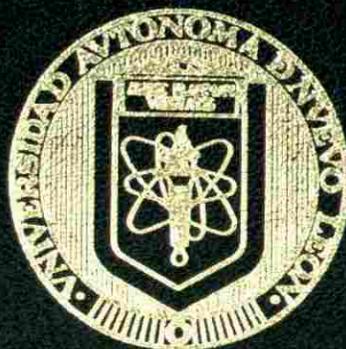


**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DEL VIH-1 EN MEXICO**

**PRESENTADA  
POR**

**M.C. LYDIA GUADALUPE RIVERA MORALES**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER  
EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS CON  
ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA**

**SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L., MEXICO  
ENERO DEL 2000**

**TD**

**RC607**

**.A26**

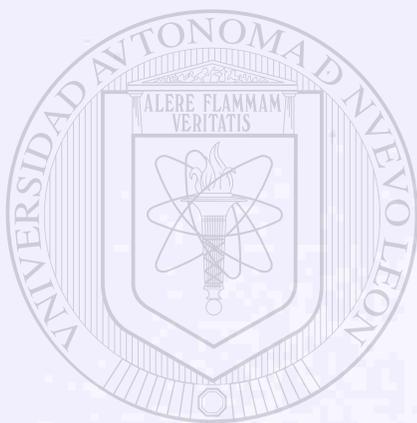
**R5**

**2000**

**c.1**



1080124472



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DEL VIH-1 EN MEXICO**

**UANL**

**PRESENTADA**

**POR**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**



**DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS**

**M. C. LYDIA GUADALUPE RIVERA MORALES**

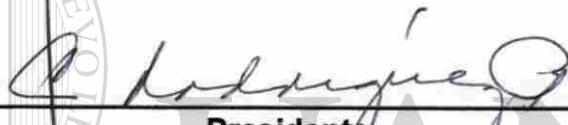
**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER  
EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS CON  
ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA**

**SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L., MEXICO; ENERO DEL 2000**

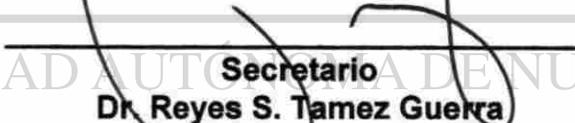
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**COMISIÓN DE TESIS**



**Presidente**  
**Dra. Cristina Rodríguez Padilla**



**Secretario**  
**Dr. Reyes S. Tamez Guerra**



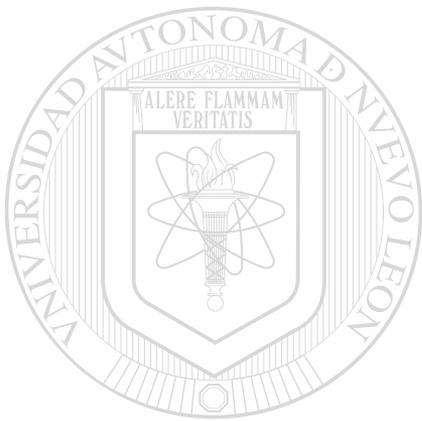
**Vocal**  
**Dr. Juan Manuel Alcocer González**

**Asesor Externo**  
**Dr. José Roberto Trujillo**

**Co-director externo**  
**Dr. Max Essex**

**SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L., MEXICO; ENERO DEL 2000**





# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS





**Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL y en el Departamento de Inmunología y Enfermedades Infecciosas de la Universidad de Harvard.**

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



## DEDICATORIA

### **A DIOS NUESTRO SEÑOR**

Porque me asignaste esta misión en mi vida, servir a los demás con mi trabajo, te lo ofrezco Señor con Humildad

### **A mis Padres**

**Luis Alberto Rivera Flores y Ma. Guadalupe Morales Casas†**

por su ejemplo y el gran amor que me han dado y me dieron en la vida.

### **A mi esposo Juan Manuel Adame Rodríguez**

No tengo palabras para agradecerte el apoyo incondicional que me brindaste en este año tan difícil para nosotros.

Por tu amor, confianza, tiempo y esfuerzo, Mil Gracias

### **A mis Hijos:**

Fuente de inspiración y energía que me permitió realizar este trabajo, gracias por su comprensión.

**Lydia Marcela** como hija mayor diste la prudencia, **Melissa Guadalupe**, con tu comentario "cada día que pasa es un día menos para que regrese Mamá" aportaste la esperanza, a **Juan Manuel** sin duda tu alegría y optimismo me ayudó a terminar.

## AGRADECIMIENTOS

### **Al Dr. Reyes S. Tamez Guerra y a la Dra. Cristina Rodríguez Padilla**

por creer y confiar en mi, mi respeto y amistad para ustedes, les estoy infinitamente agradecida por haberme dado la gran oportunidad de conocer ambientes de alto nivel académico e investigación, lo cual sin duda es una aspiración de los que disfrutamos de nuestra vocación y trabajo universitario

### **Al Dr. Max Essex**

por aceptarme dentro de su grupo de trabajo en el Departamento de Inmunología y Enfermedades Infecciosas de la Escuela de Salud Pública de Harvard. Gracias por su confianza., mi admiración y respeto

### **Al Dr. Vladimir Novitsky**

Por su apoyo y asesoría constante

### **Al Dr. Roberto Trujillo y a su familia Ellein, Jackie, Dany**

por su apoyo y amistad

### **Por su Apoyo incondicional en la Cristalización de este escrito, Mil Gracias**

M C Juana María Reyna Reyes, Dr. J.Gerardo Velazco Castañón, Biol. Gerardo Ramos Alfano, Q.B.P. Itza Luna Cruz, Q.B.P.Laura S. Hernández.

### **Por su asesoría y apoyo**

Dr.Javier Ramos Jiménez, Dr. Juan Manuel Alcocer González, Dr Roberto Montes de Oca y Dr. Ricardo Gómez

### **A la División de Estudios de Postgrado**

**Dra. Julia Verde Star**, por su apoyo otorgado durante la obtención de los créditos académicos y la realización de este grado.

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A CONACYT**

Por haberme otorgado una beca doctoral que ha permitido lograr la obtención de este grado

### **Amis hermanos.**

**Paty, José Alberto y Antonio Rivera Morales,** por su comprensión y cariño.

### **A mis Tías:**

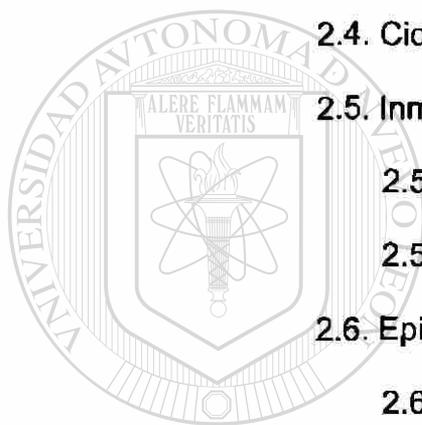
Gracias por su ayuda y apoyo constantes.

