd (Rv)	CCATAATAGACTGTGACCCACAA	6346-6324

Programa para el termociclador.

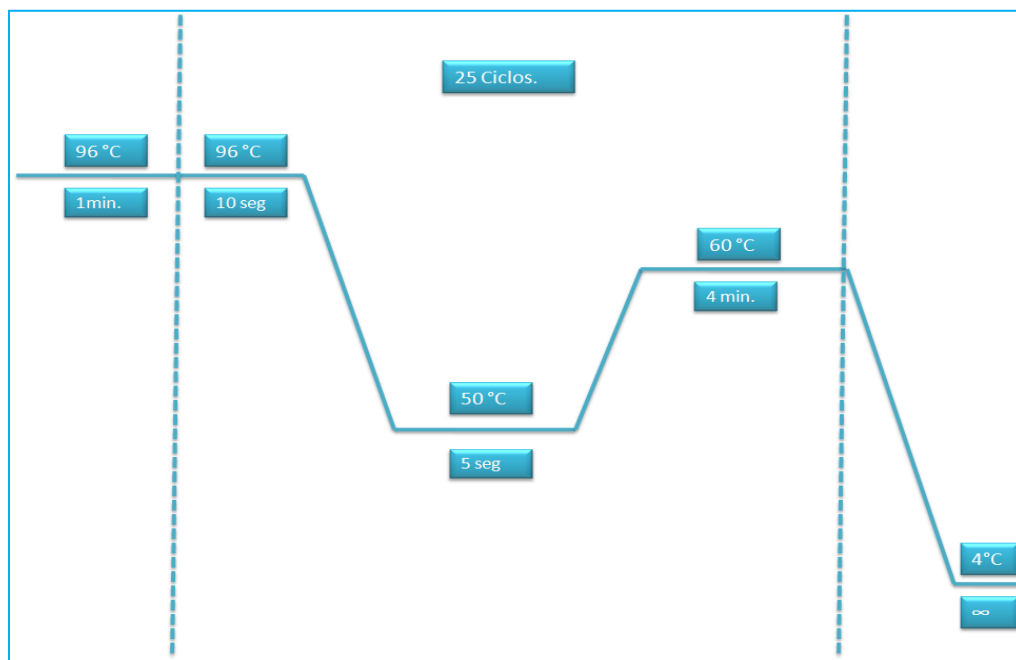


Figura 5.4. Condiciones de tiempo y temperatura para la reacción de secuencia.

5.1. Purificación de la reacción de secuencia.

La purificación de la reacción de secuencia tiene como objetivo eliminar los reactivos sobrantes de la reacción como por ejemplo ddNTPs y otras moléculas que pudieran interferir en la lectura del secuenciador.

Se utilizó el procedimiento de precipitación con etanol/acetato de sodio. Brevemente, se colocaron 1 μL de acetato de sodio 3M a pH=5.2 y 50 μL de etanol al 100% por reacción, y se centrifugó a 2000rpm por 20 minutos; posteriormente se eliminó el sobrenadante y se añadieron 150 μL de etanol al 70%; se centrifugó a 2000 rpm por 5 minutos, retirando el exceso de etanol. Finalmente se resuspendió en 20 μL de formamida de alta pureza, con la finalidad de evitar la formación de estructuras secundarias y permitir la separación de los fragmentos de acuerdo a su tamaño (**Figura 5.5**).

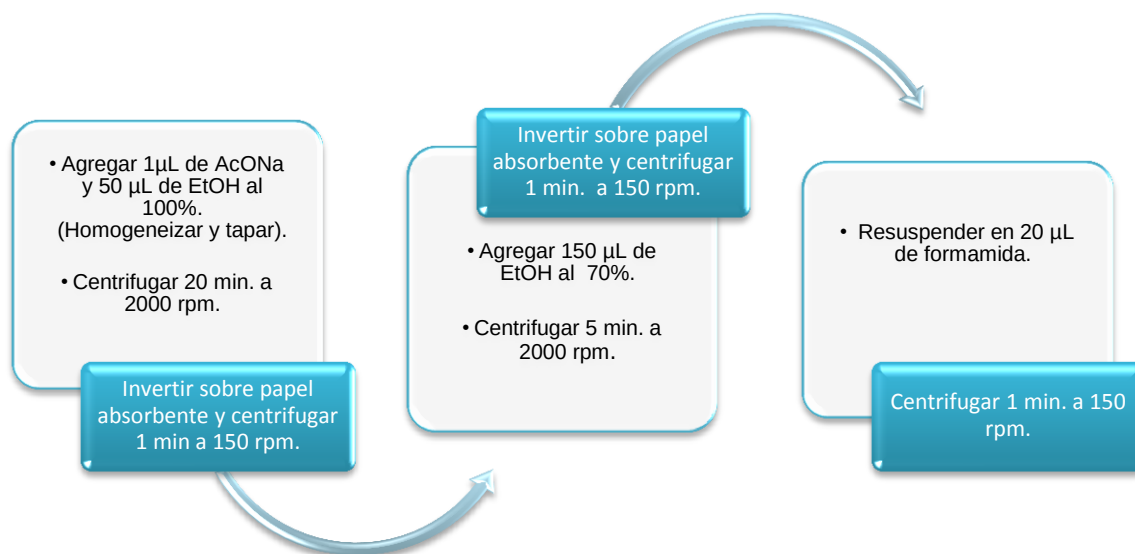


Figura 5.5. Metodología a seguir para la purificación de la rx. de secuenciación.

5.2 Secuenciación.

La región de proteínas accesorias / reguladoras se secuenció en un secuenciador capilar ABI Prism 3730xl Genetic Analyzer (Life Technologies, Carlsbad, CA) por el método de Sanger. Este método consiste en la incorporación de didesoxirribonucleótidos trifosfato (ddNTP) marcados fluorescentemente a una cadena de ADN durante el proceso de copiado de la misma. Los ddNTPs no poseen un grupo 3'-OH necesario para la formación del enlace fosfodiéster que permite la unión entre nucleótidos, por lo tanto se interrumpe la elongación de la cadena cada vez que uno de estos es incorporado en ella. De este modo se generan secuencias de diferentes tamaños.

El equipo de secuenciación cuenta con un dispositivo que permite captar la emisión de luz de los cuatro didesoxinucleótidos. Cada uno de los cuatro ddNTPs está marcado con un fluorocromo distinto. La lectura se hace entonces partiendo de las secuencias más cortas hasta la secuencia completa, y se genera un gráfico con picos de emisión de luz en la posición de cada uno de los nucleótidos de la secuencia de interés.

La corrida de las muestras en el secuenciador se llevó a cabo en tres pasos:

1. **Preparación de las muestras.** Una vez resuspendida las muestras en formamida, se verificó que no quedarán burbujas en los pozos pues introducen aire a los capilares, ni tampoco gotas en la paredes ya que pueden generar puentes eléctricos ocasionando cortos en el equipo.
2. **Preparación del archivo con las condiciones de corrida de la placa.** Este paso consistió en nombrar a cada una de las muestras, ubicarla dentro de la placa de secuenciación y seleccionar parámetros como: tiempo de inyección, velocidad y versión de la corrida.
3. **Montaje de las muestras en el equipo.** Verificando el nivel de polímero, buffer y agua de los compartimentos del equipo destinados para ello antes de empezar a secuenciar.

Ensamble y Alineamiento de las secuencias.

Las secuencias obtenidas se ensamblaron con el programa Geneious Basic 5.3.4, obteniendo una secuencia consenso por cada paciente participante. Las secuencias fueron posteriormente alineadas con el software Clustal W y los alineamientos fueron editados manualmente en el software Mega 5.0.

Detección de Polimorfismos.

Previo al análisis, se procedió a realizar la evaluación de control de calidad de todas las secuencias con el fin de descartar alguna contaminación durante la edición, presencia de ambigüedades, codones de paro o contaminación cruzada entre las muestras; por lo que fue posible detectar aquellos cambios sinónimos y no sinónimos ocurridos en las secuencias.

Entropía de Shannon.

La variabilidad de las secuencias se calculó estimando la entropía de Shannon para cada una de las posiciones del alineamiento, utilizando la herramienta de la base de Datos de VIH de los Alamos llamada Entropy (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/ENTROPY/entropy/entropy.html>) en su versión Entropy One como estrategia para cuantificar la variabilidad de las secuencias en el alineamiento y Entropy Two para realizar comparaciones de entropía nucleótido a nucleótido entre dos sets de secuencias con una estimación de apoyo estadístico de 1000 aleatorizaciones con reemplazo, tomando en cuenta la frecuencia (e.g. una posición con 50% A y 50% T tiene una mayor entropía de Shannon que una posición con 90% A y 10% T) y el número de posibilidades (e.g. una posición con 90% A, 5% T y 5% G tiene una mayor entropía de Shannon que una posición con 90% A y 10% T). La entropía de Shannon es una medida simple de insertidumbre en un conjunto de datos. Aplicado a secuencias, la entropía de Shannon podría considerarse como la habilidad de predecir qué aminoácido se encontraría en cada posición de la secuencia, basándose en un muestreo previo.

Análisis Filogenético.

Se construyó un árbol filogenético para las secuencias generadas del estudio, a partir de un fragmento de de 1650 pb que abarca la región de proteínas accesorias/reguladoras (vif, vpr, vpu, incluyendo el exón 1 de tat y rev) del VIH, con el software PHYLIP, usando el método de máxima verosimilitud (MV). Este método emplea modelos probabilísticos para seleccionar el mejor árbol, es decir; aquél que tenga la más alta probabilidad (verosimilitud) de reflejar el proceso evolutivo real. MV es un método exhaustivo que busca todas las posibles topologías y considera cada posición en un alineamiento (no sólo sitios informativos). La significancia del árbol se probó mediante mil réplicas de bootstrap.

Análisis de Presión Selectiva.

Mediante razones de sustituciones sinónimas / no sinónimas, se ubicaron posiciones bajo presión selectiva en Vif, Vpr y Vpu utilizando el programa en línea Data Monkey (www.datamonkey.org), utilizando el análisis SLAC (Single Likelihood Ancestor Counting), con la finalidad de detectar los posibles polimorfismos en las secuencias con una mayor tasa de sustituciones no sinónimas.

Posteriormente, se hizo un estudio de búsqueda de epítomos de CTLs sobrelapados con las posiciones con evidencia de encontrarse bajo presión selectiva positiva. Para esto se utilizó la Base de Datos de los Álamos (<http://www.hiv.lanl.gov>) en donde se encuentran mapas de los epítomos presentados por CTLs conocidos y comprobados experimentalmente para el VIH, así como los alelos HLA que restringen el reconocimiento.

Análisis de Mutaciones Asociadas a APOBEC3G y 3F.

Este análisis fue realizado a través de la herramienta *Hypermut* de la Base de Datos de los Álamos, con la finalidad de detectar la frecuencia de mutaciones G -> A que podrían atribuirse a APOBEC3G y 3F. Esta herramienta detectaría posibles fallas en la función de Vif, que en casos extremos podrían observarse como hipermutación de las secuencias virales, lo que conlleva a cambios deletéreos y a posibles codones de paro que pueden dañar irreversiblemente al virus impidiendo así su replicación.

Para determinar si una secuencia específica está hipermutada la herramienta usa **test exacto de Fisher**, considerando que hay hipermutación significativa cuando el valor de $p < 0.05$ comparando el número de cambios G -> A en el total de contextos APOBEC3 versus cambios G -> A en el total de contextos control, usando como referencia la secuencia del subtipo apropiado.

6. Resultados

6.1. Características de la cohorte en estudio.

Se reunió una cohorte de 200 individuos infectados con VIH y vírgenes a tratamiento antirretroviral de diferentes entidades federativas del país (**Figura 6.1**) para el estudio de polimorfismos y presión selectiva inmune en la secuencia de proteínas accesorias/reguladoras del VIH circulante en México. Estos pacientes se seleccionaron retrospectivamente de la cohorte de Epidemiología Molecular y Evolución del VIH en México del Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIENI) del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER). Todos los individuos participantes dieron consentimiento escrito y el protocolo fue revisado y aprobado por el Comité de Ciencia y Bioética en Investigación del INER.

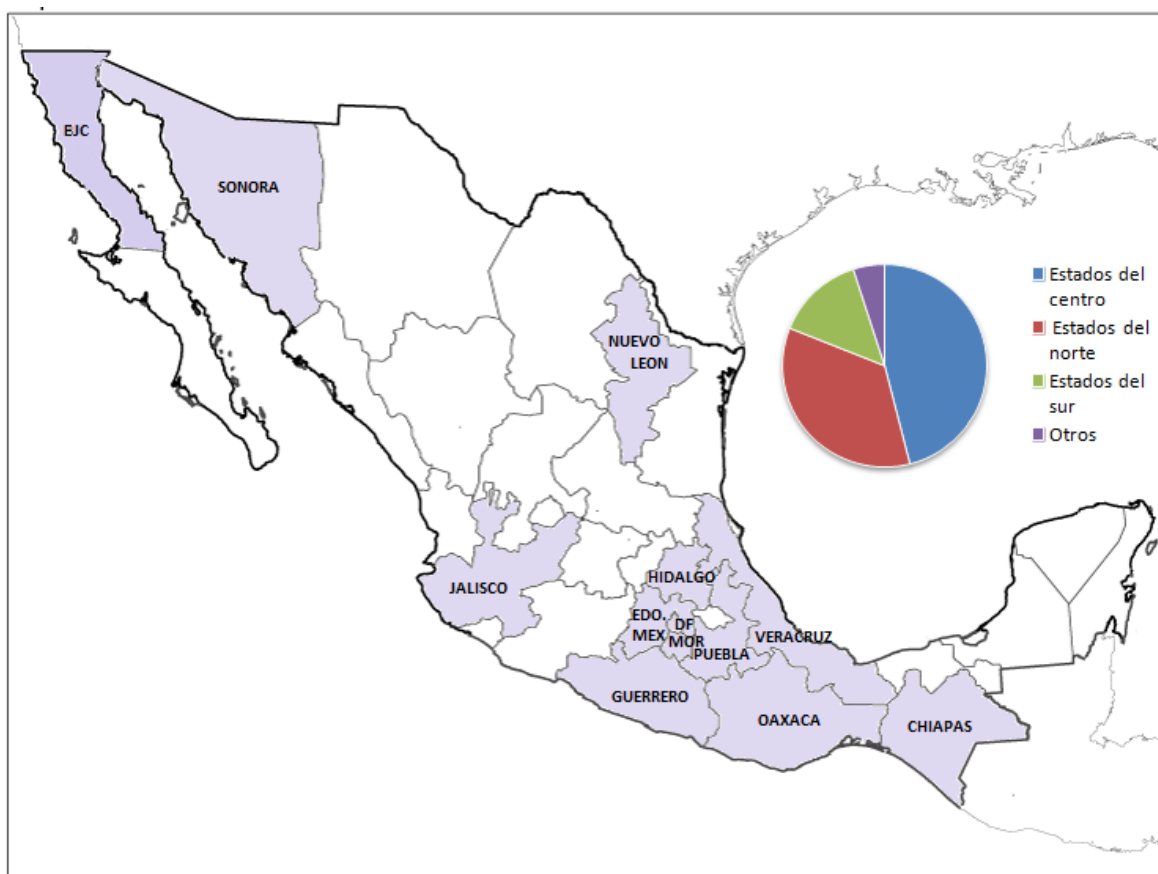


Figura 6.1. Distribución Geográfica de la cohorte en estudio. En el mapa se muestran los estados que participaron en el estudio. La gráfica de pastel muestra las proporciones de individuos por región geográfica.

