

Fig15a .- Amplificación del gene Env de VIH en ADN genómico de sangre periférica por PCR en nido (nested) en muestras de Nuevo León. Gel agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio. Marcador de peso molecular 1 Kb (M), los carriles del 1-9 corresponden a muestras de Nuevo León y presentan un producto amplificado de 1.2 kb, control negativo (-) y control positivo (+).

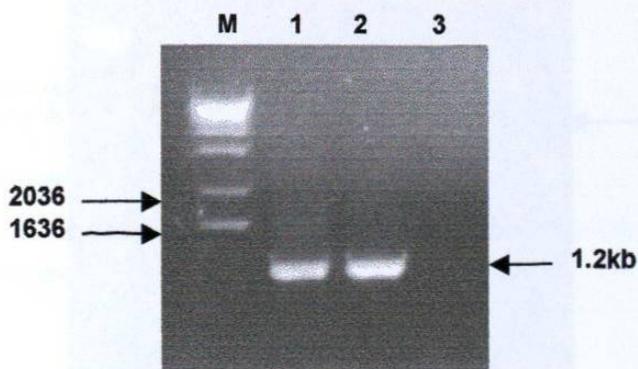


Fig 15b .- Amplificación del gene Env de VIH en DNA genómico de Sangre Periférica por PCR nested en Muestras de Nuevo León. Gel agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio. Marcador de peso molecular 1 kb (M), el carril No.1 corresponde a la muestra No. 10 de Nuevo León y presentan un producto amplificado de 1.2 kb, los carriles 2 y 3 corresponden a los controles positivo (+) y negativo (-) respectivamente.



Fig16a.- Amplificación del gene Env de VIH en ADN genómico de sangre periférica por PCR en nido (nested) en muestras de Jalisco. Gel agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio. Marcador de peso molecular (M), los carriles 1-6 corresponden a las muestras 1-6 de Jalisco y presentan un producto amplificado de 1.2 kb, control negativo (-) y control positivo (+).

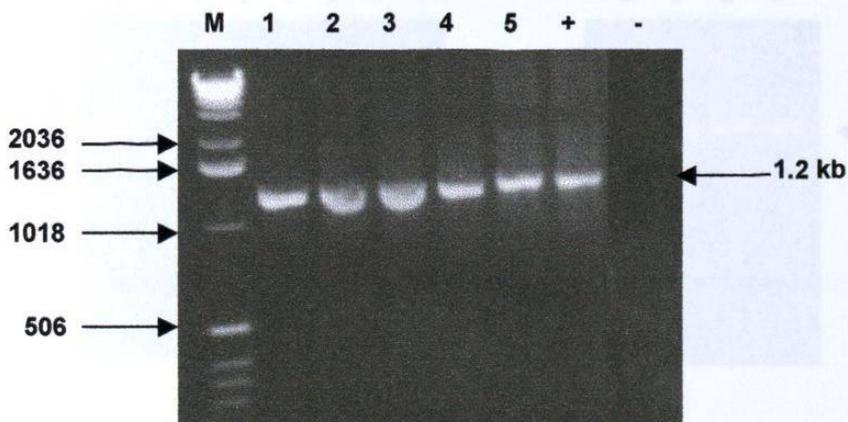


Fig 16b.- Amplificación del gene Env de VIH en ADN genómico de sangre periférica por PCR en nido (nested) en muestras de Jalisco. Gel agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio. Marcador de peso molecular (M), los carriles 1-5 corresponden a las muestras 7-11 de Jalisco y presentan un producto amplificado de 1.2 kb, y a los controles positivo (+) y negativo (-).