**A lo largo de los últimos tres años tomé decisiones trascendentes en mi vida, ello implicó cambios y con estos las personas con las que he trabajado, dedico este esfuerzo a mis amigos de la Facultad de Medicina, del Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas, del Departamento de Inmunología y Enfermedades Infecciosas y del Instituto de SIDA de la Escuela de Salud Pública de la Universidad de Harvard**

**Gracias  
Lydia**

# INDICE

<b>Capítulo 1</b>	<b>IMPORTANCIA Y ORIGINALIDAD</b>	<b>1</b>
<b>Capítulo 2</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	
	2.1. Origen e Historia del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida	3
	2.2. Características de los Retrovirus.	5
	2.3. Estructura Viral y Genética	7
	2.4. Ciclo de vida del VIH-1	12
	2.5. Inmunopatogénesis de la infección por HIV-1	17
	2.5.1. Características Clínicas de la infección	21
	2.5.2. Respuesta inmune al VIH	26
	2.6. Epidemiología	
	2.6.1. Epidemiología del VIH/SIDA a nivel Mundial y en México	30
	2.6.2. Subtipos de VIH-1	37
	2.7. Hipótesis	41
	2.8. Objetivos	41
<b>Capítulo 3</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	
	3.1. Muestras de individuos infectados con VIH	42
	3.2. Obtención de ADN	46
	3.3. Amplificación de las Secuencias del VIH-1 por PCR	48
	3.4. Clonación de los productos amplificados del virus por PCR	51



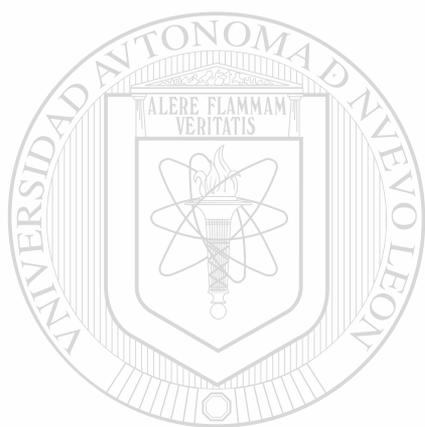
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3.4.1. Reacción de ligación con el sistema TOPO TA clonng	51
3.4.2. Transformación de <i>E. Coli</i>	52
3.4.3. Obtención del ADN Plasmídico	54
3.5. Secuenciación de Genes del VIH-1	56
3.5.1. Precipitación con Etanol	58
3.6. Análisis Filogenético y Estadístico	59

## **Capítulo 4 RESULTADOS**

4.1. Obtención de ADN de 67 muestras obtenidas de pacientes infectados con VIH-1	60
4.2. Amplificación de las Secuencias del VIH-1 por PCR	66
4.3. Clonación y Obtención de ADN Plasmídico de los Productos Amplificados por PCR	72
4.4. Secuenciación de Genes del VIH-1	78
4.4.1. Análisis del alineamiento	
4.4.1.1. Ciudad de México	80
4.4.1.2. Estado de Nuevo León.	82
4.4.1.3. Estado de Jalisco.	84
4.4.1.4. Estado de Puebla.	86
4.4.1.5. Estado de Yucatán.	88
4.5. Análisis Filogenético y Estadístico de Todas las muestras provenientes de 5 estados.	90

<b>DISCUSIÓN</b>	<b>105</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>113</b>
<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>115</b>



UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

# CAPÍTULO 1

## IMPORTANCIA Y ORIGINALIDAD

El Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), es considerada como una pandemia que al igual que otras enfermedades requiere del diagnóstico, vigilancia y tratamiento efectivos. En la actualidad ésta se encuentra en una fase impredecible e inestable, tan sólo en 1999 se infectaron 5.6 millones de individuos, llevando a un total global de 33.6 millones, se conoce que a finales de 1999 habrá cerca de 50 millones de individuos que han sido infectado con el VIH, de los cuales 16 millones ya han fallecido.

En México, al igual que en el resto de los países del mundo, El VIH/SIDA se ha convertido en un serio problema de salud pública, con múltiples repercusiones psicológicas, sociales, éticas, morales, religiosas, económicas y políticas. Al 30 de septiembre de 1999, los casos diagnosticados en el país suman 40,743 casos de SIDA ya desarrollado, sin tomar en cuenta el 35% en el retraso en la notificación y el 18.5% en el subregistro, lo que nos da un total estimado de 62, 540 casos. Se estima que 187,621 están viviendo con el VIH sin haber presentado todavía las manifestaciones clínicas de la enfermedad.

Esta infección se ha venido incrementando en el país con una relación estimada de 3,000 a 4,000 casos por año, se estima que 37 mil 524 ya han fallecido. En México el SIDA es la tercera causa de muerte en el ámbito nacional entre hombres de 25 a 34 años y la sexta entre mujeres de esa misma edad.

A pesar de todos los esfuerzos que se han hecho para difundir los conocimientos de los aspectos epidemiológicos, de diagnóstico, tratamiento y prevención, el número de casos reales es mayor que el informado por las autoridades; por lo tanto, las consecuencias socioeconómicas son mucho más graves.

El VIH-1, es un virus que experimenta una alta variación genética, ésta, causa cambios en el tropismo, virulencia y transmisión de la infección. Nuevas variantes y/o subtipos del VIH-1 se encuentran circulando, con un amplio rango de propiedades de virulencia y transmisión que están surgiendo y dispersándose alrededor del mundo en una forma alarmante.

Por lo tanto, una adecuada vigilancia epidemiológica para el VIH/SIDA, así como el conocer, caracterizar y analizar el subtipo predominante, su diversidad genética en nuestro país deben de ser evaluadas en un esfuerzo para definir los patrones de distribución geográfica, para comprender la problemática sobre su diseminación, epidemiología, sobre el desarrollo de antivirales y sobre todo el diseño de vacunas.

## CAPITULO 2

### INTRODUCCIÓN

#### 2.1. Origen e Historia del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida

El SIDA fue reconocido como una nueva y distinta entidad clínica en 1981.(1,2)

Los primeros casos fueron reconocidos por un grupo de enfermedades inusuales como la neumonía ocasionada por *Pneumocystis carinii* o el Sarcoma de Kaposi que se presentaron en hombres homosexuales jóvenes(3) además, de que fue observado un patrón de inmunodeficiencia clínica. Como la mayoría de estos casos estaba relacionado a este tipo de individuos, este síndrome podría estar relacionado al estilo de vida de este grupo de población. Los casos de SIDA fueron inmediatamente reportados en otro grupo de población incluyendo drogadictos y hemofílicos, aunque estos grupos pudieron no estar expuestos a dosis inmunoestimuladoras de esperma extraño como los homosexuales, sino a exposición frecuente de ciertos antígenos tisulares o a proteínas extrañas. En el caso de los hemofílicos habían recibido factores de la coagulación obtenido de un conjunto de plasma obtenido de una gran cantidad de donadores mientras que los los drogadictos, por compartir jeringas contaminadas con pequeñas cantidades de sangre provenientes de otro drogadicto.(4) Posteriormente esta enfermedad fue observada en individuos que habían recibido alguna transfusión sanguínea(5,6) y en niños provenientes de madres que tenían la enfermedad o que eran drogadictas.(7-9) Otro aspecto importante que presentaron todos estos pacientes fue la disminución de sus linfocitos T cooperadores.(10)

En un principio se pensó que el agente causal de esta enfermedad pudo haber sido un microorganismo más virulento que haya mutado o bien una variante genética recombinante, se presumía que el agente causal era el virus de la Hepatitis B, porque se encontró en una gran proporción de homosexuales y también en aquellos que habían recibido alguna transfusión, de igual manera, se pensaba que era el virus Epstein-Barr porque era un virus linfotrópico e incluso también fue relacionada esta enfermedad al Citomegalovirus porque estaba asociada a una inmunosupresión.

Essex(11), Gallo(12) y Montagnier(13) postularon que el agente causal podría ser una variante de un retrovirus linfotrópico de las células T (HTLV). Entre las razones de esto era que el HTLV, descubierto por Gallo en 1980, fue el único virus humano capaz de infectar a las células T cooperadoras, además que es también transmitido por las mismas vías que el agente causal del SIDA: sexual, por vía sanguínea y por transmisión vertical (madre a hijo). El nombre que posteriormente recibió el virus fue el de Virus de Inmunodeficiencia Humana tipo 1<sup>®</sup> (VIH-1), al que en un principio se le conoció como HTLV-III o Virus Asociado a Linfadenopatía (LAV).

Después que el VIH-1 fue reconocido como el agente causal del SIDA, se cuestionó la posibilidad de que este virus tuviera su origen en Africa al igual que el HTLV-1. Posteriormente muestras de suero colectadas de individuos africanos, en periodos tempranos (1955-1965) fueron examinados para la presencia de anticuerpos reactivos para los componentes del VIH-1, encontrándose una

muestra positiva(14), que fue reactiva para todos los componentes antigénicos mayores del VIH-1: gp160, gp120, gp41, p 55, p24 y p 17.