Del total de pacientes, 47 (23.5%) fueron del sexo femenino y 153 (76.5%) del sexo masculino, el intervalo de edad fue de 17 a 58 años, con un promedio de 27 años. Estas características reflejan el predominio característico de pacientes del sexo masculino y de personas jóvenes en la población infectada por VIH de nuestro país.

La cohorte de estudio presentó un promedio de conteo de linfocitos T CD4+ de 397 células/ μ L y una mediana de 451 células/ μ L. La carga viral promedio fue de 151,568 copias/mL de sangre con una mediana de 78,741 copias/mL de sangre **(Tabla 6.1)**. Alrededor del 33.5% del total de los individuos de la cohorte en estudio se encontraban en etapa tardía de la infección; es decir con una cuenta de linfocitos TCD4+ $\leq$ 200 células/ μ L. Un 42.5% de los individuos reclutados presentaron infecciones tempranas (conteo de linfocitos CD4+ $\geq$ 500 células/ μ L). Estas características sugieren la selección de una población de estudio con diagnóstico relativamente temprano. Sin embargo, es sabido que en países latinoamericanos, incluyendo México predomina el diagnóstico tardío de la infección por VIH.

Tabla 6.1. Descripción Estadística de la cohorte en estudio.

Parámetro Clínico	Promedio	Mediana	Desviación Estándar.
CD4 (células/μL de sangre)	397	451	238
CV (copias RNA de VIH/mL)	151568	78741	256497
Género (%)	Masculino 153 (76.5%)		Femenino 47 (23.5%)
Edad (Promedio)	27 años		

6.2. Estudio filogenético de la secuencia de proteínas accesorias/reguladoras del VIH circulante en México.

Con la finalidad de estudiar la diversidad y posiblemente la historia epidemiológica de las secuencias virales de la cohorte en estudio, se construyó un árbol filogenético para las secuencias generadas a partir de un fragmento de 1650 pb que abarca la región de proteínas accesorias/reguladoras (*vif*, *vpr*, *vpu*, incluyendo el exón 1 de *tat* y *rev*) del VIH, con el software PHYLIP, usando el método de máxima verosimilitud (MV). La significancia del árbol se probó mediante mil réplicas de bootstrap (**Figura 6.2**).

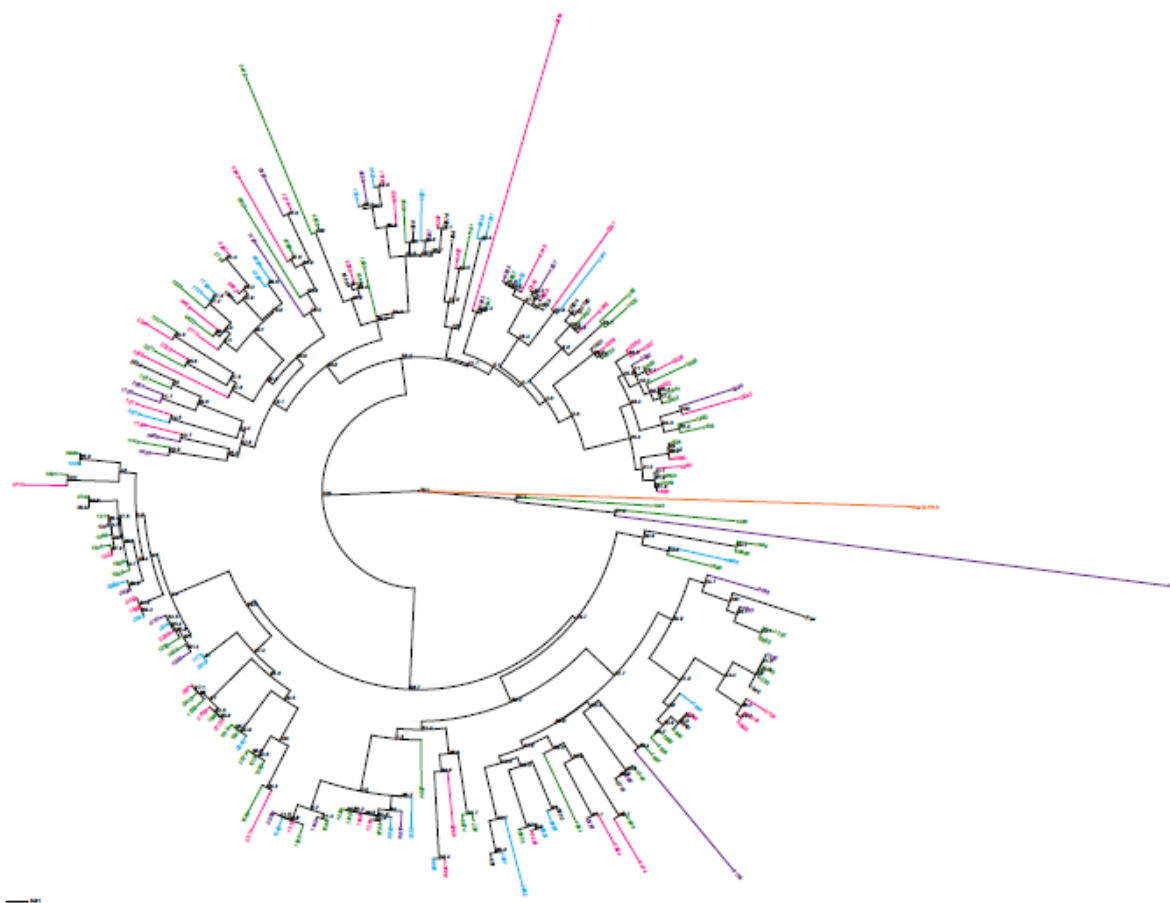


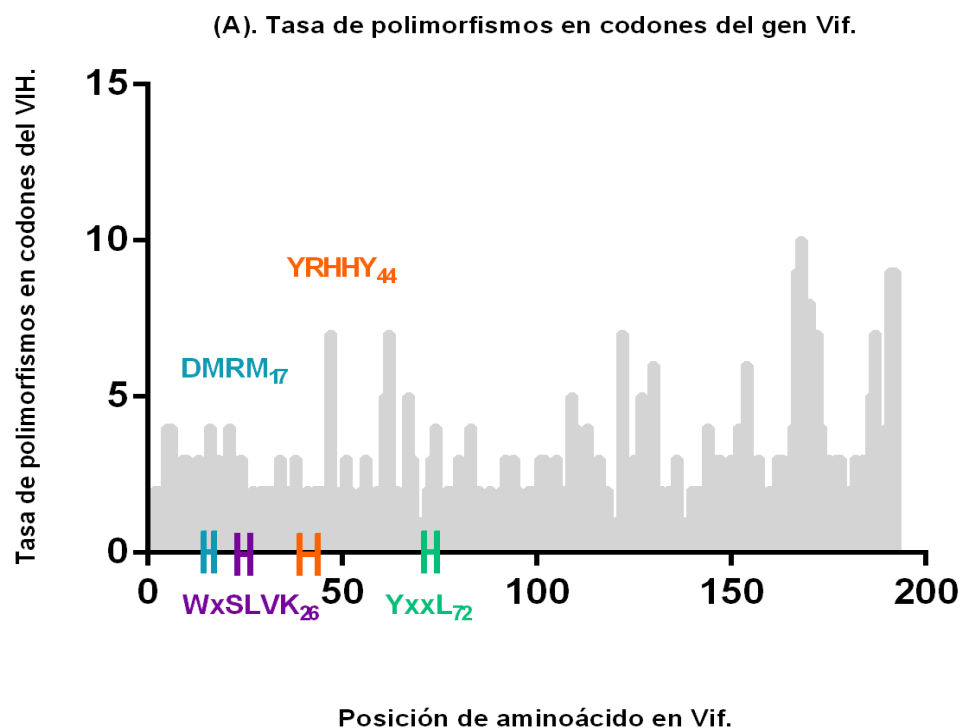
Figura 6.2. Árbol Filogenético para 200 secuencias del fragmento que incluye a las proteínas accesorias/reguladoras de los individuos que integran la cohorte en estudio. La historia de evolución fue inferida utilizando el método de Máxima-Verosimilitud a través del programa Phylip. En color naranja se muestra la secuencia de referencia tomada de la base de datos de los Álamos (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/mainpage.html>), las secuencias de los pacientes del centro en verde, en azul las secuencias de los pacientes del norte, en rosa las secuencias de los pacientes del sur y en morado las secuencias de los pacientes del este y oeste.

Se observó diversificación importante entre las secuencias analizadas, provenientes de todas las regiones geográficas. Sin embargo, no se observaron patrones específicos de agrupamiento entre las secuencias de la región de proteínas accesorias/reguladoras de VIH circulante en México. Secuencias de distintas áreas geográficas tendieron a entremezclarse en el árbol sin mostrar agrupamientos geográficos evidentes **(Figura 6.2)**. Sin embargo, al observar los agrupamientos característicos del árbol construido, se pudo observar una mayor similitud entre secuencias de virus del centro y del sur, que presentaron agrupaciones frecuentes en el árbol.

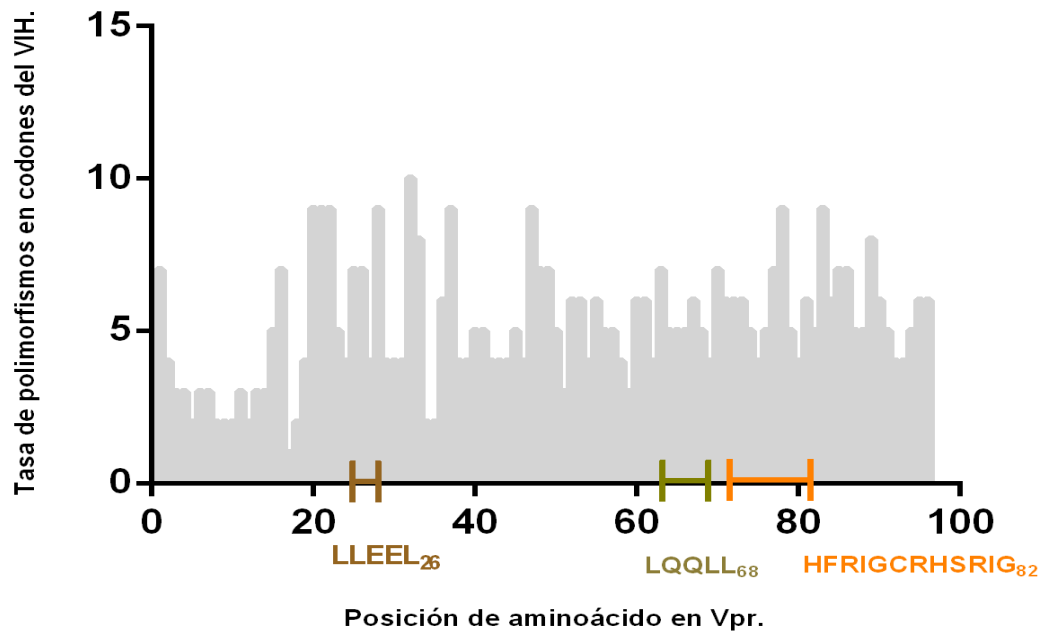
6.3. Análisis de variabilidad de las proteínas accesorias/reguladoras.

Se analizó la variabilidad de los genes *vif*, *vpr*, *vpu*, y exón 1 de *tat* y *rev*, examinando en primer lugar el grado de polimorfismo de cada una de las proteínas (**Figura 6.3**), observando especialmente el grado de variabilidad en la regiones funcionalmente importantes para cada proteína.

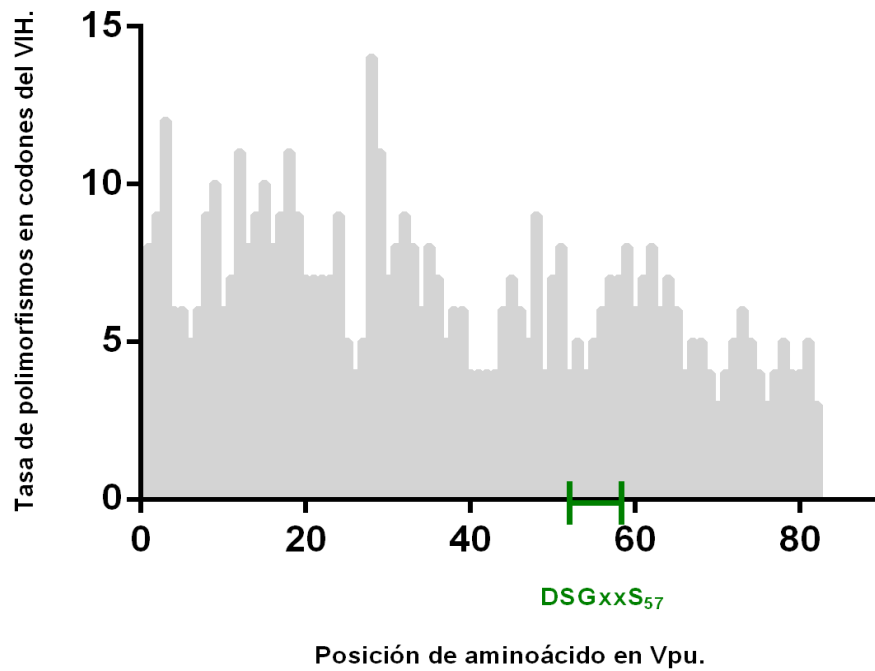
En este estudio, la variación observada se examinó a partir del alineamiento global de 200 secuencias, el cual se utilizó para analizar la distribución de polimorfismos en base a una secuencia consenso (HXB2). De este análisis, se desprendieron los siguientes resultados: Vif resultó ser la proteína menos polimórfica, en comparación con Vpr. Interesantemente la proteína Vpu y las proteínas reguladoras Tat y Rev, mostraron un alto grado de polimorfismo.