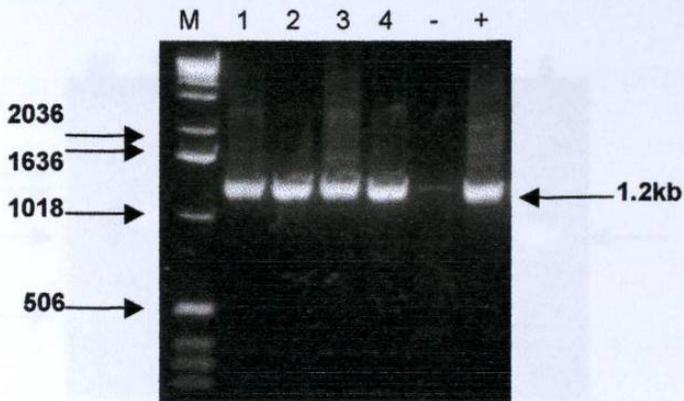


Fig. 17a.- Amplificación del gene Env de VIH en ADN genómico de sangre periférica por PCR en nido (nested) en muestras de Puebla. Gel agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio. Marcador de peso molecular 1 kb (M), los carriles 1-4 corresponden a las muestras 1-4 de Puebla y presentan un producto amplificado de 1.2 kb, control negativo (-) y control positivo (+).

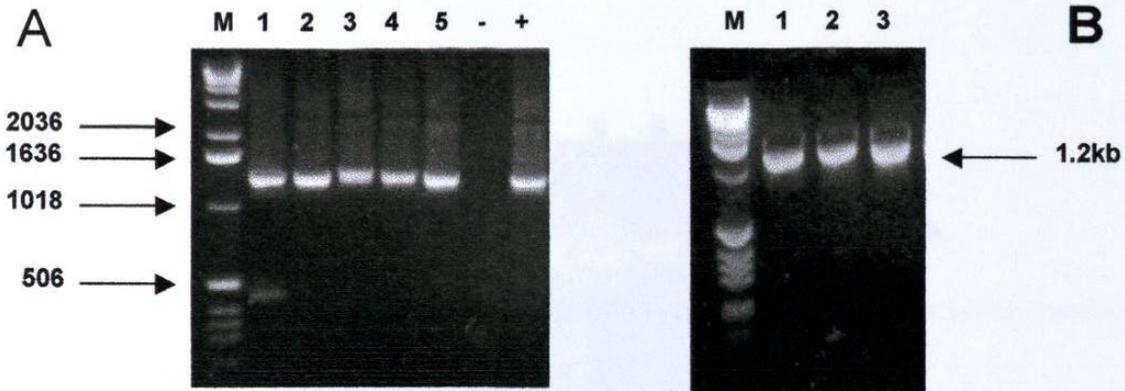


Fig.17b.- Amplificación del gene Env de VIH en ADN genómico de sangre periférica por PCR en nido (nested) en muestras de Puebla. Gel agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio. Marcador de peso molecular 1 kb (M), en el gel A, los carriles 1-5 corresponden a las muestras 5-9 de Puebla y a los controles negativo (-) y positivo (+) y en el gel B los carriles 1-3 corresponden a las muestras 10-12 de la ciudad de Puebla las muestras que se encuentran en ambos gels presentan un producto amplificado de 1.2 kb.

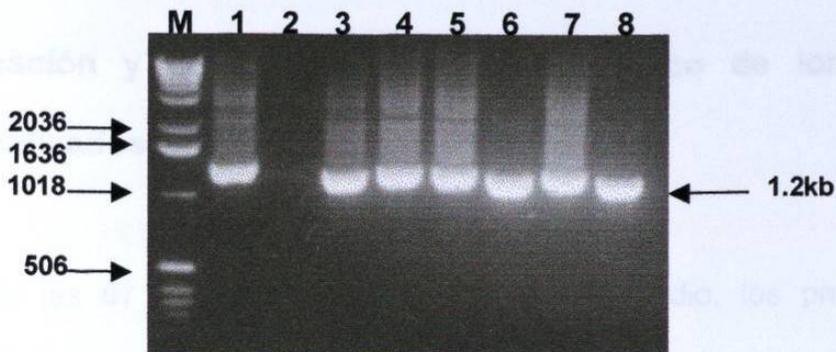


Fig.18a.- Amplificación del gene Env de VIH en ADN genómico de sangre periférica por PCR en nido (nested) en muestras de Yucatán. Gel agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio. Marcador de peso molecular 1 kb (M), los carriles 1-2 corresponden a los controles positivo (C+) y al negativo (C-) los carriles 3-8 corresponden a las muestras 1-6 de Yucatán que presentan un producto amplificado de 1.2 kb.