## 2.2. Características de los Retrovirus.

En base a sus características genéticas y antigénicas se pueden distinguir dos tipos de Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) el tipo 1 y el tipo 2. El primero fue identificado como el agente etiológico de la epidemia del SIDA en Estados Unidos, Europa, África Central y en la mayoría de otros países del mundo y es considerado como el causante de la pandemia actual (1,2) y el segundo, es endémico en África occidental, el cuál fue inicialmente identificado por serología y subsecuentemente identificado por aislamientos virales (3,4) y el más relacionado al virus de la inmunodeficiencia del simio (SIVmac).(4)

El VIH 1 y 2, se diferencian en su estructura genómica y su antigenicidad, con sólo un 50% de homología en sus genes; ambos pertenecen a la familia *Retroviridae*, un grupo de virus pequeño, que poseen envoltura y además un genoma ARN, su nombre se debe al hecho de que el proceso de transcripción se realiza en dirección inversa (ARN a ADN) antes de que se incorpore al genoma de las células del huésped y se inicie la replicación viral, este paso retrógrado esencial es dependiente de una enzima viral llamada transcriptasa en reversa.(5,6)

Los retrovirus pertenecen a la subfamilia de los *Lentivirinae*, la cuál tiene virus representativos en los gatos, carneros, caballos y cabras. Los Lentivirus son exógenos, no oncogénicos, causan infecciones persistentes con largos

períodos de incubación. Estos virus generalmente infectan células del sistema inmune como los macrófagos y las células T, produciendo efectos citopáticos como la formación de sincitios y muerte celular(5,6) Las infecciones lentivirales no son eliminadas del organismo fácilmente por el sistema inmune y su daño se acumula por muchos años, esta importante característica es reflejada en el nombre de la subfamilia *lenti* que significa lento.

Los lentivirus pueden causar inmunosupresión, enfermedades neurológicas, artritis, anemia y neumonía. La tabla No. 1 enlista a los virus representativos de esta familia. (5,6)

**Tabla 1. Virus Representativos de la Familia Retroviridae  
Subfamilia Lentivirinae**

SUBFAMILIA	GRUPO	VIRUS REPRESENTATIVOS	ENFERMEDAD OCACIONADA
Lentivirinae	Lentivirus	VIH-1	SIDA
		VIH-2	SIDA
		Virus de Inmunodeficiencia del felino	SIDA
		Virus VISNA	Enfermedad neurológica
		Virus de la Anemia Infecciosa del Equino	Anemia
		Virus de la Encefalitis-Artritis del caprino	Artritis y encefalitis

### 2.3. Estructura Viral y Genética

El VIH-1 es un virus que mide aproximadamente 100 nm de diámetro, se caracteriza por estar formado por un genoma de ARN, constituido por 2 cadenas idénticas cada una de 9.8 kb de longitud, empaquetadas dentro de un núcleo de proteínas virales rodeadas de una envoltura formada por una bicapa lipídica derivada de la membrana celular del huésped. ( 1-3 ) (Figura 1)

Al igual que todos los retrovirus, el VIH comparte la disposición genómica básica característica de todos los retrovirus conocidos, que incluyen los siguientes elementos: al final de cada genoma se encuentran las secuencias llamadas LTR o Repeticiones Terminales Largas que regulan la integración viral en el genoma del huésped y la expresión génica del virus, tres genes estructurales: Gag, Pol y Env. Seis genes accesorios: tat, rev, nef, vif, vpr, y vpu para el VIH-1 o vpx para el VIH-2, estos genes son capaces de regular la replicación viral y la infectividad.(1-3) (Figura 2)

La región genómica *gag* codifica para las proteínas de la cápside, es un precursor intracelular p55kd, que por acción de una proteasa viral se convierte en pequeñas proteínas constitutivas del núcleo p24, p17, p7 y p6. El precursor *gag* p55 kd es llamado también assemblina para indicar su papel en el ensamblaje del virus.(4)

El gene *pol* codifica para una proteína precursora, que es escindida para formar las enzimas virales: transcriptasa en reversa, proteasa, ribonucleasa e integrasa. Las proteínas transcriptasa en reversa e integrasa son necesarias para

producir una copia de ADN del genoma viral ARN e integrarlo como un provirus en el genoma del huésped.

La región genómica *env*, codifica para un precursor polipéptido glicosilado gp160 kd, la cual es procesada por una proteasa para generar las siguientes glicoproteínas presentes en la membrana, la gp120 presente en el exterior del virus y la gp41 en la transmembrana (Figura 1), las cuales se mantienen unidas después del rompimiento por interacciones no covalentes,(1-6) siendo ambas moléculas cruciales para la infectividad virus.

Los genes *Tat* y *Rev* son factores reguladores de la expresión genética del VIH. E gen *Tat* es un transactivador transcripcional necesario para la replicación del VIH-1,(5,6) de las proteínas accesorias; *Vif* es un pólipéptido de 23 kd que promueve la infectividad viral pero no la producción de las partículas del virus.(5,6) La proteína accesorio *Vpr* (proteína viral R) es el producto de un gene de 14 kd que confiere crecimiento rápido a los virus que expresan esta proteína, esta proteína es homóloga a la proteína *Vpx* presente en VIH-2/VIS agm. (5,6)

La proteína *Vpu* (proteína viral U) es una proteína única para el VIH-1 y no hay proteínas análogas en el VIH-2, esta proteína permite una liberación eficiente de los virus de la membrana plasmática de las células infectadas por el VIH-1.(5,6) La proteína *Nef*, es la proteína accesorio más inmunogénica, es una de las primeras proteínas del VIH en ser producida en las células infectadas, ha mostrado que tiene múltiples actividades, entre ellas, downregulación de la expresión de CD4 en la superficie de las células y causa perturbación de la activación de las células T y participa además, en la estimulación de la infectividad

viral (5). Véase la figura 2 en donde se esquematiza la organización genómica del virus y en la tabla 2 donde se enlistan algunas características de estos genes.

**Tabla 2. Genes y Proteínas del VIH**

NOMBRE	TAMAÑO	FUNCIÓN	LOCALIZACIÓN
Gag MA	P 17	Interacción con env Transporte nuclear del core viral	virus
Gag CA	P 24	Cápside del núcleo	Virus
Gag NC	P7	Nucleocápside, se une al ARN	Virus
Gag NC	P6	Se une al Vpr	Virus
Proteasa	P15	Maduración y clivaje Gag/Pol	Virus
Transcriptasa en reversa	P66 P51	Transcripción en reversa Actividad de ARN ase H	Virus
Integrasa		Integración del ADN proviral	Virus
Env	Gp120 Gp41	Unión al receptor CD4	Envoltura del virus Membrana plasmática
Tat	P16 P14	Transactivador Transcripcional viral	Núcleo/nucleolo
Rev	P19	Transporte de ARN Factor de estabilidad	Núcleo/nucleolo Puente entre núcleo y Citoplasma
Vif	P23	Promueve la maduración del virus y la infectividad	Citoplasma Virus
Vpr	P10-15	Promueve la localización nuclear del complejo de preintegración Inhibe la división celular	Virus y núcleo
Vpu	P16	Promueve la liberación extracelular de las partículas virales	Proteína integral de membrana
Nef	P27-p25	Downregulación de CD4	Membrana plasmática, citoplasma

Tomado de Korber et al.(2)