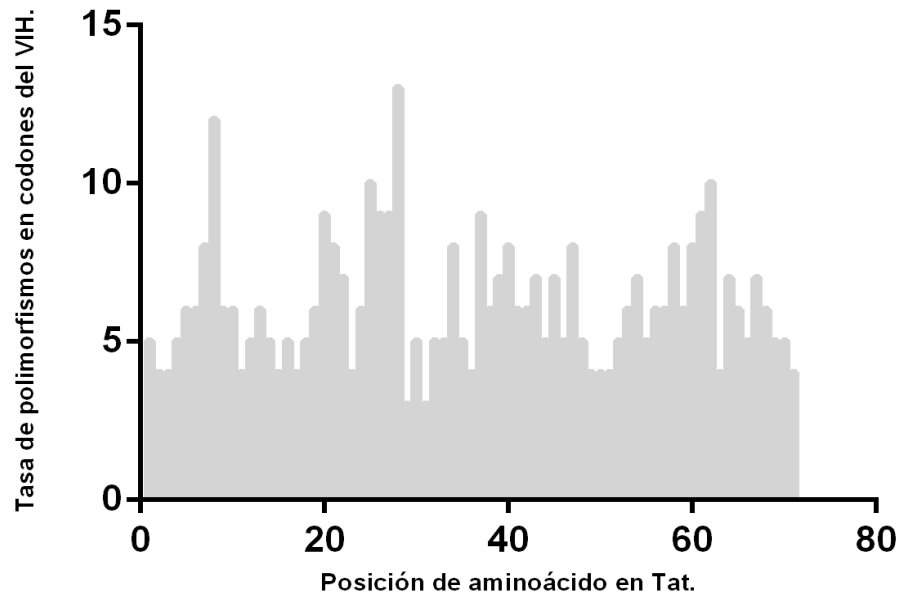
(B). Tasa de polimorfismos en codones del gen Vpr.



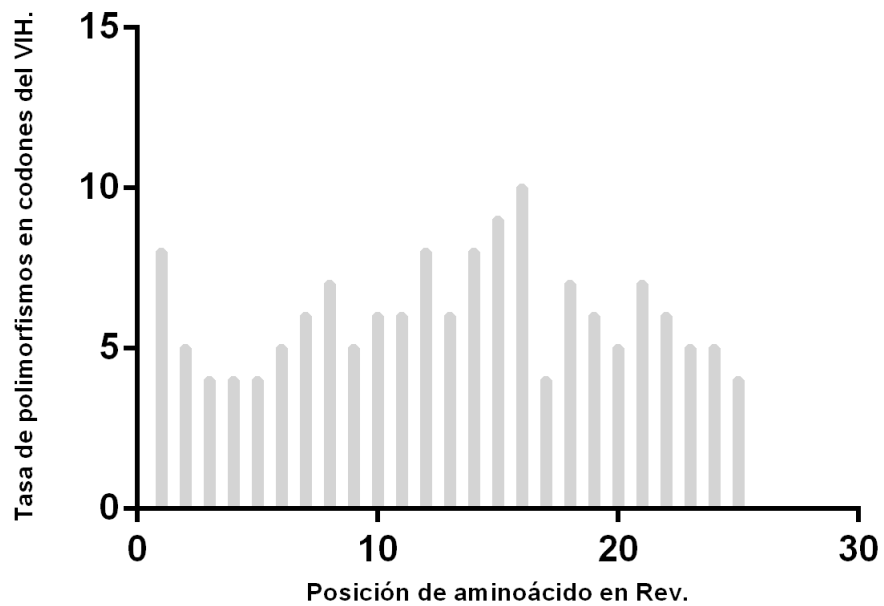
(C). Tasa de polimorfismos en codones del gen Vpu.



(D). Tasa de polimorfismos en codones del exón I del gen Tat.



(E). Tasa de polimorfismos en codones del exón I del gen Rev.



6.3. Grado de polimorfismo en la región de proteínas accesorias/reguladoras del VIH circulante en México. Se muestra la frecuencia de polimorfismo para cada posición de aminoácido, a partir de 200 secuencias del gen *vif* (A), *vpr* (B), *vpu* (C), exón I del gen *tat* (D) y exón I del gen *rev* (E) obtenidas a partir de virus libre en plasma; resaltando con diversos colores los dominios analizados funcionalmente importantes.

Vif.

Tras la amplificación del fragmento, se alinearon las secuencias de nucleótidos y se tradujeron a aminoácidos con el fin de estudiar la variabilidad de la proteína en regiones funcionalmente importantes para Vif que previamente han sido reportadas en la literatura (**Figura 6.3a**). En el caso del gen *vif*, se observó que ningún paciente presentó inserciones o deleciones en su secuencia.

Entre los dominios importantes para la funcionalidad de Vif se estudiaron:

- Los residuos de triptófano en las posiciones 5, 11, 21, 38, 79 y 89, fundamentales para la supresión selectiva por APOBEC3G y APOBEC3F.
- El dominio **DRMR₁₇** que determina la especificidad de Vif hacia diferentes proteínas A3G celulares por unión directa.
- El dominio **WxSLVK₂₆** que representa un motivo funcional que juega un papel crítico en regular la actividad neutralizante contra A3G y A3F.
- Las regiones **YRHHY₄₄** y **YxxL₇₂**, los cuales se han identificado por su papel en la unión específica directa con A3G y A3F.
- Los aminoácidos E88, C 114 y C133, importantes para la infectividad en estudios *in vitro*.
- El motivo constante **SLQYLA₁₄₉**, donde determinadas mutaciones impiden el bloqueo y degradación de la proteína APOBEC3G inducido por Vif.

En el análisis realizado, la mayoría de los motivos resultaron ser zonas conservadas en el 62% de los pacientes. Sin embargo, se identificaron cambios en los motivos DRMR₁₇ y YxxL₇₂ por aminoácidos de la misma carga química en el

15% de la población en estudio, por lo que probablemente la funcionalidad de la proteína no es afectada.

Esto pudo corroborarse al comparar la carga viral de los individuos que tenían esta mutación (12363 copias de RNA de VIH/mL) contra individuos que no presentaban esta mutación (99589 copias de RNA de VIH/mL); por lo que logró establecer una diferencia significativa entre ambos grupos (**Figura 6.4**).

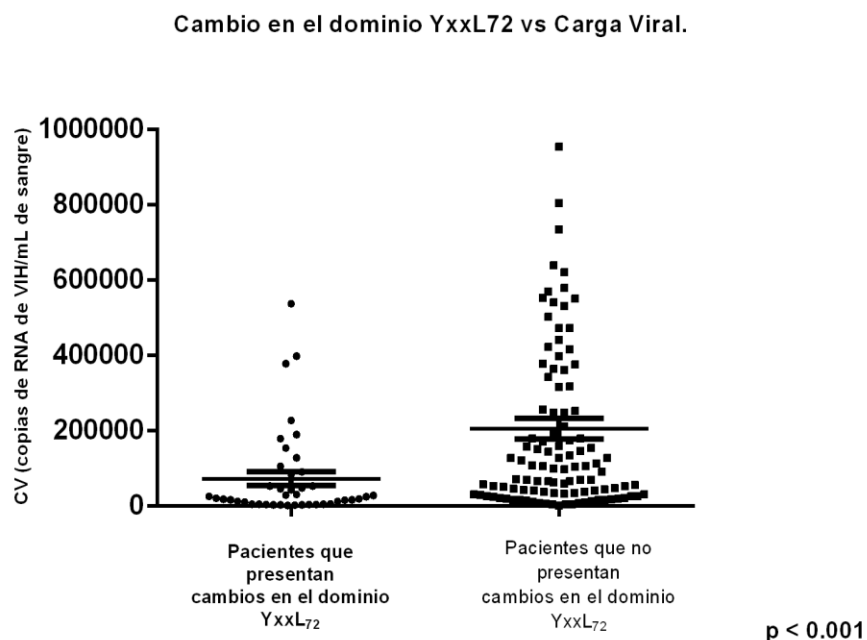


Figura 6.4. Cambios en el dominio YxxL₇₂ con respecto a la carga viral. La gráfica muestra la diferencia de carga viral cuando existe variación en el dominio YxxL₇₂ comparado con un control (pacientes que no presentan cambios en el dominio YxxL₇₂).

Adicionalmente, se evaluó si las diferencias en el nivel de edición por APOBEC3G y APOBEC3F (cambios de G=>A) se hallaban asociados con diferencias en la variabilidad de Vif a partir de las 200 secuencias de Vif de la cohorte mexicana en estudio, utilizando la herramienta Hypermut de la Base de Datos de los Álamos. Está bien descrita la actividad de APOBEC3G como un factor antirretroviral celular que provoca hipermutación en las secuencias virales, cuya actividad es neutralizada por la acción de Vif. Sin embargo, se ha sugerido la posibilidad de

que una actividad parcial de Vif, pudiera funcionar como una ventaja evolutiva del virus al favorecer la variación del VIH sin llegar a niveles de mutación letales. Interesantemente, las secuencias estudiadas de la proteína Vif con mayor número de cambios atribuidos a APOBEC (**Figura 6.5**), tienden a producir una menor carga viral (54581 copias de RNA de VIH/mL) con lo que respecta a la mediana (78741 copias RNA de VIH/mL), lo que podría sugerirnos que la proteína podría ser no funcional y verse afectada la capacidad replicativa del virus (**Figura 6.6**).

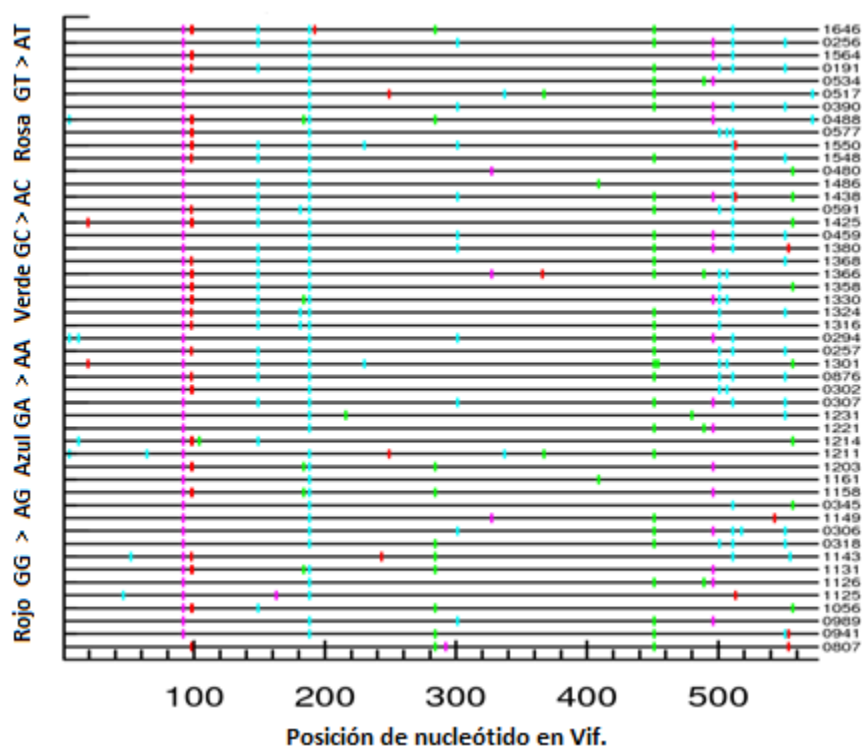


Figura 6.5. Se muestra el nivel de edición de APOBEC 3G y APOBEC 3F en secuencias de Vif. La proteína APOBEC 3G deamina preferentemente la segunda C en un dinucleótido CC (se subraya la base afectada), lo cual se manifiesta como un cambio GG → AG sobre la hebra positiva del virus. Por otra parte, APOBEC3F actúa editando el dinucleótido TC, apreciándose entonces una mutación GA → AA en la segunda codificante. En rojo se muestran los cambios de GG > AG, en azul los cambios de GA > AA, en verde los cambios de GC > AC y en rosa los cambios de GT > AT.

**Cambio de G=>A inducidos por APOBEC en la proteína
Vif vs Carga Viral.**

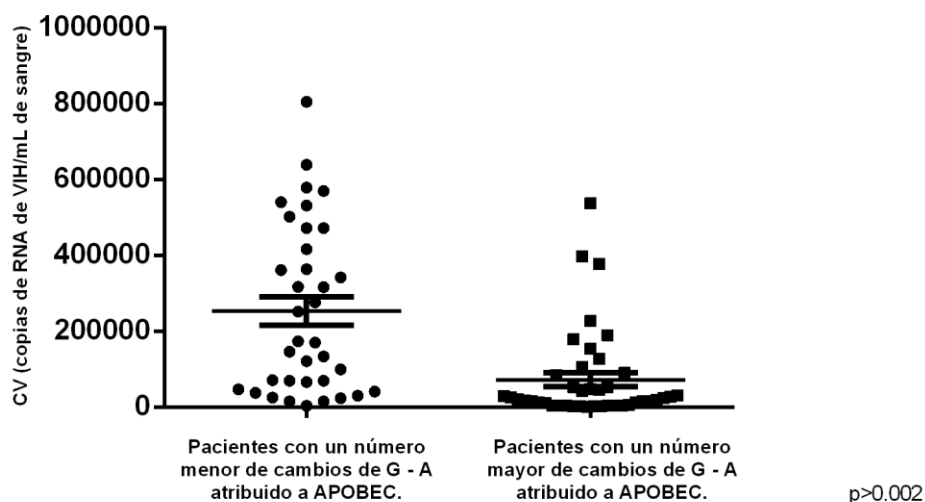


Figura 6.6. Cambios de G=>A inducidos por la proteína APOBEC en la proteína Vif vs Carga Viral. En la gráfica se muestra como se ve afectada la carga viral, cuando la proteína APOBEC induce un mayor número de cambios deletéreos con respecto a un control (proteína Vif).