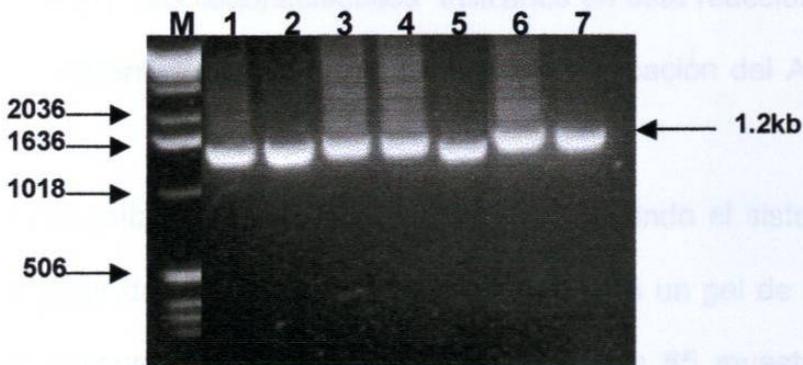


Fig18b.- Amplificación del gene Env de VIH en ADN genómico de sangre periférica por PCR en nido(nested) en Muestras de Yucatán. Gel agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio. Marcador de peso molecular 1 kb (M), los carriles 1-7 corresponden a las muestras 7-13 de Yucatán que presentan un producto amplificado de 1.2 kb.

4.3. Clonación y Obtención de ADN Plasmídico de los Productos Amplificados por PCR

En 65 de las 67 muestras analizadas en este estudio, los productos de la amplificación fueron clonados para caracterizar las secuencias de los nucleótidos en el vector TA pCR-2.

Para analizar las clonas positivas, se tomaron las colonias blancas y las cuales se cultivaron en el medio LB con ampicilina para posteriormente aislar el ADN plasmídico utilizando un estuche de QIAGEN; siendo este, el método alternativo para determinar si el plásmido contenía el inserto mediante una reacción de PCR. Los oligonucleótidos utilizados en esta reacción de PCR fueron Es7 y Es8, diferentes a los utilizados para la amplificación del ADN por PCR en nido (nested).

Para visualizar si el gene *Env* fue clonado usando el sistema de Vector T por PCR a partir de colonias transformadas, se utilizó un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio, observándose que las 65 muestras clonadas de ADN de los pacientes infectados con VIH, mostraron un producto amplificado de 700 pb, como se puede observar en las figuras 19 – 23, donde se muestra las amplificaciones por PCR a partir de colonias transformadas y minipreparación de ADN plasmídico para los cinco estados.

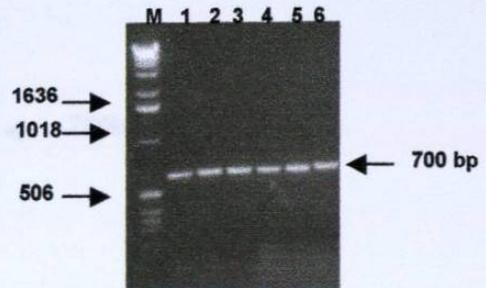
A**B**

Fig19a Determinación del gene Env clonado usando el sistema de Vector T por PCR a partir de colonias transformadas. Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. Marcador de peso molecular de 1kb (M). Los carriles 1-15 en la figura A son colonias transformadas que muestran un producto amplificado de 700 pb provenientes de las muestras 1-15 de la Ciudad de México y en la figura B se presenta el mismo producto amplificado de las muestras 16-21 en los carriles 1-6

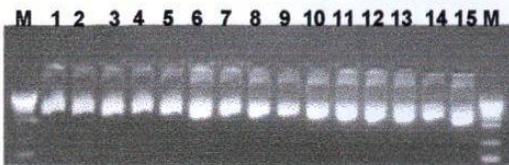
A**B**

Fig 19b .- Minipreparación de Plásmido obtenido de colonias transformadas con el Vector T y el producto de PCR de 700 pb . Marcador de peso molecular 1kb. Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. En la figura A en los carriles 1-15 se muestra el ADN plasmídico de las muestras 1-15 de la Ciudad de México y en la figura B se presenta en los carriles 1-6, el ADN plasmídico de las muestras 16-21