**Figura 1 . Representación esquemática de la estructura del VIH-1**

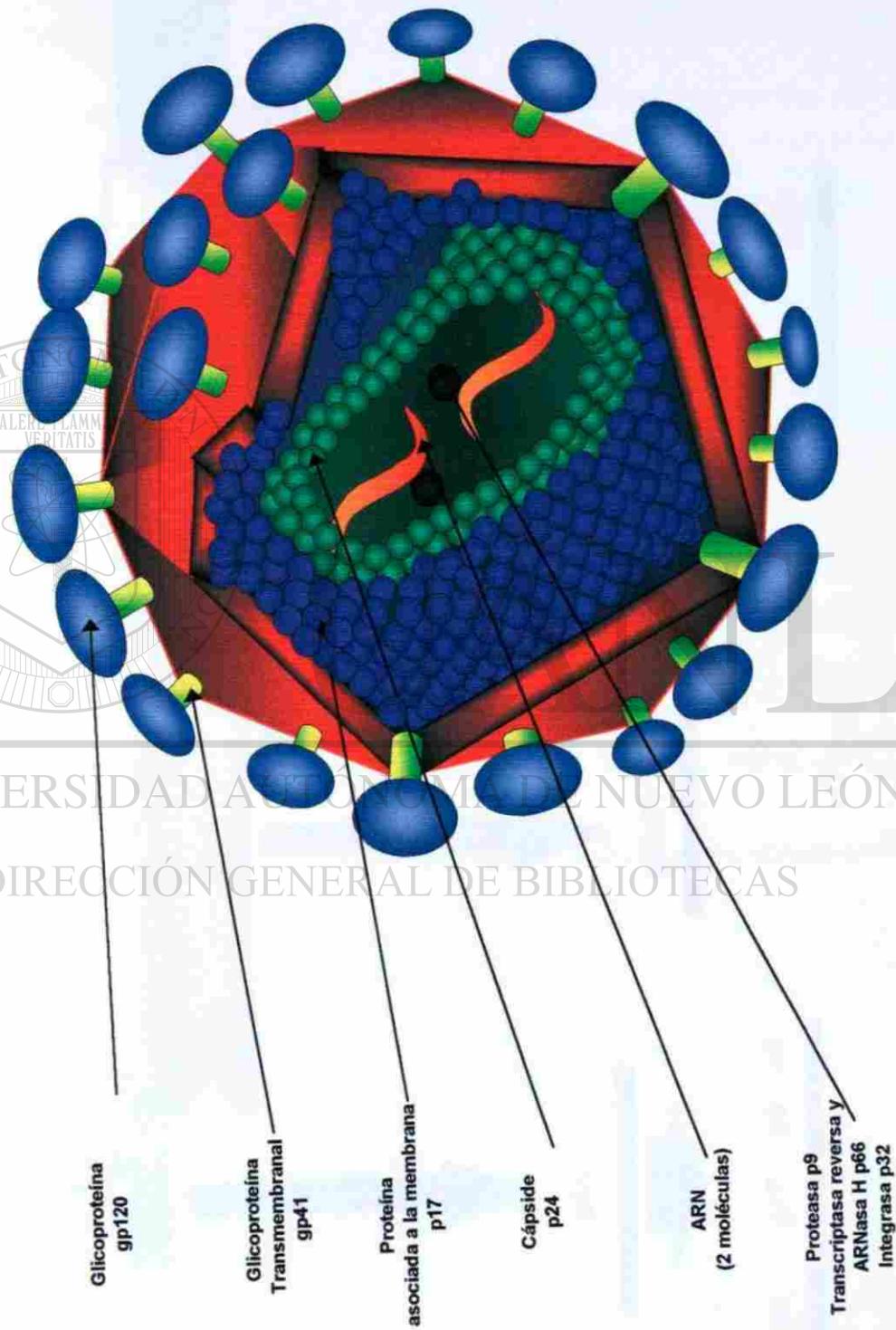
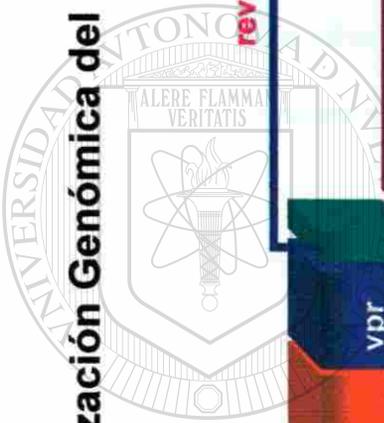
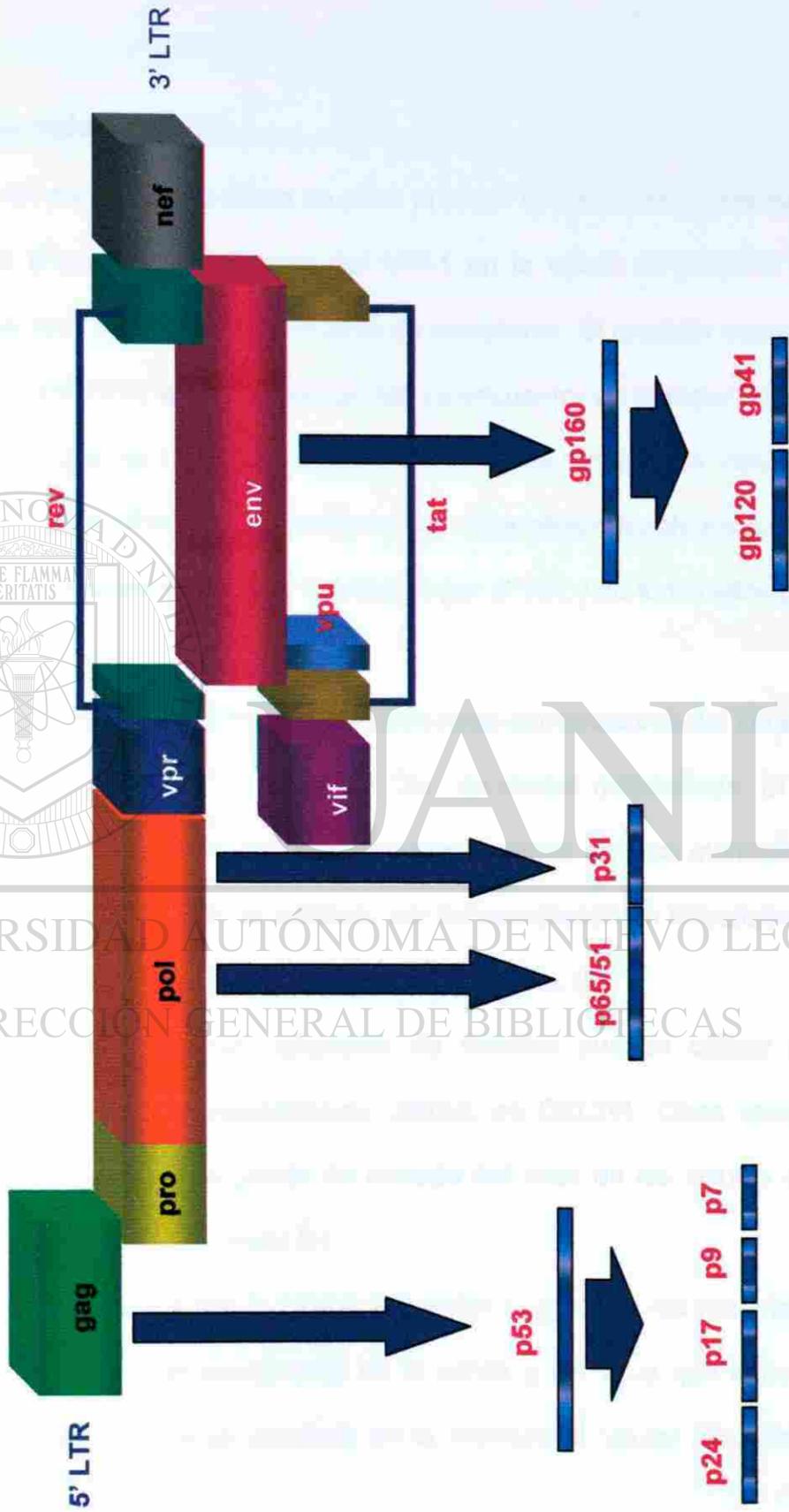