Vpr.

De acuerdo al alineamiento de los aminoácidos, se observó un alto grado de polimorfismos en las zonas N – terminal de la proteína y α – hélice de la proteína. Consecutivamente se examinaron aquellas zonas reportadas con influencia en la funcionalidad de la proteína (**Figura 6.3b**).

Los dominios en estudio fueron los siguientes:

- LLEEL₂₆ ubicado en la zona α – hélice de la proteína e importante para la incorporación de Vpr a las nuevas partículas virales.
- LQQLL₆₈ cuya función es controlar la localización nuclear de Vpr.

- El dominio C-terminal HFRIGCRHSRIG₈₂, involucrado directamente con la detención del ciclo celular. Dentro de este dominio, se estudió además la posible aparición de mutaciones puntuales entre las que destacan: F72L (responsable de un menor transporte nuclear de Vpr) y R77Q (mutación que genera que la proteína Vpr induzca un menor nivel de apoptosis).

Se observaron cambios puntuales en el dominio HFRIGCRHSRIG₈₂, que suponen una variación en la carga química en el 2.5% (n=5) de la población. En región variable que corresponde con el nucleótido 77, la frecuencia de la mutación puntual R77Q fue de 0.5%. En lo que respecta al nucleótido 72 se observaron cambios puntuales que pudiesen asociarse a funcionalidad alterada de la proteína, pues la carga viral en los individuos que presentan estos cambios (3520 copias RNA de VIH/mL) se ve afectada con respecto a la mediana (78741 copias RNA de VIH/mL) (**Figura 6.7**).

Por otra parte, el 4% de la población en estudio mostró delecciones puntuales de un solo aminoácido en alguna de las regiones importantes, descritas anteriormente.

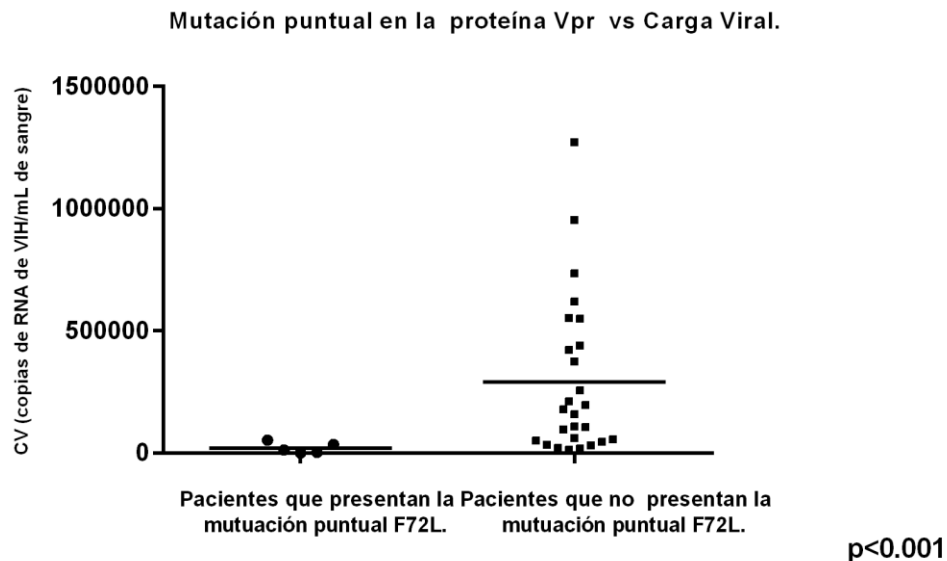


Figura 6.7. Mutación puntual en la proteína Vpr vs Carga Viral. En la gráfica se muestra como se ve afectada la carga viral cuando existe un cambio puntual en el residuo 72 (F => L) con respecto al control (secuencias que no presentan la mutación puntual).

Vpu.

En el caso de la proteína Vpu, se observaron algunas inserciones de 2 a 3 aminoácidos en un 18% del total de secuencias analizadas.

Como sitio funcional importante se analizó el dominio DSGxxS₅₇, el cual interacciona con BST-2 para formar un complejo ubiquitina ligasa que permite la degradación de el factor antirretroviral celular. Mutaciones en este dominio pueden impedir la salida de viriones de la célula infectada (**Figura 6.3c**).

El 60% de los pacientes en estudio, mostró algunas variaciones en el dominio DSGxxS₅₇ que generan cambios en la carga química, lo que pudiese afectar la unión de BST-2. Sin embargo, sólo en una pequeña porción de los individuos que presentaban este tipo de cambios mostraban variaciones en la carga viral (164633 copias de RNA de VIH/MI) respecto a la mediana (78741 copias RNA de VIH/mL) (**Figura 6.8**).

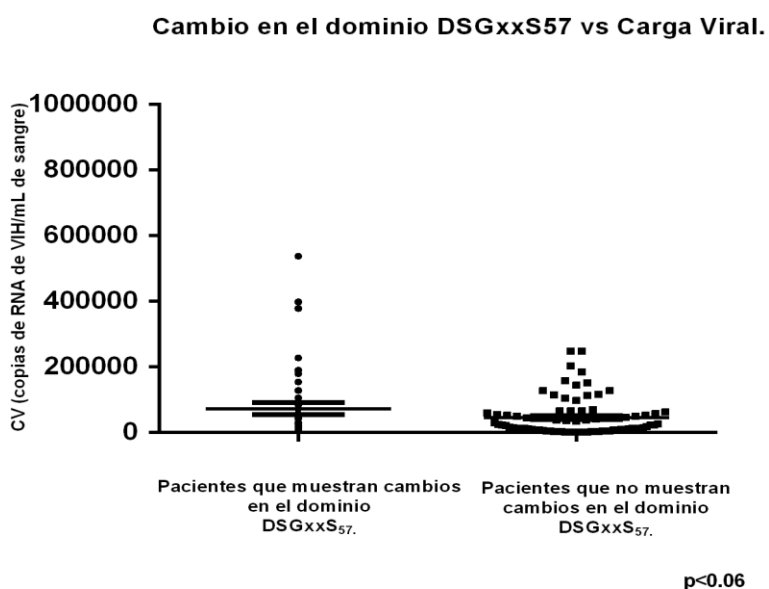


Figura 6.8. Cambios en el dominio DSGxxS₅₇ con respecto a la carga viral. La gráfica muestra la diferencia de carga viral cuando existe variación en el dominio DSGxxS₅₇ comparado con un control (pacientes que no presentan cambios en el dominio DSGxxS₅₇).

6.3.1. Análisis de Entropía de Shannon.

Para evaluar más a fondo la variabilidad de las proteínas estudiadas, Vif, Vpr, Vpu, exón I de Tat y exón I de Rev, se utilizó el parámetro llamado entropía de Shannon, una estimación del grado de aleatoriedad de cada posición de la secuencia.

Se empleó la herramienta entropía de Shannon de la Base de Datos de los Álamos. Inicialmente, se determinó la entropía general de todas las secuencias (**Figura 6.9**), observándose un mayor número de posiciones con alto grado de entropía en la región que abarca el exón I de Tat, exón I de Rev y Vpu.

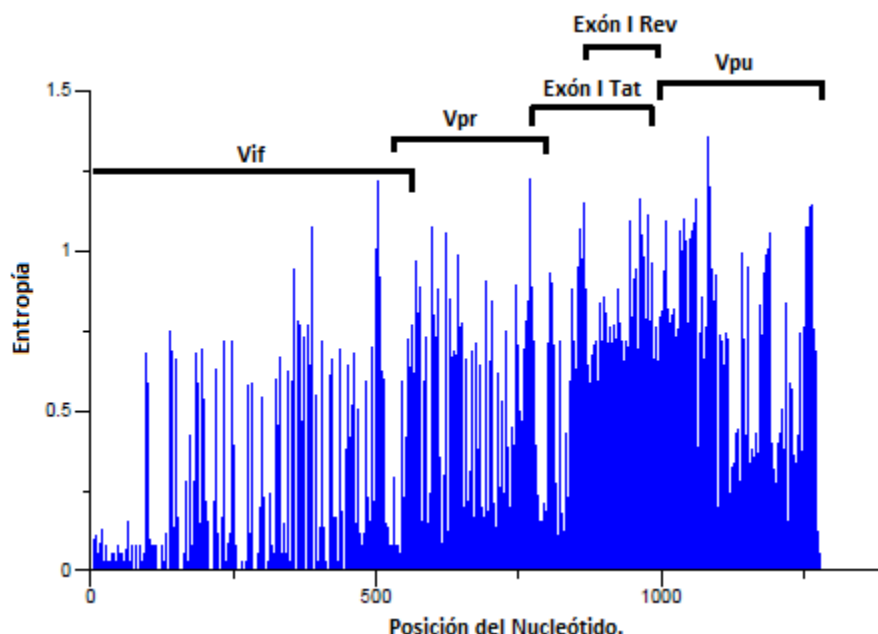


Figura 6.9. Se muestra en la figura el grado de entropía de cada posición de 200 secuencias que abarcan la región de proteínas accesorias/reguladoras, determinada a partir de la herramienta Entropía de Shannon de la Base de Datos de los Álamos.

Más aun, para evaluar la temporalidad de aparición de cambios en las secuencias, se comparó la entropía de Shannon de pacientes en etapas tempranas de la infección por VIH (individuos que presentaron cuenta de células T CD4+ > 500 células / μ L de sangre) vs la entropía de Shannon de pacientes en etapas avanzadas de la infección por VIH (individuos que presentan cuenta de células T CD4+ < 200 células / μ L de sangre), tomando en cuenta la diferencia de entropía entre los dos grupos en cada una de las posiciones de la proteína.

En el caso de la proteína Vif se observó una preponderancia de posiciones donde no hay diferencia en variabilidad entre las dos poblaciones (diferencia de entropía = 0). Por tanto, las secuencias obtenidas mostraron globalmente un perfil de baja entropía, que pareciera reflejar una restricción funcional que concuerda con la importancia de la actividad de Vif para la replicación viral por su acción antagónica hacia el factor antiviral APOBEC3. Se determinaron 3 posiciones con mayor entropía en individuos que se encuentran en una etapa tardía de la infección y otras 3 posiciones con mayor entropía en individuos en etapa temprana de la infección (**Figura 6.10**). Sin embargo, ninguna de estas posiciones se encuentran en regiones funcionalmente importantes para Vif. Estas diferencias podrían reflejar la reversión y aparición de mutaciones asociadas a selección por HLA.

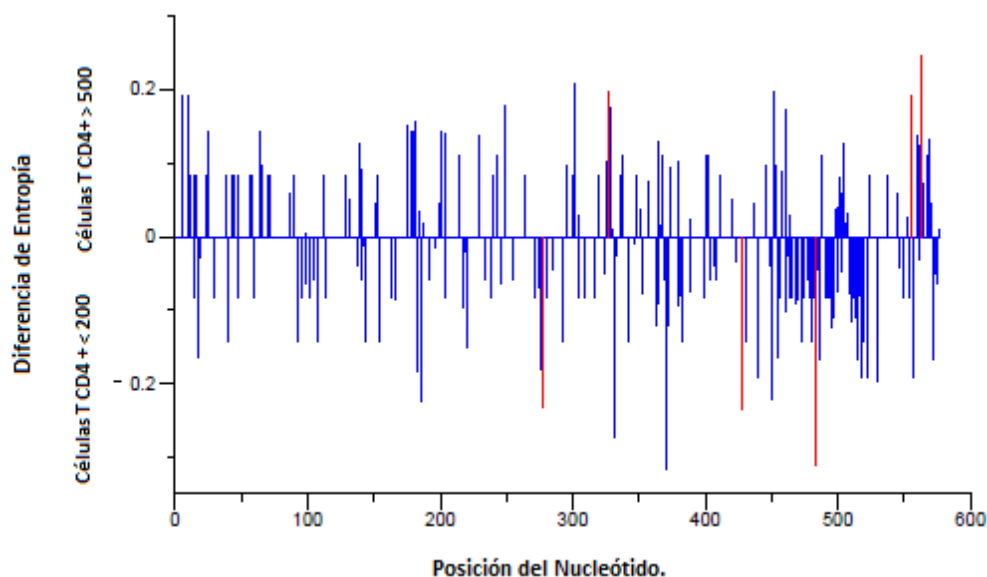


Figura 6.10. Diferencias de entropía en pacientes en etapas tempranas y tardías de la infección por VIH en *Vif*. Se comparó la entropía de Shannon en secuencias de *vif* de individuos con cuentas de células T CD4+ < 200 células / μ L de sangre vs secuencias de individuos con cuenta de células T CD4+ > 500 células / μ L de sangre usando las herramientas de la Base de Datos de VIH de Los Alamos. En rojo se muestran aquellas posiciones que presentaron una diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre los dos grupos de pacientes. Se muestran los resultados de 160 secuencias del gen *vif* (**80 en etapa temprana y 80 en etapa tardía**) de pacientes mexicanos.

Para la proteína Vpr, se determinaron 7 posiciones con diferencia significativa de entropía en pacientes en etapas tempranas y tardías de la infección por VIH. De estas posiciones, 6 se localizaron en el set de secuencias del grupo integrado por individuos que se encuentran en etapa tardía de la infección y sólo una posición en el grupo de individuos en una etapa temprana de la infección (**Figura 6.11**). Esta observación refleja el aumento gradual de la diversidad viral en Vpr a lo largo de la infección.