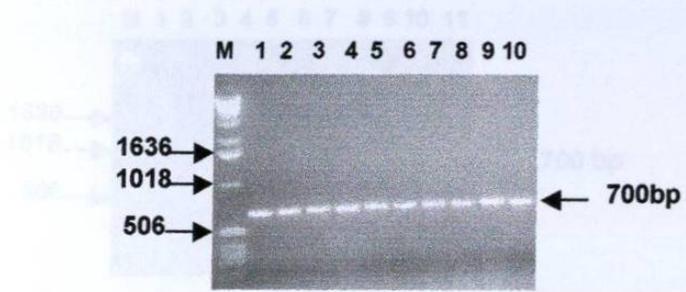


Fig 20a Determinación del gene Env clonado usando el sistema de Vector T por PCR a partir de colonias transformadas. Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. Marcador de peso molecular de 1kb (M). Los carriles 1-10 son colonias transformadas que muestran un producto amplificado de 700 pb provenientes de las muestras 1-10 del estado de Nuevo León



Fig 20b .- Minipreparación de Plásmido obtenido de colonias transformadas con el Vector T y el producto de PCR de 700 pb . Marcador de peso molecular 1kb (M). Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. En los carriles 1-10 se muestra el ADN plasmídico de las muestras 1-10 del estado de Nuevo León .

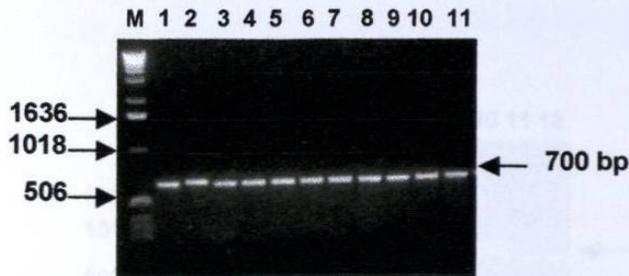


Fig 21a Determinación del gene Env clonado usando el sistema de Vector T por PCR a partir de colonias transformadas. Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. Marcador de peso molecular de 1kb (M). Los carriles 1-11 son colonias transformadas que muestran un producto amplificado de 700 pb provenientes de las muestras 1-11 del estado de Jalisco

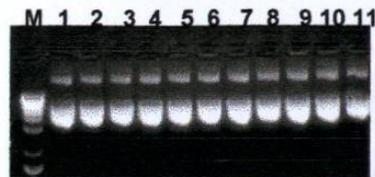


Fig 21b .- Minipreparación de Plásmido obtenido de colonias transformadas con el Vector T y el producto de PCR de 700 pb . Marcador de peso molecular 1kb (M). Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. En los carriles 1-11 se muestra el ADN plasmídico de las muestras 1-11 del estado de Jalisco.

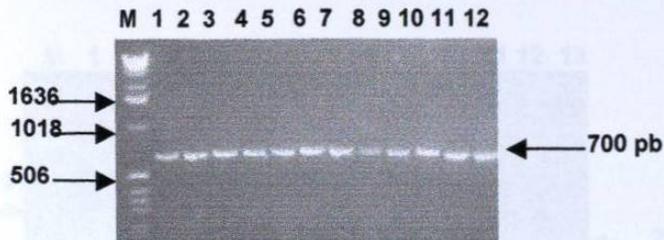


Fig22a- Determinación del gene Env clonado usando el sistema de Vector T por PCR a partir de colonias transformadas. Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. Marcador de peso molecular de 1kb (M). Los carriles 1-12 son colonias transformadas que muestran un producto amplificado de 700 pb provenientes de las muestras 1-12 del estado de Puebla.

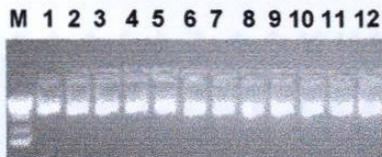


Fig 22b.- Minipreparación de Plásmido obtenido de colonias transformadas con el Vector T y el producto de PCR de 700 pb . Marcador de peso molecular 1kb (M). Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. En los carriles 1-12 se muestra el ADN plasmídico de las muestras 1-12 del estado de Puebla.