Figura 2. Organización Genómica del VIH-1



## 2.4. Ciclo de vida del VIH-1

Para que el VIH penetre en la célula se debe producir la fusión de las membranas viral y celular (Figura 3). La entrada del VIH-1 en la célula se produce por la interacción del virus con al menos dos tipos de receptores. El receptor específico y común a todos los VIH-1 es una proteína que se encuentra en la superficie de las células diana y que se denomina molécula CD4. Las principales células que poseen este receptor CD4 son los linfocitos y los monocitos/macrófagos aunque *in vitro* otros tipos celulares pueden ser infectados por el VIH y no todos ellos poseen la molécula CD4.(1-4)

Más recientemente se han caracterizado otros correceptores del virus como son los receptores celulares del tipo CC o CXC de ciertas quimiocinas. El CCR5 es el correceptor para las cepas del VIH con tropismo por los monocitos (M-tropic), mientras que el CXCR4 es utilizado por las que presentan linfocitotropismo (T-tropic); este receptor CXC también se denomina fusina. (5)

Se cree que las cepas inductoras de sincitios pueden utilizar ambos correceptores, aunque fundamentalmente utilicen los CXCR4. Otros receptores como el CCR3 podrían ser la puerta de entrada del virus en las células que no expresan los anteriores receptores.( 6 )

Una vez que tiene lugar la interacción entre la gp120 y los receptores se produce la fusión entre las membranas de la célula y del virus que tiene como responsable a la gp41 que se insertará en la membrana celular permitiendo la

internalización de la nucleocápside del virus y la desencapsidación de su genoma  
(7)

Tras la entrada del genoma viral, se inicia la replicación del virus por transcripción inversa o retrotranscripción mediada por la transcriptasa inversa del virus y que conduce a la formación de la primera cadena del ADN usando el ARN viral como molde(1,6,8)

La síntesis de la segunda cadena complementaria del ADN requiere la acción de la ribonucleasa H. La doble cadena así generada es integrada por medio de la integrasa viral en el genoma de la célula, aunque parte del ADN formado puede persistir en el citoplasma de la célula sin integrarse dentro del genoma celular.(1,6,8) Se cree que en los linfocitos este ADN no integrado podría producirse por la entrada de múltiples viriones en la célula; se sabe que la copia del material genético del VIH como ADN se almacena en el citoplasma de la célula (latencia preintegración) y se va integrando en los cromosomas de la célula a medida que pasa el tiempo o bien como consecuencia de estímulos sobre la célula. La integración del ADN proviral en el genoma celular puede depender del estado de activación de la célula.(1,8)

El proceso de retrotranscripción y de integración no solo dependen de los factores del VIH ya que en ellos juega un papel importante la propia activación celular. Una vez integrado en el material genético de la célula el provirus puede permanecer latente o empezar un proceso de replicación de una forma limitada o de una forma masiva, en cuyo caso ocasionará efectos citopáticos sobre la célula

mientras que en la latencia, producida tras la integración del provirus, no se producen alteraciones patológicas.(6)

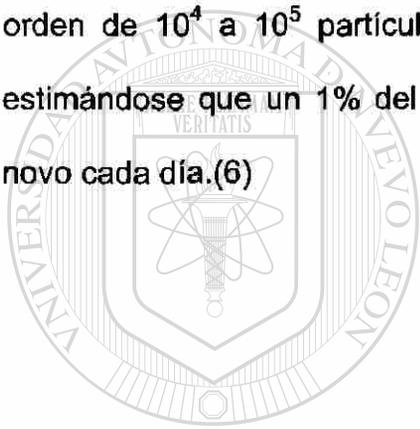
Diferentes factores, como exposición a antígenos, mitógenos, citoquinas o virus heterólogos pueden activar la célula y producir una cascada de fenómenos que inducen la expresión del genoma viral; estos factores, entre los que el NF-Kb es el principal factor regulador que induce el proceso de transcripción del VIH a partir de su estado de latencia, llevan a una nueva transcripción que supone la síntesis de ARNm del virus a partir del ADN proviral integrado en la célula. Este ARN se sintetiza como un único transcrito que debe ser transportado al citoplasma de la célula para procesarse en transcritos separados de diversos tamaños y en los que son de fundamental importancia las proteínas Tat y Rev.(6)

Se piensa que el resto de acontecimientos requieren señales específicas sin las que sólo se forman partículas virales inmaduras sin ARN viral. El ensamblaje del core ocurre en la membrana celular y parece comenzar con la asociación de la proteína p17 de la matriz con el dominio citoplasmático de la proteína gp41. También parece que el clivaje de las proteínas del core se produce a partir de poliproteínas precursoras durante la formación de la partícula y después de ella. La síntesis de las proteínas de la envoltura viral se producen en el retículo endoplásmico de la célula huésped a partir de la gp160; ésta en el aparato de Golgi es escindida por una proteasa para producir gp120 y gp41 antes de transportarlas a la superficie de la célula.(1,6,8 )

La estructura del virión maduro incluye una membrana, que sostiene las proteínas virales gp120 y gp41, además de varias proteínas celulares, un core que

contiene ARN viral, transcriptasa inversa e integrasa. Otras proteínas no son empaquetadas en los viriones y sólo toman parte en los pasos que preceden a la liberación de los virus.(1)

Se piensa que la vida libre de los viriones es muy corta, aproximadamente de 8-12 horas, y que en 2,6 días se realiza un ciclo viral completo con salida desde la célula infectada, vida libre, entrada a otra célula, replicación intracelular y salida de viriones maduros. Se ha calculado que cada célula infectada produce del orden de  $10^4$  a  $10^5$  partículas virales muchas de las cuales son defectuosas, estimándose que un 1% del total de los linfocitos del organismo se infectan de novo cada día.(6)



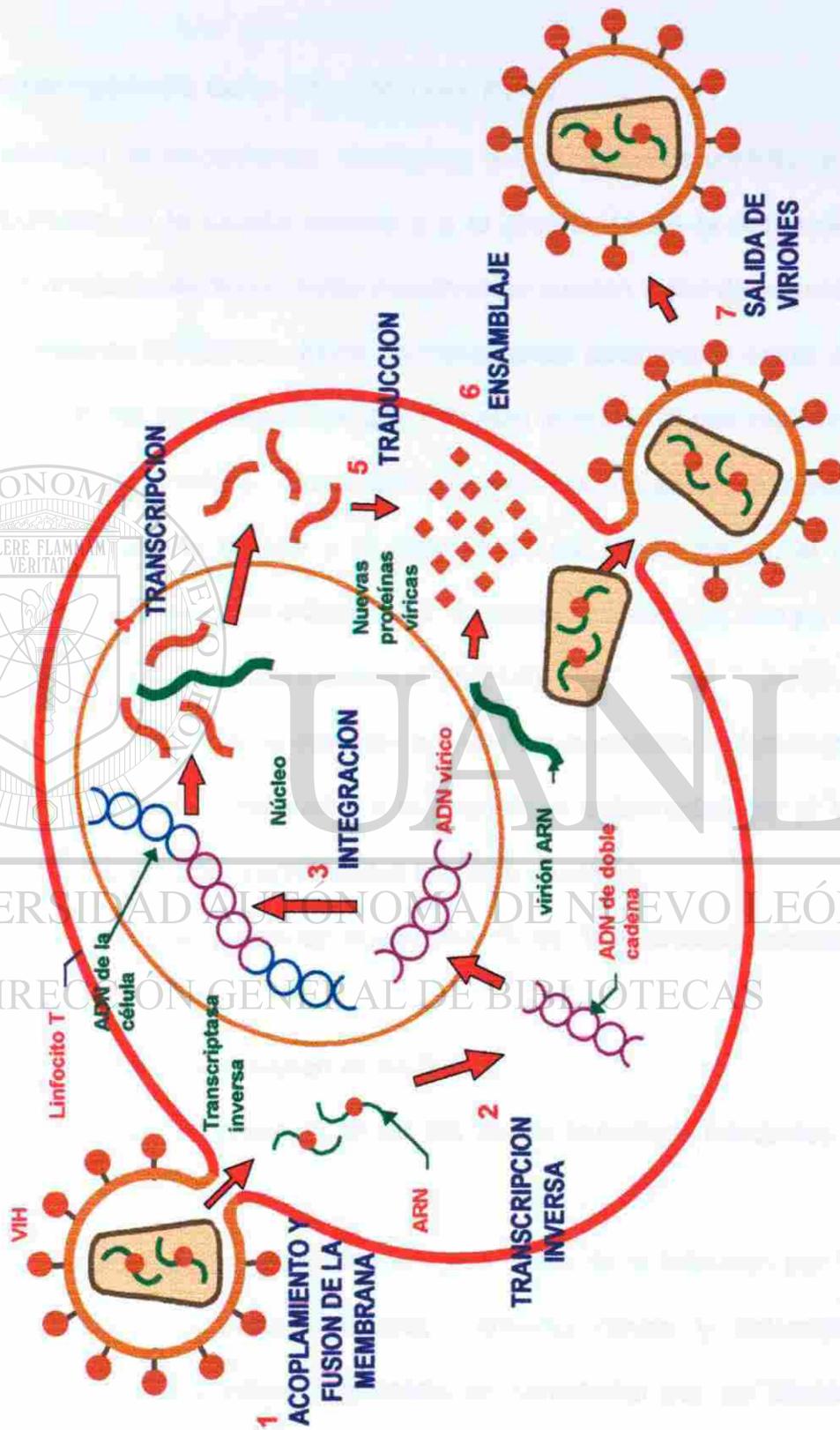
# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Figura 3 . Ciclo de Vida del VIH