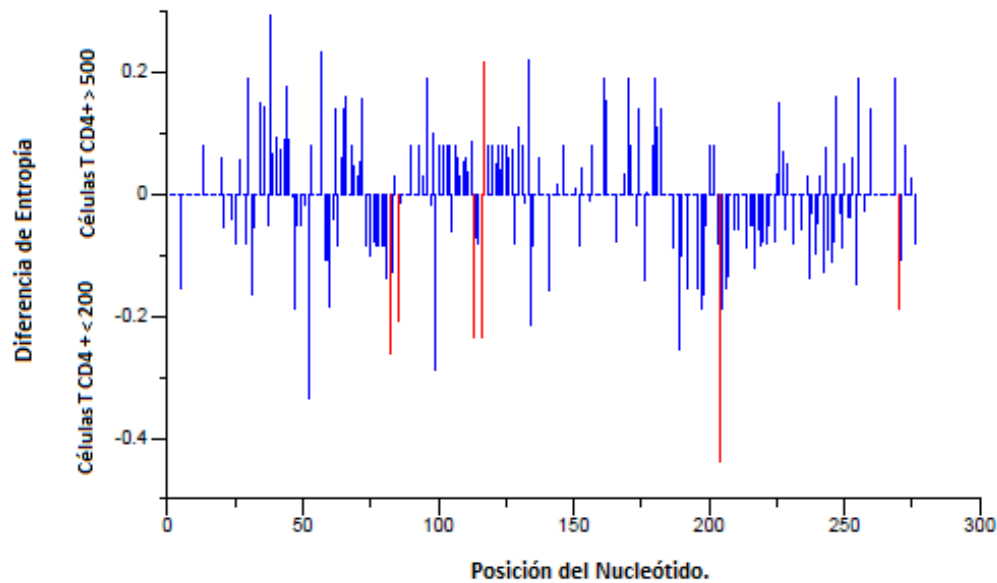


Figura 6.11. Diferencias de entropía en pacientes en etapas tempranas y tardías de la infección por VIH en Vpr. Se comparó la entropía de Shannon en secuencias de vpr de individuos con cuentas de células T CD4+ < 200 células / μ L de sangre vs secuencias de individuos con cuenta de células T CD4+ > 500 células / μ L de sangre usando las herramientas de la Base de Datos de VIH de Los Alamos. En rojo se muestran aquellas posiciones que presentaron una diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre los dos grupos de pacientes. Se muestran los resultados de 160 secuencias del gen vpr (**80 en etapa temprana y 80 en etapa tardía**) de pacientes mexicanos.

Interesantemente, en la proteína Vpu se observó una cantidad alta de posiciones con diferencias en variabilidad entre virus en etapas tempranas y tardías, con un predominio de posiciones con mayor entropía en virus de etapas tardías de la infección, mostrando una diversificación temporal mayor que el resto de las proteínas accesorias (**Figura 6.13**).

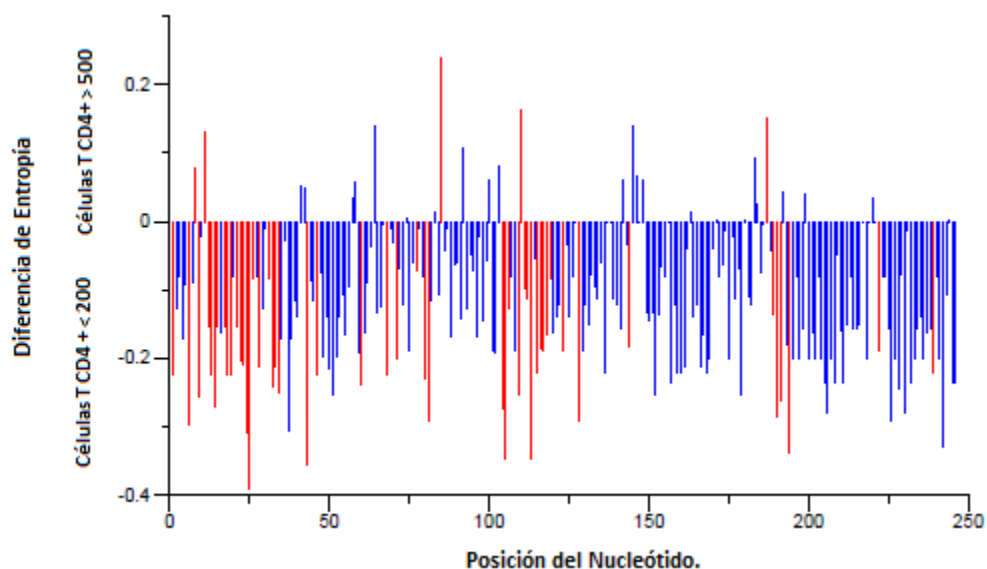


Figura 6.13. Diferencias de entropía en pacientes en etapas tempranas y tardías de la infección por VIH en Vpu. Se comparó la entropía de Shannon en secuencias de Vpu de individuos con cuentas de células T CD4+ < 200 células / μ L de sangre vs secuencias de individuos con cuenta de células T CD4+ > 500 células / μ L de sangre usando las herramientas de la Base de Datos de VIH de Los Alamos. En rojo se muestran aquellas posiciones que presentaron una diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre los dos grupos de pacientes. Se muestran los resultados de 160 secuencias del gen *vpu* (**80 en etapa temprana y 80 en etapa tardía**) de pacientes mexicanos.

En el exón I de Tat, se observaron 22 posiciones con mayor entropía en virus de individuos con cuenta de células T CD4+ < 200 células/ μ L contra 5 posiciones en las secuencias de virus de individuos con cuenta de células T CD4+ > 500 células/ μ L (**Figura 6.14**).

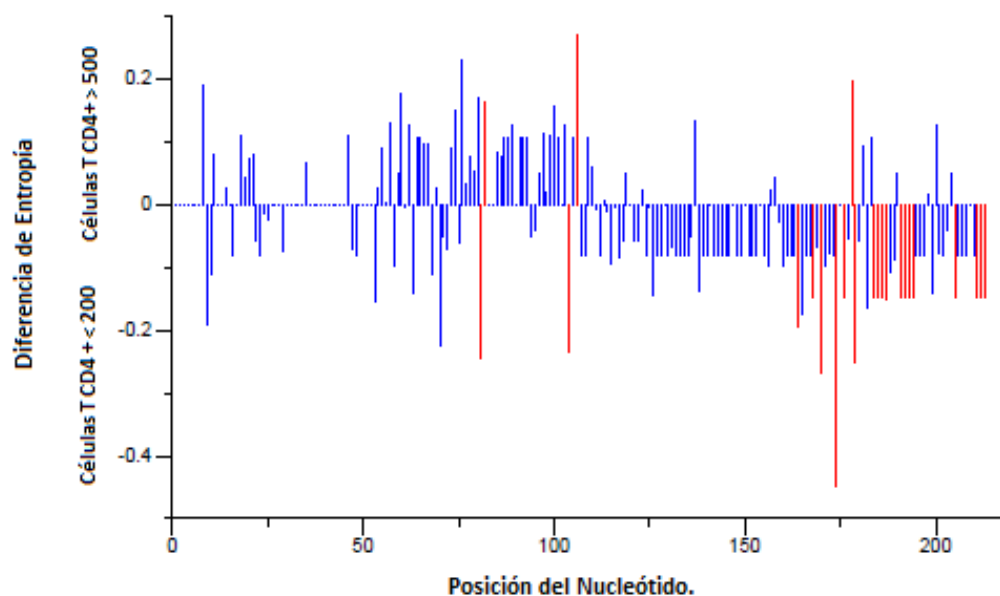


Figura 6.14. Diferencias de entropía en pacientes en etapas tempranas y tardías de la infección por VIH en exón I de Tat. Se comparó la entropía de Shannon en secuencias del exón I de Rev de individuos con cuentas de células T CD4+ < 200 células / μ L de sangre vs secuencias de individuos con cuenta de células T CD4+ > 500 células / μ L de sangre usando las herramientas de la Base de Datos de VIH de Los Alamos. En rojo se muestran aquellas posiciones que presentaron una diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre los dos grupos de pacientes. Se muestran los resultados de 160 secuencias del exón I del gen *tat* (**80 en etapa temprana y 80 en etapa tardía**) de pacientes mexicanos.

Para el exón I de Rev, 38 posiciones mostraron mayor entropía en virus de pacientes en etapas tardías de la infección, contra solo dos en virus de etapas tempranas, mostrando otra vez la mayor diversificación del virus hacia etapas más avanzadas de la infección (**Figura 6.15**).

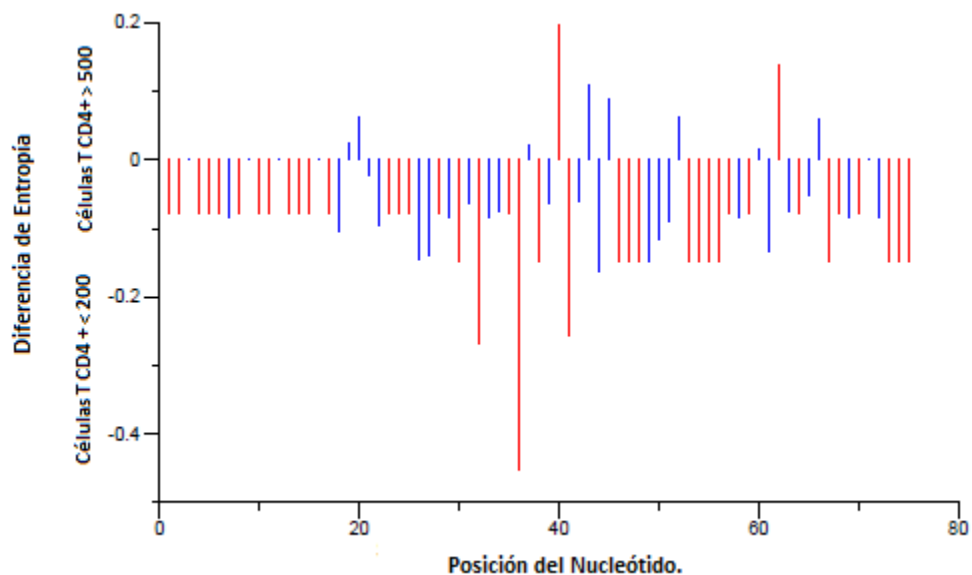


Figura 6.15. Diferencias de entropía en pacientes en etapas tempranas y tardías de la infección por VIH en el exón I de Rev. Se comparó la entropía de Shannon en secuencias del exón I de Rev de individuos con cuentas de células T CD4+ < 200 células / μ L de sangre vs secuencias de individuos con cuenta de células T CD4+ > 500 células / μ L de sangre usando las herramientas de la Base de Datos de VIH de Los Alamos. En rojo se muestran aquellas posiciones que presentaron una diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre los dos grupos de pacientes. Se muestran los resultados de 160 secuencias del exón I del gen *rev* (**80 en etapa temprana y 80 en etapa tardía**) de pacientes mexicanos.

En conjunto estos resultados muestran una mayor diversificación viral hacia etapas más tardías de la infección por VIH, siendo esta tendencia más marcada para Vpu, y el primer exón de Tat y Rev; y en menor grado para Vpr y Vif. Interesantemente, Vif y Vpr presentaron pocas diferencias entre virus en etapas tempranas y tardías de la infección, tendiendo a conservar más su grado de variabilidad en el tiempo. Estos datos muestran diferencias importantes en la evolución de las distintas proteínas accesorias a lo largo de la infección.

6.4. Análisis de sitios que se encuentran bajo presión selectiva positiva.

Para poder explicar parte de la variabilidad observada en las diversas proteínas accesorias/reguladoras, se realizó un análisis de presión selectiva. Las posiciones del genoma viral bajo selección positiva, se determinaron mediante el programa SLAC del servidor en línea DataMonkey. Los sitios bajo presión selectiva positiva fueron definidos como aquéllos en los que la razón de sustituciones no sinónimas era significativamente mayor que la razón de sustituciones sinónimas ($p < 0.05$); adicionalmente, sitios con tendencia a conservación (presión selectiva negativa), fueron determinados como aquéllos en los que la razón de sustituciones sinónimas era significativamente mayor que la razón de sustituciones no sinónimas ($p < 0.05$) (**Figura 6.16**).

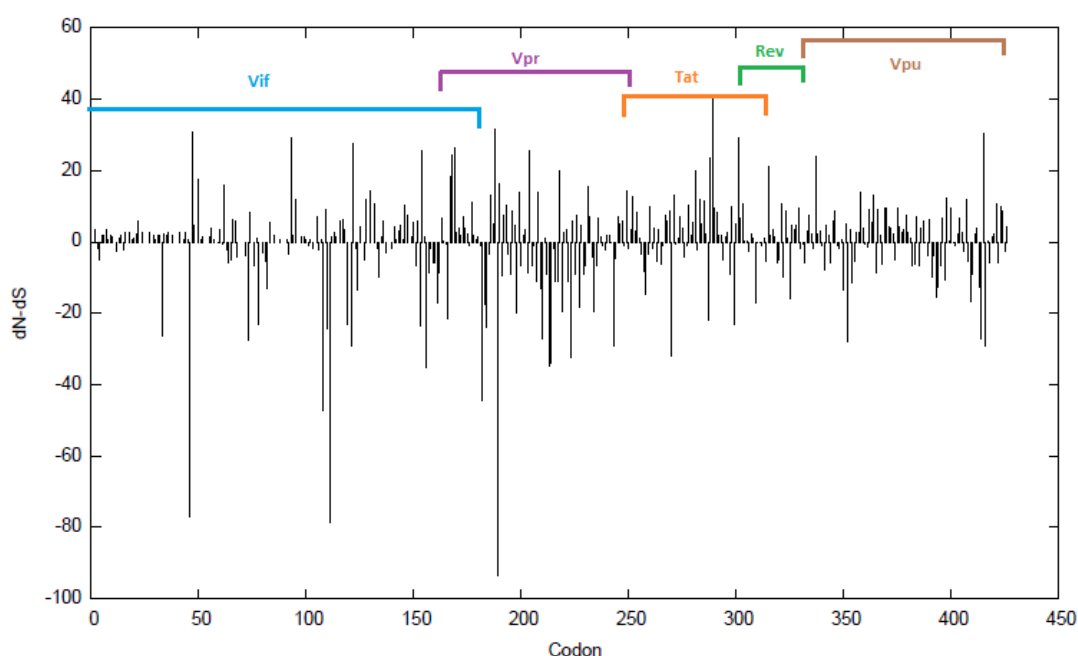


Figura 6.16. Análisis de sitios que se encuentran bajo presión selectiva tanto positivamente como negativamente en la secuencia de proteínas accesorias/reguladoras incluyendo a Vif, Vpr, Vpu y el primer exón de Tat y Rev de VIH. Las razones de sustituciones sinónimas (dS) y no sinónimas (dN), fueron calculadas con el programa SLAC del servidor en línea DataMonkey.