Fig23a- Determinación del gene Env clonado usando el sistema de Vector T por PCR a partir de colonias transformadas. Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. Marcador de peso molecular de 1kb (M). Los carriles 1-13 son colonias transformadas que muestran un producto amplificado de 700 pb provenientes de las muestras 1-13 del estado de Yucatán



Fig 23b.- Minipreparación de Plásmido obtenido de colonias transformadas con el Vector T y el producto de PCR de 700 pb . Marcador de peso molecular 1kb (M). Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio.En los carriles 1-13 se muestra el ADN plasmídico de las muestras 1-13 del estado de Yucatán

4.4. Secuenciación de Genes del VIH-1

A la región C2-V5 del gen *env* de cada una de las 35 muestras (amplificadas y clonadas) y dos muestras sin haberse clonado, se le determinó la secuencia de nucleótidos de ambas cadenas mediante el procedimiento enzimático establecido por Sanger, realizándose en un secuenciador automático ABI 373A (Applied Biosystems , Foster City, CA).

Las secuencias generales en este estudio correspondieron a las secuencias que presenta el virus subtipo B de referencia HXB2 en las posiciones 6594-7756 (26). Se analizaron clonas múltiples (hasta de 5), las cuales fueron secuenciadas para confirmar una capacidad única de la muestra, escogiéndose una clona por muestra para los análisis . Las secuencias de nucleótidos fueron ensambladas y editadas con el programa Sequencher v.3 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI).

En las figuras 24 y 25 se muestran el cromatograma de los nucleótidos pertenecientes al tetrapéptido del asa V3 y los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de secuenciación.

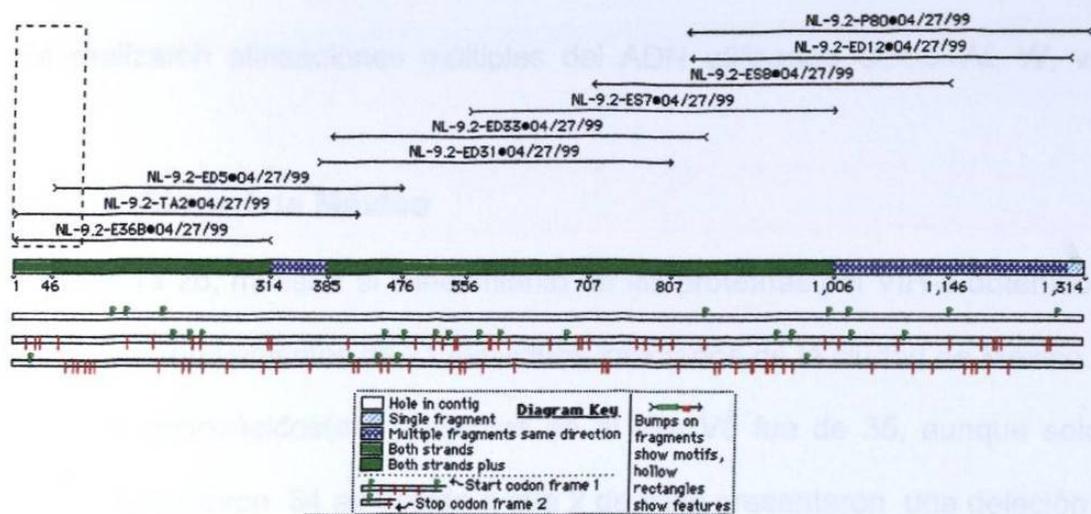


Fig 24.- Oligonucleótidos utilizados en la Secuenciación de genes de VIH-1. Las secuencias de los oligonucleótidos fueron ensambladas y editadas en un Sequencher v.3