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## 2.5. Inmunopatogénesis de la infección por HIV-1

Una variedad de mecanismos virológicos e inmunológicos contribuyen al deterioro progresivo de la función inmune y a la progresión de la enfermedad hasta el SIDA propiamente dicho. Estos mecanismos pueden variar de acuerdo a las diferentes fases de la infección. Entre los mecanismos patogénicos están: a) la falta de eliminación del VIH después de una infección primaria, b) una replicación persistente en órganos linfoides, c) activación inmune inapropiada y agotamiento progresivo de la respuesta inmune y d) destrucción del tejido linfoide, el cuál resulta en severo daño de la capacidad para mantener a través del tiempo una respuesta inmune específica efectiva contra el VIH(1-3).

En base a la duración de la infección por VIH y a la cinética de los eventos virológicos e inmunológicos observados a lo largo de la enfermedad por el VIH, tres patrones de evolución de la enfermedad han sido descritos:

- Típicos progresores, se presentan en un 80-90% de las personas infectadas por VIH
- Rápidos progresores, se presentan en un 5-10%
- Progresores lentos.- se presenta en un 5% de los individuos infectados por VIH.

Los típicos progresores, presentan el típico curso de la infección por VIH que incluye 3 fases: infección primaria, latencia clínica y enfermedad clínicamente aparente. La infección primaria se caracteriza por un síndrome clínico tipo gripe o mononucleosis infecciosa, con malestar general, fiebre, rash

maculopapular linfadenopatía, artralgias, mialgias, dolor de cabeza, dolor retroorbital, fotofobia .

Esta fase es seguida por un período de latencia, ésta fase puede durar años(media: 8-10 años). La progresión a SIDA resulta de una replicación continua del virus en los órganos linfoides(1-4)

Después de la infección primaria, los típicos progresores, la viremia disminuye drásticamente con la inducción de la respuesta inmune humoral y celular. La caída de la viremia se le correlaciona mejor con la aparición de linfocitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup> (CTL) restringidos por el complejo mayor de histocompatibilidad. Estas células pueden estar involucradas en la inmunopatogénesis de la infección por el VIH, ya que pueden contribuir a la depleción de las células presentadoras de antígenos por un mecanismo directo o indirectamente a través del daño tisular por citocinas producidas por los CTLs como el factor de necrosis de tumor  $\alpha$  y  $\beta$  o el Interferón  $\gamma$ (1-4)

Los rápidos progresores, durante la infección primaria los niveles de carga viral son muy altos y generalmente no caen tan drásticamente como los niveles que presentan los progresores típicos, algunos, pueden estar infectados con cepas de VIH más virulentas y que se replican más rápidamente. La respuesta inmune generalmente es defectuosa, los niveles de anticuerpos son bajos o ausentes(1-4)

Los No-progresores o progresores lentos, su carga viral generalmente es baja, algunos pero no todos pueden estar infectados con variantes de VIH menos patogénicas. No experimentan progresión clínica y tienen cuentas de

Linfocitos T CD4+ altas > 600 células/ $\mu$ l, ausencia de síntomas aún en ausencia de terapia retroviral. Los linfocitos T citotóxicos contra varias proteínas del VIH incluyendo Env, Gag, pueden ser fácilmente detectados(5,6)

El VIH puede replicarse más eficientemente en células activadas y los niveles virales se incrementan cuando el sistema inmune de los individuos infectados es activado por estímulos exógenos tales como las infecciones por microorganismos oportunistas(1,2)

El sistema inmune es regulado por citocinas que son continuamente secretadas en mayor o menor grado. Hay citocinas que inducen la expresión del VIH, entre ellas están, IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-12, Factor estimulante de los granulocitos-monocitos (GM-CSF), Factor estimulante de colonias de los macrófagos (M-CSF), Factor de necrosis de Tumor  $\alpha$  y  $\beta$  (TNF)(7)

Entre las citocinas que presentan efectos supresores de la expresión del VIH están: Interferón  $\alpha$  y  $\beta$  (IFN) y la Interleucina 10 (IL-10). Finalmente las citocinas bifuncionales son el IFN  $\gamma$ , Interleucina-4 y el Factor Transformador del Crecimiento  $\beta$  (TGF  $\beta$ )(1,2)

Otro efecto supresor de la replicación del VIH es por la presencia de factores solubles que se encuentran en el sobrenadante de los linfocitos T CD8+ transformados por HTLV-1 (Virus linfotrópico de las células T humanas) o por individuos infectados por VIH. Estas sustancias son debidas a citocinas quimioattractantes o  $\beta$  quimiocinas, RANTES, MIP- $\alpha$  y  $\beta$  (7-10)

Es posible que las citocinas jueguen un papel importante en el mantenimiento de los niveles de expresión y replicación del virus particularmente en los órganos linfoides.

La capacidad del VIH-1 para infectar diferentes tipos de células varía de aislado a aislado y es referido como tropismo celular. Todas las cepas de VIH infectan células T CD4+, muchos aislados también se replican bien en monocitos, pero no en células T transformadas y son clasificadas como con tropismo a monocitos o macrófagos (M-Tropic). Otros aislados particularmente aquellos que han sido pasados en células linfoides in vitro ( cepas adaptadas a líneas de células T )son capaces de infectar linfocitos T pero no monocitos o macrófagos son referidos como cepas con tropismo a células T (T-Tropic). Cuando la infección por VIH progresa, virus M-tropic son generalmente reemplazados por T-Tropic. Los primeros son generalmente encontrados que in vitro no inducen la formación de sincitios (NSI) o T-Tropic que son inductores de sincitios (SI). El determinante viral del tropismo celular se encuentra en la gp120 del gene env, particularmente en el asa V3(1,2)

Feng y cols, reportaron que el receptor CXCR4 también conocido como fusina o LESTR, fue el coreceptor responsable para que las cepas de VIH T-tropic entren a las células blanco, en cambio el receptor CCR5 fue el co-receptor para las cepas de VIH M-tropic. Cepas de VIH-1 M-tropic predominan en la etapa primaria de la infección, estas cepas son las responsables de la infección inicial aún cuando la pareja que lo haya transmitido hospede ambas cepas M-tropic o T-tropic. La resistencia aparente a la infección conferida por el defecto homocigoto

en el gene CCR5 fuertemente sugiere que la entrada inicial de las cepas M-tropic en las células blanco es importante para el establecimiento de la infección por el VIH(1-3)

### **2.5.1. Características Clínicas de la infección**

El SIDA es una enfermedad infecciosa y transmisible con una elevada letalidad, que se caracteriza por ser una alteración adquirida, severa con pérdida progresiva de la función inmune , que predispone al paciente a infecciones graves por microorganismos oportunistas y/o al desarrollo de neoplasias.