En total se encontraron 33 posiciones bajo presión selectiva positiva en la región de proteínas accesorias/reguladoras de los virus mexicanos, cuya distribución fue la siguiente: 17 en Vif (51.51%), 6 en Vpr (18.18%), 8 en el exón 1 de Tat (24.24%), 1 en Vpu (3.03%) y 1 en el primer exón de Rev (3.03%) **(Tabla 6.4)**. Considerando la longitud de cada una de las proteínas de la región, de acuerdo al nivel de presión selectiva (medida como porcentaje de posiciones identificadas como bajo presión selectiva positiva) las proteínas podrían ordenarse de la siguiente manera: Vif (8.9%, 17/192) > Tat (8.0%, 8/71) > Vpr (6.3%, 6/96) Rev (2.0%, 1/25) > Vpu (1.2% 1/82).

Además se encontraron 42 posiciones bajo presión selectiva negativa en la región de proteínas accesorias/reguladoras de los virus mexicanos, en donde la distribución fue la siguiente: 16 en Vif (38.09%), 14 en Vpr (33.33%), 4 en el exón I de Tat (9.52%), 6 en Vpu (14.28%) y 2 en el primer exón de Rev (4.76%).

Tabla 6.4. Posiciones de la región de proteínas accesorias/reguladoras bajo presión selectiva positiva en VIH circulante en México.

Codón bajo Presión Selectiva	dN-dS Normalizado.	Valor de p.
Vif 47	4.92667	2.96154E-06
Vif 50	2.78424	0.00237611
Vif 62	2.55597	0.00632166
Vif 74	1.30753	0.0173613
Vif 93	4.68495	7.70934E-06
Vif 122	4.38668	0.00188157
Vif 128	1.87843	0.0145724
Vif 130	2.2548	0.0125873
Vif 132	1.69998	0.00513823
Vif 146	1.63235	0.00870975
Vif 147	1.16273	0.0290109
Vif 154	4.07479	0.00406632
Vif 163	1.04516	0.0393119
Vif 168	3.91069	0.0332021
Vif 169	4.20783	0.00610387
Vif 177	1.74152	0.0427643
Vif 188	5.38252	0.00063171
Vpr 194	1.25001	0.028926
Vpr 202	1.9186	0.0465949
Vpr 210	1.13337	0.028947
Vpr 221	3.00722	0.0016036
Vpr 266	1.6408	0.0138851
Vpr 269	1.54033	0.0478547
Tat 297	1.24768	0.0237426
Tat 304	1.13007	0.0403232
Tat 307	2.44138	0.0078993
Tat 315	2.81069	0.0358572
Tat 327	3.37497	5.51E-05
Tat 329	1.36591	0.03751
Tat 341	2.11569	0.0085907
Tat 355	1.42874	0.0274265
Rev 384	3.44445	0.0002689
Vpu 388	2.25289	0.0427665

Estos resultados en conjunto muestran una mayor presión selectiva positiva actuando sobre Vif, que sobre otras proteínas accesorias. Así mismo, Vif muestra la mayor cantidad de posiciones con tendencia a conservación en la región. Es notorio también el bajo impacto de la presión selectiva sobre la variabilidad de Vpu y Rev.

6.5. Búsqueda de Asociación HLA – Codón de VIH.

Se buscaron asociaciones HLA – codón de VIH en las secuencias de la región de proteínas accesorias/reguladoras, incluyendo a Vif, Vpr, Vpu y el primer exón de Tat y Rev de VIH de los 200 individuos mexicanos tratando de ubicar posiciones asociadas a presión selectiva positiva dentro o cerca de epítomos previamente reportados para distintos alelos HLA. El posible papel del HLA en la evolución del VIH en la región en cuestión fue evaluado mediante el uso de mapas de epítomos óptimos de linfocitos T citotóxicos de la Base de Datos de VIH de Los Alamos.

De las 33 posiciones determinadas como bajo presión selectiva positiva por métodos de razón de sustituciones sinónimas y no sinónimas (Tabla 6.4), 29 (88%) fueron identificadas como sitios con posible asociación a moléculas HLA de clase I, lo que nos llevaría a pensar que existe una fuerte influencia de presión selectiva por CTLs en la evolución del VIH a nivel poblacional **(Figura 6.17 a 6.21)**.

Notablemente, 4 de las 33 posiciones con evidencia de selección positiva, no se identificaron como posiciones asociadas a HLA. Sin embargo, este hecho no implica que no exista presión por HLA en estas posiciones dado que los mapas de epítomos empleados para hacer las asociaciones con HLA no son extensivos e incluyen sólo epítomos que han sido comprobados experimentalmente. Además, la diversidad alélica HLA de la población mexicana podría traer como consecuencia que los alelos HLA selectores no estén bien descritos en las bases de datos y no haya epítomos comprobados experimentalmente para ellos. Así mismo, dentro de las posiciones asociadas a presión selectiva por HLA, la especificidad del reconocimiento podría variar dada la promiscuidad de varios alelos HLA para unir

péptidos, así como las diferencias en distribuciones alélicas HLA en México con respecto a otras poblaciones.

En el caso de la proteína Vif, del total de posiciones bajo presión selectiva (n=17) 11 se encontraron dentro de epítomos confirmados de alelos HLA (incluyendo una dentro de un epítomo de restricción HLA desconocida). La posición Vif 50 con la presencia de arginina asociada al alelo B*0702, la posición Vif 62 asociada a los alelos B*27 y B*3501 con la presencia de alanina, la posición Vif 74 con la presencia de treonina asociada al alelo B*35; las posiciones Vif 128, 130 y 132 con la presencia de isoleucina, serina y arginina respectivamente asociadas al alelo A*29, la posición Vif 154 con la presencia de isoleucina asociada al alelo A2, la posición 163 asociada a los alelos A2, A*0301, A11 y B7 y por último las posiciones Vif 168 y 169 asociadas a los alelos A3 y B57 con la presencia de leucina y prolina (**Figura 6.17**). Además, 4 posiciones se observaron en zonas adyacentes a epítomos HLA confirmados, pudiendo representar posibles mutaciones de escape asociadas a procesamiento de epítomos: 47, 146, 147 y 177. Así, 15 de las 17 posiciones bajo presión selectiva positiva, pudieron explicarse por posibles asociaciones con alelos HLA.

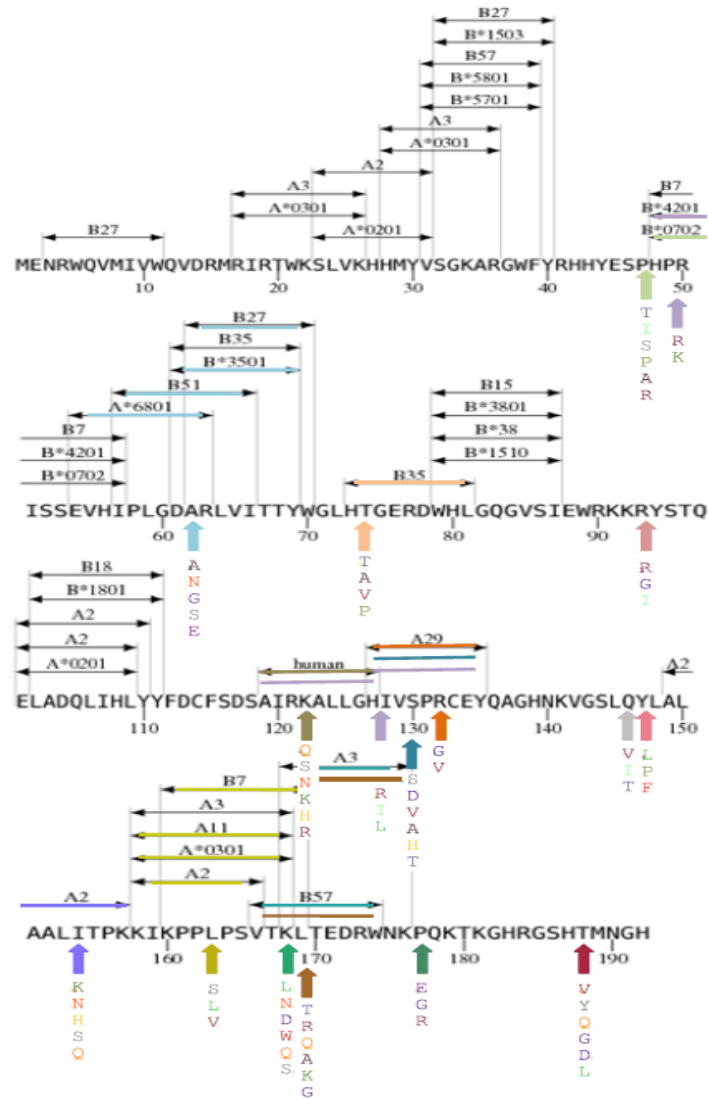


Figura 6.17. Mapa de epítomos de linfocitos T citotóxicos (CTLs) de Vif ubicando posiciones determinadas como bajo presión selectiva positiva en las secuencias de 200 virus mexicanos. Se muestra la estructura primaria de la proteína y los epítomos de CTLs comprobados experimentalmente reportados en la Base de Datos de Inmunología de Los Alamos (<http://www.hiv.lanl.gov/content/immunology/maps/ctl/ctl.pdf>). Los codones bajo presión selectiva positiva están señalados por medio de flechas. Debajo de cada una se indican los polimorfismos encontrados en esa posición.

Para la proteína Vpr, se detectaron 6 posiciones bajo presión selectiva positiva de las cuales 2 mostraron posible asociación con alelos HLA. La posición Vpr 210 con la presencia de triptófano asociada al alelo B*4002 y la posición Vpr 221 asociada al alelo B*5101 con la presencia de ácido glutámico (**Figura 6.18**). Además, tres codones adicionales mostraron asociación con epítomos con especificidad HLA desconocida. Así, la mayoría (5/6) de las posiciones identificadas como bajo presión selectiva positiva en Vpr pudieron explicarse por asociaciones con HLA.

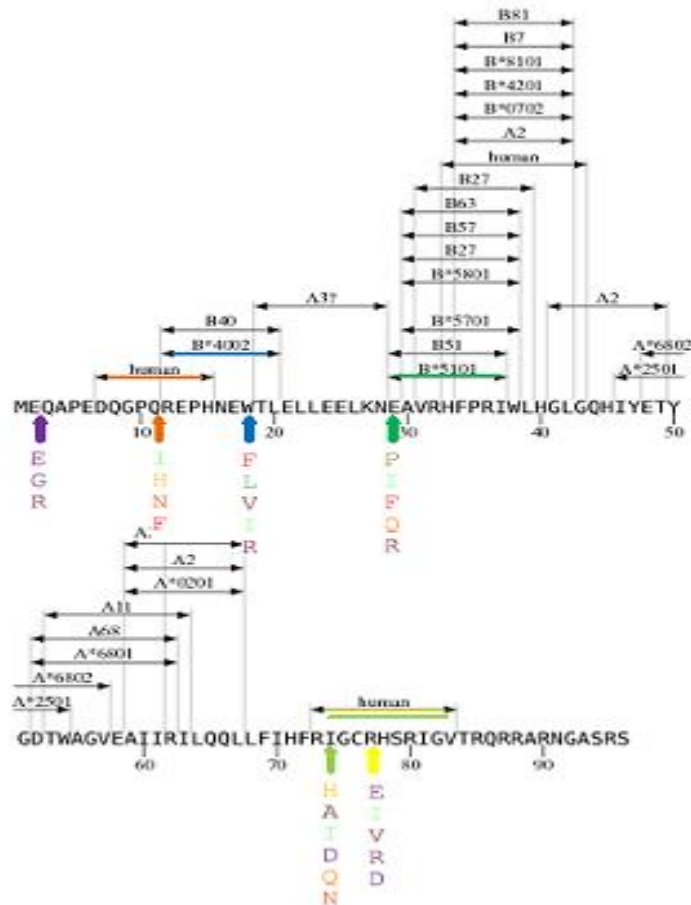


Figura 6.18. Mapa de epítomos de linfocitos T citotóxicos (CTLs) de Vpr ubicando posiciones determinadas como bajo presión selectiva positiva en las secuencias de 200 virus mexicanos. Se muestra la estructura primaria de

la proteína y los epítomos de CTLs comprobados experimentalmente reportados en la Base de Datos de Inmunología de Los Alamos (<http://www.hiv.lanl.gov/content/immunology/maps/ctl/ctl.pdf>). Los codones bajo presión selectiva positiva están señalados por medio de flechas. Debajo de cada una se indican los polimorfismos encontrados en esa posición.

Por otro lado en el caso de la proteína Vpu se encontró una sola posición con evidencia de selección positiva que a su vez mostró asociación posible con HLA; la posición Vpu 388 con la presencia de isoleucina asociada al grupo alélico B07 ó alternativamente como una posible mutación de procesamiento asociada a Cw*1801 (Figura 6.19).



Figura 6.19. Mapa de epítomos de linfocitos T citotóxicos (CTLs) de Vpu ubicando posiciones determinadas como bajo presión selectiva positiva en las secuencias de 200 virus mexicanos. Se muestra la estructura primaria de la proteína y los epítomos de CTLs comprobados experimentalmente reportados en la Base de Datos de Inmunología de Los Alamos (<http://www.hiv.lanl.gov/content/immunology/maps/ctl/ctl.pdf>). Los codones bajo presión selectiva positiva están señalados por medio de flechas. Debajo de cada una se indican los polimorfismos encontrados en esa posición.