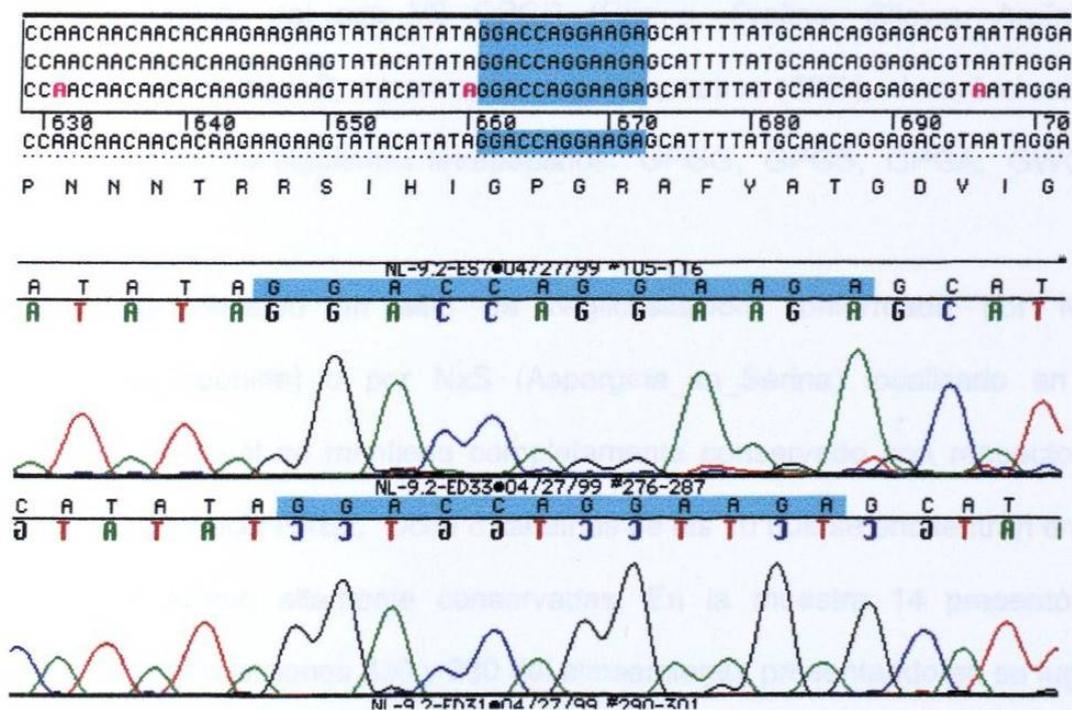


Fig 25 .- Cromatograma mostrando los nucleótidos pertenecientes al tetrapéptido GPGR del paciente de NL-9 clona 2.

4.4.1. Análisis del alineamiento

Se realizaron alineaciones múltiples del ADN utilizando CLUSTAL W, v.1.7 (20).

4.4.1.1. Ciudad de México

La figura 26, muestra el alineamiento de las proteínas del VIH-1 obtenido de las muestras provenientes de 21 individuos infectados de la ciudad de México. La cantidad de aminoácidos(aa) presentes en el asa V3 fue de 35, aunque solo 3 muestras presentaron 34 aa debido a que 2 de ellas presentaron una deleción en la posición 319 y la otra, en la posición 320 del alineamiento del gene env correspondiente a las proteínas del VIH-1 subtipo B de referencia HXB2.

El tetrapéptido del asa V3 GPGR (Glicina, Prolina, Glicina, Arginina) característico del subtipo B se conservó en 16 muestras (76%), observándose en las cinco restantes los siguientes tetrapéptidos: GPGG, GPGS, GPGA, GWGR, y APGR.

Sólo se observó un sitio de N-glicosilación conformado por NxT (Aspargina_aa_Treonina) o por NxS (Aspargina_aa_Serina) localizado en la posición 262, el cuál se mantiene completamente conservado con respecto al subtipo B de referencia HXB2. Ocho 8 cisteínas de las 10 que se encuentran en la región C2-V5, fueron altamente conservadas. En la muestra 14 presentó 2 mutaciones en las posiciones 330 y 380 del alineamiento, presentando en su lugar una Glicina y una Arginina respectivamente, la primera mutación se presentó en la segunda cisteína del asa V3.

4.4.1.2. Estado de Nuevo León.

La figura 27 muestra el alineamiento de las proteínas del VIH-1 obtenido de muestras provenientes de 10 individuos infectados del estado de Nuevo León. La cantidad de aminoácidos presente en el asa V3 fue de 35. El tetrapéptido del asa V3 GPGR (Glicina, Prolina, Glicina, Arginina) característico del subtipo B se conservó en 8 muestras (80%), presentándose en las otras dos los siguientes tetrapéptidos: GPGS y GPRR.

Se observaron cinco sitios de N-glicosilación conformado por NxT (Aspargina_aa_Treonina) o por NxS (Aspargina_aa_Serina) completamente conservados con respecto a las proteínas del gene *Env* del subtipo B de referencia HXB2, localizados en las posiciones 241, 262, 295, 301 y 45; mientras que en la posición 276 se localizó una región altamente conservado. Por otra parte, las 10 cisteínas presentes en la región C2-V5 están conservadas.