La infección inicial se presenta como un síndrome del VIH agudo, semejante a un síndrome gripal o parecido a una Mononucleosis Infecciosa, los síntomas de seroconversión aguda se manifiestan en 2-6 semanas después de la exposición del virus (promedio de 21 días) Este síndrome se caracteriza por fiebre, linfadenopatía generalizada (figura 4), faringitis, cefalea, aftas, mialgias, artralgias erupción cutánea, cefalea(1)

En 2-4 semanas después de la infección , altas concentraciones del virus pueden ser detectadas por cultivo o por la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) , altos niveles de antígeno p24 son también detectados durante la fase aguda de la enfermedad . Durante este período de viremia, el sistema inmune empieza a reconocer y responder a los antígenos del VIH. En 1-3 semanas después del brote de los síntomas, pueden ser detectados anticuerpos contra el virus, la respuesta inicial de anticuerpos es dirigida contra la gp 160 y p24 seguida por los anticuerpos contra gp120 y gp41. Los anticuerpos contra la

región de envoltura generalmente persisten durante todo el curso de la enfermedad(2-4)

Después de la fase inicial, comienza una fase clínicamente latente, que puede durar hasta 10 años. Aunque el virus extracelular prácticamente desaparece de los líquidos corporales durante esta fase, hay una replicación constante de la enfermedad en los tejidos linfoides con un mayor número de células T CD4+, macrófagos y células dendríticas infectadas. Durante este período puede aparecer una linfadenopatía generalizada (figura 4). Un subgrupo de pacientes desarrolla un grupo de signos y síntomas que pueden persistir durante algún tiempo que pueden durar de meses o años antes de desarrollar al SIDA(5)

El diagnóstico de SIDA se hace basándose en la clínica y en pruebas de laboratorio. En la clínica existe la presencia de infecciones por microorganismos oportunistas, neoplasias, síndrome de desgaste del VIH (figura 4) (caquexia) y degeneración del Sistema Nervioso Central (encefalopatía del SIDA) Los pacientes con SIDA adquieren numerosas infecciones por microorganismos que no suelen ser patógenos en los individuos inmunocompetentes (figura 4). La neumonía causada por *Pneumocystis carinii* es la infección oportunista adquirida más frecuente en el SIDA. y es quizá la causa más común de muerte en el SIDA(6-9)

Varios sistemas de clasificación han sido propuestos para caracterizar la enfermedad por el VIH, una de ellas, es la propuesta por el Centro de Control de Enfermedades (CDC, 1993)(12), se basa en la cuenta de CD4 , un marcador que

es la mejor prueba para poder predecir el riesgo para el desarrollo de infecciones oportunistas

El sistema de clasificación propuesta por el Centro de Control de Enfermedades (CDC) en 1993, enfatiza la importancia de la cuenta de linfocitos T CD4 en el manejo clínico de las personas infectadas por VIH. El sistema está basado en tres rangos de cuentas de linfocitos CD4 y tres categorías clínicas A,B y C; la combinación de estos dos aspectos da lugar a nueve categorías diferentes. Este sistema propuesto por el CDC se describe en la Tabla 3.

**Tabla 3 . Categorías Clínicas propuestas por el CDC**

Células CD4	CATEGORÍA CLÍNICA		
	A	B	C
>500/mm <sup>3</sup>	A1	B1	C1
200-500/ mm <sup>3</sup>	A2	B2	C2
<200/ mm <sup>3</sup>	A3	B3	C3

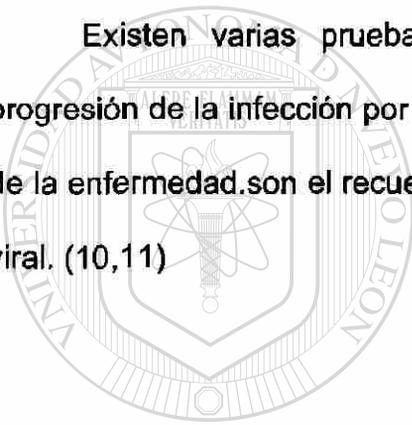
Algunas de las manifestaciones que se presentan en cada una de estas categorías se presentan a continuación:

**Categoría A.-** Infección asintomática por VIH, Linfadenopatía generalizada y Enfermedad retroviral aguda por VIH.

**Categoría B.-** Fiebre > 38.5°C, diarrea por más de un mes, Candidiasis mucocutánea, Infecciones por Herpes zoster, Púrpura Trombocitopénica Idiopática, Listeriosis, Leucoplaquia vellosa oral, Enfermedad Pélvica Inflamatoria., Neuropatía periférica.

**Categoría C.-** Condiciones que definen al SIDA: Cuenta CD4  $<200/ \text{mm}^3$   
Candidiasis pulmonar o esofágica, Cáncer Cervical, Coccidioidomicosis, Criptosporidiosis intestinal por más de un mes, Infección por Citomegalovirus, Esofagitis por Herpes, Encefalopatía por VIH, Herpes simple, Isosporiasis, Sarcoma de Kaposi (Figura 4), Linfoma No Hodking, Enfermedad por Micobacterias, Neumonía por Pneumocystis carinii, Leucoencefalopatía Multifocal progresiva. Toxoplasmosis

Existen varias pruebas de laboratorio para diagnosticar y seguir la progresión de la infección por el VIH, las más utilizadas para evaluar el pronóstico de la enfermedad son el recuento de Células CD4+ y la determinación de la carga viral. (10,11)



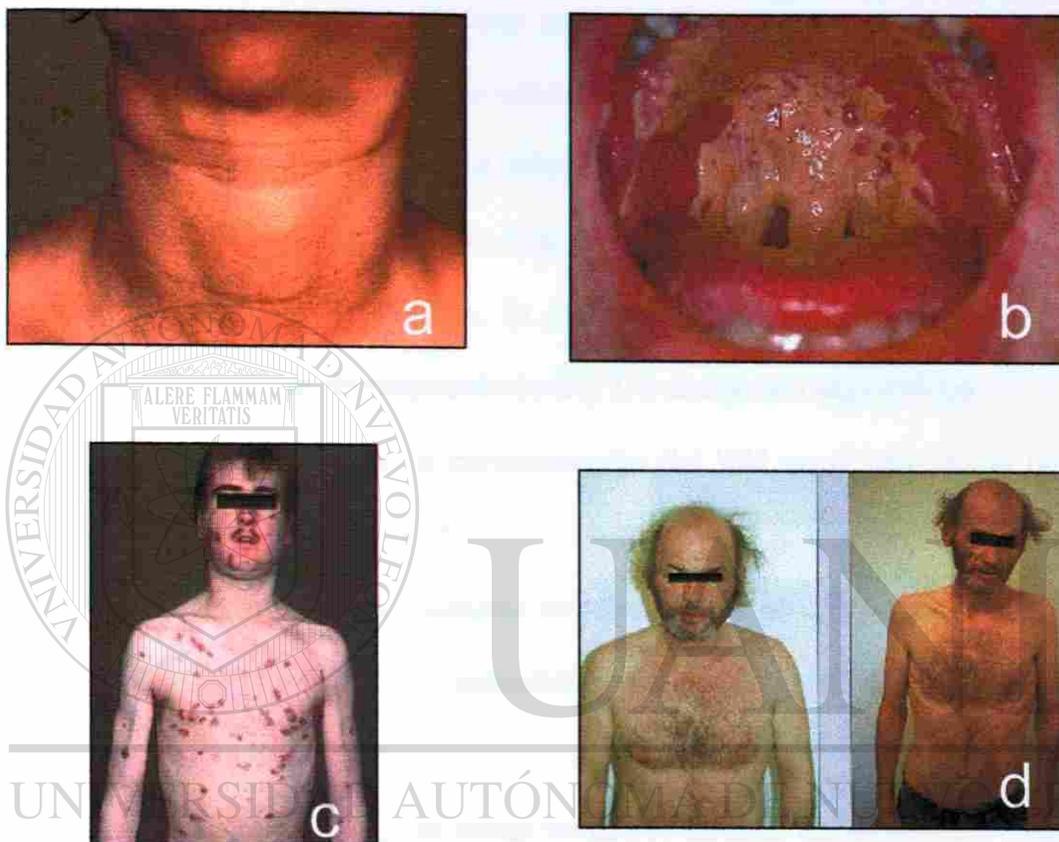
UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



**Figura 4. Manifestaciones clínicas en pacientes con VIH. a) Linfadenopatía generalizada b) Infección por *Candida albicans* c) Sarcoma de Kaposi cutáneo y d) Síndrome de Desgaste por VIH**

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

### **2.5.2. Respuesta inmune al VIH**

A pesar de que los pacientes infectados con VIH muestran anomalías de las funciones inmunológicas, son capaces de activar una respuesta inmune específica de tipo humoral y celular contra el VIH.