En el exón 1 de Tat, se detectaron 8 posiciones bajo presión selectiva positiva de las cuales 7 mostraron asociación con alelos HLA (incluyendo 2 posiciones asociadas a epítomos HLA de especificidad desconocida). La posición Tat 297 asociada a los alelos B*5301 y B*2501, B 58 y B 57 con la presencia de ácido glutámico; la posición Tat 307 con la presencia de serina asociada al alelo B 35, la posición 315 asociadas a los alelos A*3, A*2902 y A*68 con la presencia de cisteína, la posición Tat 327 con la presencia de isoleucina asociada a los alelos B*1501, B*1503 y A*6801 y por último la posición Tat 329 asociada a los alelos B*1501, B*1503 y A*6801 con la presencia de lisina (**Figura 6.20**).

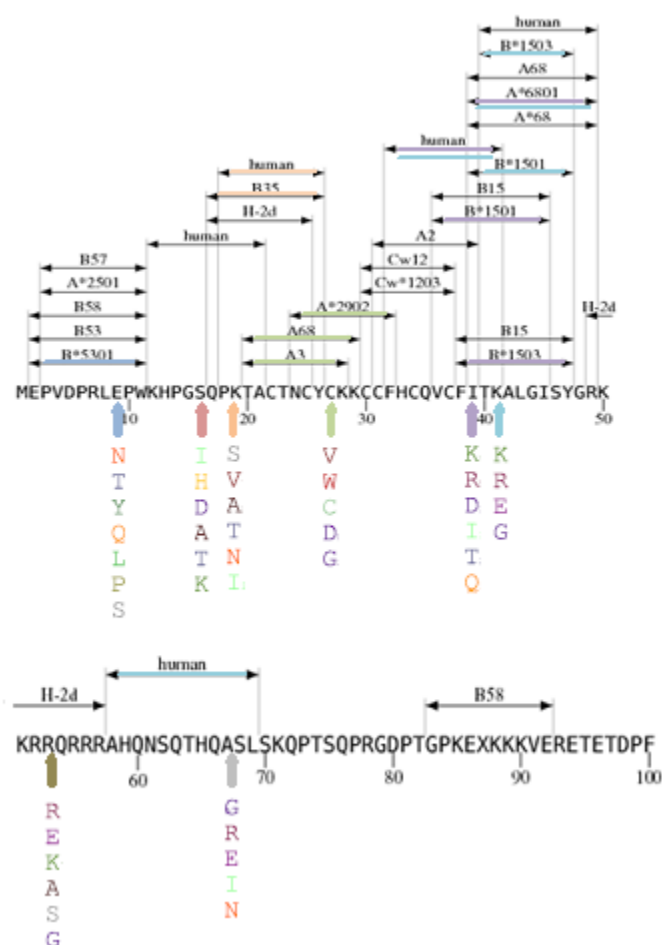


Figura 6.20. Mapa de epítomos de linfocitos T citotóxicos (CTLs) de Tat ubicando posiciones determinadas como bajo presión selectiva positiva en las secuencias de 200 virus mexicanos. Se muestra la estructura primaria de

la proteína y los epítomos de CTLs comprobados experimentalmente reportados en la Base de Datos de Inmunología de Los Alamos (<http://www.hiv.lanl.gov/content/immunology/maps/ctl/ctl.pdf>). Los codones bajo presión selectiva positiva están señalados por medio de flechas. Debajo de cada una se indican los polimorfismos encontrados en esa posición.

En el primer exón de Rev se encontró una sola posición con evidencia de selección positiva que mostró asociación con HLA; la posición Rev 382 con la presencia de tirosina asociada al alelo A*03, B*5701, B*5703 (**Figura 6.21**).

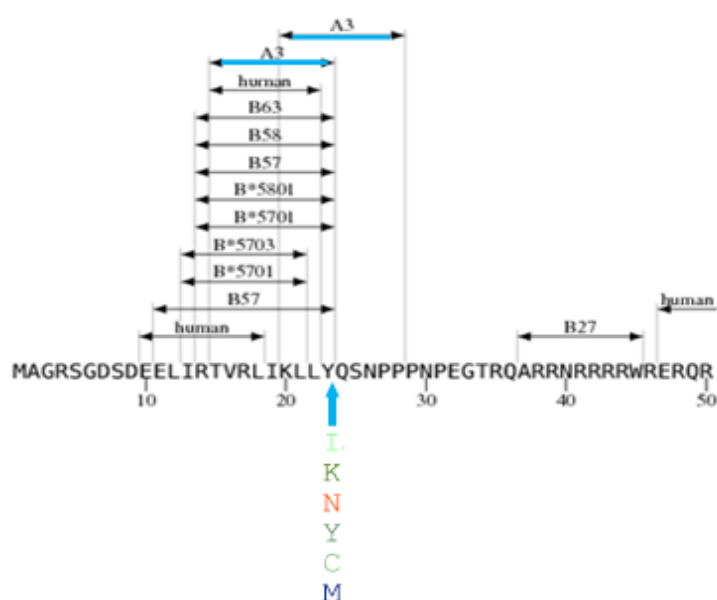


Figura 6.21. Mapa de epítomos de linfocitos T citotóxicos (CTLs) de Tat ubicando posiciones determinadas como bajo presión selectiva positiva en las secuencias de 200 virus mexicanos. Se muestra la estructura primaria de la proteína y los epítomos de CTLs comprobados experimentalmente reportados en la Base de Datos de Inmunología de Los Alamos (<http://www.hiv.lanl.gov/content/immunology/maps/ctl/ctl.pdf>). Los codones bajo presión selectiva positiva están señalados por medio de flechas. Debajo de cada una se indican los polimorfismos encontrados en esa posición.

En conjunto, estos resultados muestran un fuerte impacto de la presión selectiva por HLA en la evolución de la región de proteínas accesorias reguladoras del VIH circulante en México. Interesantemente, las proteínas Vif, Vpr y Tat mostraron un impacto mayor del HLA en la evolución viral que Vpu y Rev.

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

CARACTERÍSTICAS DE LA COHORTE EN ESTUDIO.

Para el presente trabajo, se seleccionaron 200 individuos infectados con VIH-1, de la cohorte de Epidemiología y Evolución del Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas, con la finalidad de estudiar y evaluar por primera vez la variabilidad de las proteínas accesorias/reguladoras del VIH circulante en México en el contexto inmunogenético de la población mexicana. Este estudio es de alta relevancia para nuestra población dada su aplicabilidad al conocimiento de evolución poblacional del virus en la población mexicana y en el campo de vacunas.

De acuerdo al valor promedio de cuentas de células T CD4+, la cohorte estuvo formada mayoritariamente por individuos en etapas tempranas de la infección, con una baja representación de individuos en etapas tardías. En este sentido, la cohorte de pacientes del presente estudio resultó ser diferente a las cohortes típicas de América Latina (44), donde los individuos infectados por VIH tienden a acudir a los centros de salud de manera tardía, con cuentas de células T CD4+ bajas y recurrentemente con enfermedades oportunistas, debido a la falta de acceso a los centros de salud, la estigmatización de la enfermedad y la consecuente discriminación, así como a la deficiencia en información. Esto podría representar un posible sesgo en la selección de pacientes. Sin embargo, el hecho de contar con pacientes en etapas tempranas de la infección por VIH, así como pacientes en etapas tardías hizo posible hacer una estimación, a través de un análisis transversal, del cambio de la variabilidad de la región genética de interés en el tiempo. Así mismo, un factor que enriquece grandemente el estudio y le da mayor significado a nivel nacional es la inclusión de virus de diversas regiones del país, incluyendo a 12 estados de la República Mexicana.

ANÁLISIS FILOGENÉTICO.

Mediante el uso de análisis filogenéticos, se analizó si las secuencias de cada región se agrupaban de manera característica.

En cuanto al grado de divergencia de las secuencias y la distribución geográfica, se detectó una posible agrupación entre pacientes de los estados del centro y sur del país demostrando así una relación evolutiva y adaptación del virus similar. Estudios previos han observado diferencias en la distribución alélica HLA en individuos del norte y del sur de la República Mexicana, teniendo los individuos del norte un componente mayor de alelos HLA caucásicos y los individuos del sur un componente mayor de alelos HLA amerindios (44). Nuestros resultados sugieren un componente importante de alelos amerindios importante en el centro del país, que podría determinar una adaptación viral similar a la región del sur. Alternativamente, la existencia de eventos fundadores y vías de transmisión del VIH que determinaran una diversificación similar del virus en el centro y sur del país, no puede ser descartada.

ANÁLISIS DE VARIABILIDAD.

Se analizaron las secuencias de las proteínas Vif, Vpr y Vpu, con el objetivo de examinar si la presencia de virus con polimorfismos que pudieran afectar funciones en estas proteínas se asociaba con la progresión de la enfermedad.

En general, no se observaron cambios que parecieran impactar funcionalmente a las proteínas estudiadas. Sin embargo, si se encontraron pequeñas deleciones/inserciones, así como cambios de aminoácidos de diferentes propiedades bioquímicas en algunas regiones importantes para la funcionalidad de estos genes. Interesantemente, estos cambios no se observaban de manera predominante en grupos de individuos con características clínicas semejantes, apareciendo tanto en secuencias de individuos con viremia alta como en secuencias de individuos con viremia baja. Sin embargo, en los primeros estudios de análisis de secuencias de VIH se hallaron defectos genéticos en la región de proteínas accesorias/reguladoras que aparecían con mayor frecuencia en un

grupo de pacientes con progresión lenta a la enfermedad (15). Estos trabajos llevaron a pensar que la presencia de mutaciones ó cambios en el genoma del virus, podría ser la causa de la no progresión en pacientes lentos progresores, aunque simultáneamente también hubo estudios que no encontraban diferencias en ninguna de la proteínas tanto accesorias y reguladoras en este grupo de pacientes (20). Se requieren estudios adicionales para determinar detalladamente el impacto de estos polimorfismos en la secuencia de las proteínas accesorias en la capacidad replicativa del virus y en al avance de la enfermedad.

Interesantemente, el grado de variabilidad medido mediante la entropía de Shannon en las diferentes proteínas accesorias/reguladoras fue diferente: Vif < Vpr < Vpu < Tat/Rev. Es interesante la poca variabilidad relativa observada en la proteína Vif, comparada con Vpu. Así mismo, es notable la plasticidad de las proteínas reguladoras Tat y Rev, que parecerían permitir un alto grado de polimorfismo manteniendo virus funcionales. Estas observaciones son relevantes para el diseño de vacunas que empleen como posible blanco inmunológico la región de proteínas accesorias/reguladoras del VIH en el contexto inmunogenético de la población mexicana.

EVOLUCIÓN DEL VIH.

Debido al alto polimorfismo de los genes HLA, se analizó la posibilidad de encontrar diferencias en la evolución a nivel poblacional del VIH dependiente de alelos HLA, ya que anteriormente se ha demostrado la existencia de características únicas en la evolución del VIH en poblaciones inmunogenéticamente distintas (31, 34). En el presente estudio, por primera vez se evaluó la evolución del VIH, utilizando el fragmento de las proteínas accesorias/reguladoras, en el contexto inmunogenético de la población mexicana.

Se utilizó esta región genómica pues no existe información acerca de estas proteínas en población mexicana y dadas sus funciones fundamentales para el ciclo de replicación viral, podrían ser blancos interesantes para nuevas estrategias antirretrovirales y vacunas. Además de esto, existen estudios donde se observa

que las asociaciones HLA-polimorfismo se dan a lo largo de todo el genoma del VIH (36) y observaciones preliminares de nuestro grupo han sugerido una alta densidad de respuestas de CTLs en la región de las proteínas accesorias/reguladoras en población mexicana, aumentando aún más el interés del estudio de esta región con posibles aplicaciones para el desarrollo de inmunógenos efectivos en nuestra población.

Para explorar la evolución del VIH en cada una de las proteínas de la región, se realizó una búsqueda de posiciones en el genoma viral bajo presión selectiva positiva, utilizando un modelo de codones basado en tasas de sustituciones sinónimas y no sinónimas. Se observaron en total 33 posiciones bajo selección positiva, con un porcentaje de posiciones bajo presión selectiva similar, en Vif, Tat y Vpr el cual fue mayor al de Rev y Vpu, de acuerdo a la longitud de cada proteína. Interesantemente, cerca del 90% de estas posiciones identificadas bajo presión selectiva, pudieron explicarse tentativamente por asociaciones con HLA. Esto confirma observaciones previas del fuerte impacto de la presión selectiva por HLA en la evolución del VIH (30) y resalta el interés en estudiar la evolución dependiente de HLA de esta zona del genoma viral.

Aunque el número de individuos incluidos es limitado, varios de los resultados observados en el presente estudio son consistentes entre sí y con observaciones realizadas en otros estudios. Es notable que aunque la proteína Vif mostró la menor variabilidad dentro de las proteínas accesorias/reguladoras, también mostró la mayor proporción de posiciones bajo presión selectiva y con posible asociación a HLA. Estas observaciones contrastan con los resultados obtenidos para Vpu, proteína altamente variable, pero con muy bajo impacto de presión selectiva positiva. Estos grandes contrastes son fundamentales en las propiedades de cada una de las proteínas accesorias como posibles inmunógenos o blancos de fármacos antirretrovirales novedosos. La fuerte tendencia hacia la conservación en la secuencia de Vif y su alta frecuencia de mutaciones asociadas a selección por HLA, la hacen un blanco atractivo para el diseño de inmunógenos. En contraste, la inclusión de Vpu en una posible vacuna tendría probablemente una utilidad

limitada dado el alto grado de variabilidad permitido en la proteína y el bajo impacto de la respuesta inmune sobre esta variabilidad. En efecto, la baja contribución de la presión selectiva por HLA en la variabilidad de Vpu ha sido recientemente descrita (44). El caso de la proteína reguladora Tat es también interesante al mostrar la más alta variabilidad en su secuencia dentro de la región de proteínas accesorias/reguladoras, pero también una alta proporción de posiciones bajo presión selectiva.