4.4.1.3. Estado de Jalisco.

La figura 28 muestra el alineamiento de las proteínas del VIH-1 obtenido de las muestras provenientes de 11 individuos infectados del estado de Jalisco. La cantidad de aminoácidos presentes en el asa V3 fue de 35; aunque 2 muestras presentaron 34 aa debido a que 2 de ellas (J 5 y J 11) tuvieron una delección en la posición 319 del alineamiento del gene *env* correspondiente a las proteínas del VIH-1 subtipo B de referencia HXB2. El tetrapéptido del asa V3 GPGR (Glicina, Prolina, Glicina, Arginina) característico del subtipo B fue conservado por 7 muestras (64%) presentando las cuatro restantes los siguientes tetrapéptidos: GPGK (2) HPGG, GPGS.

Solo se observaron tres sitios altamente conservados de N-glicosilación conformado por NxT (Aspargina_aa_Treonina) o por NxS (Aspargina_aa_Serina) localizados en las posiciones 301, 355 y 458 del alineamiento de las proteínas del gene *Env* del subtipo B de referencia HXB2, así como 10 cisteínas conservadas en la región C2-V5.

4.4.1.4. Estado de Puebla.

La figura 29 muestra el alineamiento de las proteínas del VIH-1 obtenido de las muestras provenientes de 11 individuos infectados del estado de Puebla. La cantidad de aminoácidos presentes en el asa V3 fue de 35. El tetrapéptido del asa V3 GPGR (Glicina, Prolina, Glicina, Arginina) característico del subtipo B fue se conservó por 9 muestras (75%) mientras en las otras tres se observaron los siguientes tetrapéptidos: GPGS(2) y RPGR.

Solo se observó un sitio de N-glicosilación conservado completamente, conformado por NxT (Aspargina_aa_Treonina) o por NxS (Aspargina_aa_Serina) localizado en las posiciones 241 del alineamiento correspondiente a las proteínas del gene env del subtipo B de referencia HXB2 y otros dos localizados en las posiciones 262 y 301 que fueron altamente conservados.

Además, sólo nueve de las 10 cisteínas presentes en la región C2-V5 se observaron conservadas, mientras la cisteína localizada en la posición 423 presentó una mutación por Tirosina.

4.4.1.5. Estado de Yucatán.

La figura 30 muestra el alineamiento de las proteínas del VIH-1 obtenido de las muestras provenientes de 11 individuos infectados del estado de Yucatán. La cantidad de aminoácidos presente en el asa V3 fue de 35 excepto la muestra Y2 que presenta una inserción de Prolina en la posición 310, lugar previo al tetrapéptido GPGR, presentaron delecciones en la posición 320 las muestras Y7, Y8, Y11. El tetrapéptido del asa V3 GPGR (Glicina, Prolina, Glicina, Arginina) característico del subtipo B se conservó en 7 de las 13 muestras analizadas (54%), observándose en las seis restantes los siguientes tetrapéptidos: GPGG(2), GPEG, GPGS y APGR(2). Se observó solo un sitio de N-glicosilación completamente conservado, conformado por NxT (Aspargina_aa_Treonina) o por NxS (Aspargina_aa_Serina) localizados en las posiciones 262 del alineamiento correspondiente a las proteínas del gene *Env* del subtipo B de referencia HXB2 y otros dos localizados en las posiciones 241 y 276 que fueron altamente conservados. Por otra parte, nueve de 10 cisteínas presentes en la región C2-V5 se mantienen conservadas, mientras que en la muestra Y12, la cisteína localizada en la posición 45 presentó una mutación por Arginina .

Al analizar las secuencias de cada estado a lo largo de la región C2-V5, encontramos que el tetrapéptido GPGR (Glicina-Prolina-Glicina-Arginina), el cual es predominante en el subtipo B del VIH-1, fue conservado en 47 (70%) de las muestras estudiadas. Fueron observadas un 30% de mutaciones en esta región: GPGS (6 casos) GPGG (3), APGR (3), GPGK (2), GPGA (1), GPRR (1), HPGG (1), RPGR (1) GPEG (1) y GWGR (1). (Tabla 6-7 y figura 31a-b)