Es notable la presencia de posiciones con mayor variabilidad en virus de etapas avanzadas de la infección en comparación con virus en etapas tempranas de la infección en la mayoría de las proteínas accesorias/reguladoras. Esta observación sugiere una diversificación temporal del VIH a lo largo de la infección, la cual bien podría estar asociada a una presión adaptativa impuesta por las respuestas de CTLs. Es sabido que, aunque la adaptación viral a las respuestas inmunodominantes restringidas por HLA ocurre en etapas muy tempranas de la infección, las mutaciones adaptativas siguen apareciendo en etapas tardías de la infección, en particular mutaciones que compensan para costos en capacidad replicativa de los virus escapados en presencia del alelo HLA selector (31, 43). Así mismo, es conocida la reversión de algunas mutaciones de escape seleccionadas en hospederos anteriores, que se pierden al ingresar el virus a un nuevo hospedero carente del alelo HLA selector. La reversión de mutaciones de escape podría estarse reflejando en posiciones con mayor variabilidad en virus de etapas tempranas con respecto a virus de etapas tardías. Alternativamente, las posiciones con mayor variabilidad en secuencias virales de etapas tempranas podrían estar reflejando la aparición de mutaciones de escape tempranas, mientras que las de mayor variabilidad en secuencias de etapas tardías podrían estar reflejando la aparición de mutaciones de escape tardías, así como mutaciones compensatorias.

Aunque el estudio de asociación con HLA del presente trabajo está limitado a bases de datos epítomos previamente comprobados en el laboratorio, los resultados sugieren fuertemente un impacto importante de la presión selectiva por

HLA sobre la variabilidad del VIH en la región de proteínas accesorias/reguladoras en México. Es interesante el hecho de que se encontraron posibles asociaciones con alelos HLA altamente frecuentes en México como B*35 y A*68. Sin embargo, son necesarios estudios más detallados de la especificidad de la presión por HLA en VIH en el contexto inmunogenético de la población mexicana. Incrementando el número de secuencias virales y añadiendo datos de tipificación HLA para cada uno de los pacientes participantes, existe la perspectiva de aplicar modelos que investigan asociaciones HLA-polimorfismo de VIH, corrigiendo para las principales variables confusoras en estudios de asociación de este tipo: los efectos de linaje filogenético, de desequilibrio de ligamiento entre los alelos HLA y de coevolución de codones en VIH (41). La aplicación de este tipo de modelos permitirá detallar la evolución de las proteínas accesorias/reguladoras del VIH en el contexto, previamente no estudiado, de la población mestiza mexicana.

8. CONCLUSION.

Para el desarrollo de este proyecto, se reunió una cohorte de 200 individuos tomada de la cohorte de Epidemiología y Evolución del Centro de Enfermedades Infecciosas. Se evaluó la evolución del VIH realizando una búsqueda de posiciones bajo presión selectiva en la región de proteínas accesorias/reguladoras; mostrando una alta densidad de estas posiciones bajo presión selectiva positiva en el fragmento en estudio. De las cuales el 90% de estas posiciones identificadas bajo presión selectiva, pudieron explicarse bajo el contexto de los alelos HLA.

Se analizaron las secuencias de las proteínas accesorias/reguladoras, con el objetivo de examinar la presencia de polimorfismos que pudiesen afectar las funciones de estas proteínas. En general, no se observaron cambios que pudiesen afectar funcionalmente a las proteínas. Sin embargo, se observaron pequeñas inserciones y deleciones, así como cambios de aminoácidos con diferentes propiedades bioquímicas. Interesantemente, estos cambios no se observaron de manera predominante en grupos de individuos con características clínicas semejantes, ya que tendían a aparecer en secuencias de individuos con carga viral alta como en secuencias de individuos con carga viral baja. Notablemente, aunque la proteína Vif mostró la menor variabilidad dentro de las proteínas accesorias/reguladoras, mostró también la mayor proporción de posiciones bajo presión selectiva con posible asociación HLA. Por otro lado, Vpu resultó ser una proteína altamente variable, pero con muy bajo impacto de presión selectiva positiva. Tat mostró la más alta variabilidad en su secuencia dentro de la región de proteínas accesorias/reguladoras, pero también una alta proporción de posiciones bajo presión selectiva positiva.

El grado de variabilidad mediante la entropía de Shannon en cada una de las proteínas fue diferente: $Vif < Vpr < Vpu < Tat/Rev$. Vif resultó ser menos variable comparada con Vpu. En el caso de las proteínas accesorias Tat y Rev, mostraron un alto grado de polimorfismo.

Esta información es útil para el entendimiento de la patogenicidad del virus, además de que nos permite disponer de nuevas herramientas o alternativas para identificar posibles blancos de inmunogénos efectivos en nuestra población.

Bibliografía.

1. Onusida. Informe sobre epidemia mundial del SIDA 2009. 2009.
2. Censida. El VIH en México 2011. Numeralia Epidemiológica 2011.
3. Delgado Rafael. **Características virológicas del VIH.** Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2011; **29(1)**:58–65.
4. Ávila-Ríos S, Reyes-Terán G: **Virología del VIH: Buscando nuevas estrategias antirretrovirales.** *25 Años de SIDA en México.* Primera Edición. 2008, Instituto Nacional de Salud Pública; 2008: 135-160.
5. Peterlin, B, M. and D. Trono, Hide, shield and strike back: **How HIV-infected cells avoid immune eradication.** *Nat Rev Immunology*, 2003, **3**: p: 97-107.
6. Castillo M. S. Tipos, subtipos y correceptores. **El virus de la Inmunodeficiencia Humana y el SIDA.** Instituto Politécnico Nacional.
7. Harrison, Principios de Medicina Interna, Decimoséptima Edición, Capítulo 182 "**Enfermedad por el virus de Inmunodeficiencia humana: Sida y procesos relacionados**", A. S. Fauci, H. C Lane, pag. Versión online disponible en <http://harrisonmedicina.com/content.asprx>
8. Marin M, Rose KM, Kozak SL, Kabat D: **HIV-1 Vif protein binds the editing enzyme APOBEC3G and induces its degradation.** *Nat Med* 2003, **9**:1398-1403.

9. Yu X, Yu Y, Liu B, Luo K, Kong W, Mao P, Yu XF: **Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex.** *Science* 2003, **302**: 1056-1060.

10. Xiao Z, Ehrlich E, Yu Y, Luo K, Wang T, Tian C, Yu XF: **Assembly of HIV-1 Vif-Cul5 E3 ubiquitin ligase through a novel zinc-binding domain-stabilized hydrophobic interface in Vif.** *Virology* 2006, **349**: 290-299.

11. Le Rouzic E, Benichou S: **The Vpr protein from HIV-1: distinct roles along the viral life cycle.** *Retrovirology* 2005, **2**:11.

12. Alagarsamy Srinivasan, Velpandi Ayyavoo, Sundarasamy Mahalingam, Aarthi Kannan, Anne Boyd, Debdiuti Datta: **A comprehensive analysis of the naturally occurring polymorphisms in HIV-1 Vpr: Potential impact on CTL epitopes.** *Virology Journal* 2008, **5**:99.

13. Guillaume Jacquot, Erwann Le Rouzic, Priscilla Maidou-Peindara, Marion Maizy, Jean-Jacques et al: **Characterization of the Molecular Determinants of Primary HIV-1 Vpr Proteins: Impact of the Q65R and R77Q Substitutions on Vpr Functions.** *Plos One* 2009, **4**:7514.

14. Montal M: **Structure-function correlates of Vpu, a membrane protein of HIV-1.** *FEBS Lett* 2003, **552**:47-53.

15. Neil SJ, Zang T, Bieniasz PD: **Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu.** *Nature* 2008, **451**:425-430.

16. Emerman, M y Malim, M H: **HIV-1 Accesory Proteins - Ensuring Viral Survival in a Hostile Enviroment.** *Cells Host & Microbe* 2008, **3**:388-398.

17. Gupta S, Mitra D. : **Human immunodeficiency virus-1 Tat protein: immunological facets of a transcriptional activator.** *Biochem Biophys.* 2007, **5**:269-75.
18. Freed EO, Martin MA: **HIVs and their replication.** In *Fields Virology. Volume Two.* Fifth edition. Edited by Knipe DM, Howley PM. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007: 2107-2185
19. Greene WC, Peterlin BM: **Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy.** *Nat Med* 2002, **8**:673-680.
20. Deacon NJ, Tsykin A, Solomon A, Smith K, Ludford-Menting M, Hooker DJ, McPhee DA, Greenway AL, Ellett A, Chatfield C, et al: **Genomic structure of an attenuated quasi species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients.** *Science* 1995, **270**:988-991.
21. Roeth JF, Collins KL: **Human immunodeficiency virus type 1 Nef: adapting to intracellular trafficking pathways.** *Microbiol Mol Biol Rev* 2006, **70**:548-563.
22. Piguet V, Chen YL, Mangasarian A, Foti M, Carpentier JL, Trono D: **Mechanism of Nef-induced CD4 endocytosis: Nef connects CD4 with the mu chain of adaptor complexes.** *Embo J* 1998, **17**:2472-2481.
23. Piguet V, Gu F, Foti M, Demarex N, Gruenberg J, Carpentier JL, Trono D: **Nef induced CD4 degradation: a diacidic-based motif in Nef functions as a lysosomal targeting signal through the binding of beta-COP in endosomes.** *Cell* 1999, **97**:63-73.

24. Schwartz O, Marechal V, Le Gall S, Lemonnier F, Heard JM: **Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein.** *Nat Med* 1996, **2**:338-342.
25. Roeth JF, Williams M, Kasper MR, Filzen TM, Collins KL: **HIV-1 Nef disrupts MHC-I trafficking by recruiting AP-1 to the MHC-I cytoplasmic tail.** *J Cell Biol* 2004, **167**:903-913.
26. Blagoveshchenskaya AD, Thomas L, Feliciangeli SF, Hung CH, Thomas G: **HIV-1 Nef downregulates MHC-I by a PACS-1- and PI3K-regulated ARF6 endocytic pathway.** *Cell* 2002, **111**:853-866.
27. Ali A, Pillai S, Ng H, Lubong R, Richman DD, Jamieson BD, Ding Y, McElrath MJ, Guatelli JC, Yang OO: **Broadly increased sensitivity to cytotoxic T lymphocytes resulting from Nef epitope escape mutations.** *J Immunol* 2003, **171**:3999-4005.
28. Yang OO, Nguyen PT, Kalams SA, Dorfman T, Gottlinger HG, Stewart S, Chen IS, Threlkeld S, Walker BD: **Nef-mediated resistance of human immunodeficiency virus type 1 to antiviral cytotoxic T lymphocytes.** *J Virol* 2002, **76**:1626-1631.
29. Cohen GB, Gandhi RT, Davis DM, Mandelboim O, Chen BK, Strominger JL, Baltimore D: **The selective downregulation of class I major histocompatibility complex proteins by HIV-1 protects HIV-infected cells from NK cells.** *Immunity* 1999, **10**:661-671.
30. Goulder PJ, Watkins DI: **Impact of MHC class I diversity on immune control of immunodeficiency virus replication.** *Nat Rev Immunol* 2008, **8**:619-630.

31. Abul K. Abbas, A.H.L y J.S.P, **Inmunología Celular y Molecular**. Tercera ed. 1999, España: McGrawHill Interamericana. 552.
32. Kindt J. Thomas, R.A.G., Barbara A. Osborne. **Inmunología de Kuby**, Sexta ed. 2007, México: McGrawHill Interamericana. 574.
33. Leslie, A., et al., **Differential selection pressure exerted on HIV by CTL targeting identical epitopes but restricted by distinct HLA alleles from the same HLA supertype**. *J Immunol*, 2006. 177(7): 4699-4708.
34. Hendel, H., et al., **New class I and II HLA alleles strongly associated with opposite patterns of progression to AIDS**. *J Immunol*, 1999. 1 (11) p. 6942-6946.
35. Carlson JM, Brumme ZL: **HIV evolution in response to HLA-restricted CTL selection pressures: a population-based perspective**. *Microbes Infect* 2008, 10:455-461.
36. Allen TM, Altfeld M, Geer SC, et al: **Selective escape from CD8+ T-cell responses represents a major driving force of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) sequence diversity and reveals constraints on HIV-1 evolution**. *J Virol* 2005, 79: 13239-13249.
37. Enrique Espinosa: **Encontrando las huellas de la selección por VIH**. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 2006, 48:84-90.
38. Frahm N, Kiepiela P, Adams S, Linde CH, Hewitt HS, Sango K, Feeney ME, Addo MM, Lichterfeld M, Lahaie MP, et al: **Control of human immunodeficiency virus replication by cytotoxic T lymphocytes targeting subdominant epitopes**. *Nat Immunol* 2006, 7:173-178.

- 39.Ávila Ríos S, Ormsby CE, Carlson JM, Valenzuela PH, Blanco HJ, Garrido RD, et al: **Unique features of HLA-mediated HIV evolution in a Mexican cohort: a comparative study.** *Retrovirology* 2009,**6**:72

40. Carlson JM, Brumme ZL, Rousseau CM, Brumme CJ, Matthews P, Kadie C, MullinsJI, Walker BD, Harrigan PR, Goulder PJ, Heckerman D: **Phylogenetic dependency networks: inferring patterns of CTL escape and codon covariation in HIV-1 Gag.** *PLoS Comput Biol* 2008, **4**:e1000225.

41. Brumme ZL, John M, Brumme CJ, Carlson J, Haubrich R, Riddler S, Swenson L, Taol, Szeto S, Chan D, et al: **Relationship between HLA class I-driven evolution inGag, Pol and Nef and clinical markers of HIV disease: a multi-center collaborative study.** In *AIDS Vaccine, Abstract P09-01; Cape Town, South Africa.*2008

42. Brumme ZL, Tao I, Szeto S, Brumme CJ, Carlson JM, Chan D, Kadie C, Frahm N, Brander C, Walker B, et al: **Human leukocyte antigen-specific polymorphisms in HIV-1 Gag and their association with viral load in chronic untreated infection.** *Aids* 2008, **22**:1277-1286.

43. Barquera R, Zuniga J, Hernandez-Diaz R, Acuna-Alonzo V, Montoya-Gama K, Moscoso J, Torres-Garcia D, Garcia-Salas C, Silva B, Cruz-Robles D, et al: **HLA class I and class II haplotypes in admixed families from several regions of Mexico.** *Mol Immunol* 2008, **45**:1171-1178.

44. Hasan Z, Carlson JM, Gatanaga H, Le AQ, Brumme CJ, Oka S, Brumme ZL, Takamasa U: **Minor contribution of HLA class I-associated selective pressure to the variability of HIV-1 accessory protein Vpu.**

Biochemical and Biophysical Research Communications 2012: **421**: 291 - 295.