La respuesta inmune al VIH-1 es influenciada por múltiples factores:

- Las interacciones virus-huésped que llevan a la patogénesis del SIDA induce defectos inmunes funcionales, la disfunción inmune inducida por el VIH incluyen defectos en la respuesta de B y T a antígenos específicos.
- Otro factor que influye es la concentración del VIH en el inóculo, el potencial patogénico de la cepa de VIH
- Algunos componentes del sistema inmune contra el VIH pueden aumentar la infectividad o pueden ser directamente responsables de las manifestaciones clínicas de la enfermedad.
- La capacidad del VIH-1 para mutar en las secuencias nucleotídicas, y cambiar la secuencia primaria de las proteínas del VIH lo que le permite evadir a la respuesta inmune antiviral.

#### **a) Respuesta inmune Humoral**

Es posible detectar anticuerpos contra el asa V3 de la gp120, gp 41, p24, Nef, Rev, Vpr, Vpu, Tat y los productos del gene *pol*. Las moléculas más inmunogénicas del VIH son las glicoproteínas de envoltura y en la mayoría de los individuos infectados por el VIH hay títulos elevados de anticuerpos anti-gp120 y

anti-gp41. Una región de la molécula gp 120, llamada asa V3, es uno de los componentes del virus más variables bajo el punto de vista antigénico(1,2)

Los anticuerpos neutralizantes contra el VIH-1 suelen ser específicos de cepas de virus, de forma que los anticuerpos de un individuo infectado no reconocen el VIH aislado de otro individuo infectado. Es posible que la respuesta inmunitaria del huésped pueda actuar como una presión de selección que promueva la supervivencia de los virus más variables a nivel genético. Estos anticuerpos empiezan a ser detectables de 2-4 semanas después de una infección primaria por VIH, con un pico demostrable durante la fase asintomática de la infección por VIH. La mayoría de los estudios han demostrado que los anticuerpos pueden ser encontrados en bajos niveles en el período conocido como Complejo Relacionado a SIDA y SIDA (3)

Anticuerpos anti-gp160 en el suero y en el líquido cefalorraquídeo de personas infectadas, son capaces de unirse a los receptores Fc presentes en las células NK por medio de su fragmento Fc, sensibilizándola para matar aquellas células que expresen gp120 o gp160. Los monocitos de sangre periférica son capaces de mediar este tipo de Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpos (ADCC)(1)

En general los anticuerpos para los otros componentes virales, se han reportado en diferentes porcentajes en varios pacientes con infección por VIH. En general los niveles de anticuerpos de todas las proteínas, disminuye a medida que la infección por VIH progresa a SIDA.(1)

## **b) Respuesta Inmune Celular**

La respuesta por linfocitos T, es esencial para el control de numerosas infecciones virales. Células T CD4+ son requeridas para la inducción de la producción de anticuerpos y para la inducción de otras respuestas por células T. En pacientes con infección por VIH, se ha detectado respuesta por T cooperador, por T citotóxico y por T CD8+ no restringido por el complejo mayor de Histocompatibilidad(4).

Varios epítopes de las células T cooperadoras restringidas por el complejo mayor de histocompatibilidad son reconocidas por animales inmunizados y humanos infectados por VIH. Los epítopes de las células T cooperadoras han sido encontradas con ciertas proteínas del VIH, incluyendo *Env*, *Gag* and *Pol*. Individuos infectados con VIH son capaces de reconocer y secretar interleucina 2, incluso presentar una respuesta proliferativa a la gp 120 del VIH, estas respuestas son altas en individuos asintomáticos seropositivos y disminuye con el progreso a SIDA(4)

En individuos con enfermedad avanzada por VIH, son producidos  $10^9$  viriones nuevos cada día y  $2 \times 10^9$  células T CD4+ es el recambio aproximado por día, con una vida media de 2 días. Estudios sugieren que la depleción de las células T CD4+ en la infección por el VIH resulta de una alta capacidad replicativa del VIH y muerte celular directa por el virus, aunque la pérdida de las células CD4+ podría ser en parte causada por muerte celular o por Apoptosis(5-7)

Los linfocitos T citotóxicos restringidos por el complejo mayor de histocompatibilidad han sido demostrados contra las proteínas, *Gag*, *Env*, *Nef* y

Pol. En una infección primaria por VIH, la caída inicial de la viremia se correlaciona mejor con la aparición en sangre periférica de Linfocitos T citotóxicos CD8+ restringidos por el complejo mayor de histocompatibilidad con especificidad para el VIH. Estas células son importantes durante la fase crónica de la infección para eliminar a las células infectadas y también para controlar la carga viral. También juegan un papel importante en el papel de la inmunopatogénesis de la infección por VIH por contribuir a la depleción de las células presentadoras de antígeno infectadas con el VIH o a través del daño tisular después de la liberación de citocinas como el Factor de Necrosis de Tumor alfa, Interferón beta durante el proceso de citólisis. Cuando la infección por VIH progresa a SIDA, el número de Linfocitos T citotóxicos restringidos genéticamente disminuye(8-11)

La respuesta inmune celular contra el VIH, también puede ser llevada a cabo por las células NK, que son capaces de matar células infectadas o a través de el fenómeno de Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, éste también puede ser llevado a cabo por los monocitos, que aunque presentan defectos en la quimiotaxis presentan una actividad tumoricida *in vitro*, mecanismo importante para el desarrollo de tumores y el Sarcoma de Kaposi en pacientes con SIDA.

## **2.6. Epidemiología**

### **2.6.1. Epidemiología del VIH/SIDA a nivel Mundial y en México**

Según las estimaciones del Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA (ONUSIDA) y de la Organización Mundial de la Salud (OMS), 32.4 millones de adultos y 1.2 millones de niños viven con el VIH al inicio del año 2000. A lo largo de 1999, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), infectó a unos 5,6 millones de personas, se produjeron 2,6 millones de defunciones por VIH/SIDA, un total mundial más elevado que en cualquier otro año desde el inicio de la epidemia, a pesar de la terapia antirretrovírica

Aproximadamente la mitad de todas las personas que contraen el VIH se infectan antes de cumplir los 25 años y, de forma característica, fallecen a causa de las enfermedades oportunistas antes de llegar a los 35.

La inmensa mayoría de las personas con el VIH (un 95% del total mundial) vive en países en desarrollo. Cabe prever que esta proporción crezca aún más a medida que las tasas de infección continúen aumentando en los países donde los recursos para la prevención son limitados y como resultado de la pobreza se favorezcan la propagación del virus .

Se estima que en 1999, contrajeron el VIH 570.000 niños menores de 14 años. Más del 90% de ellos son hijos de mujeres VIH-positivas y contrajeron el virus en el momento del parto o en el curso de la lactancia materna. De ellos, nueve de cada 10 correspondieron al África subsahariana.

En el ámbito mundial, diariamente se infectan de VIH, 16 mil personas, el 75% de los nuevos casos de SIDA son por relaciones sexuales. Siete mil son jóvenes entre 10 y 24 años, lo que significa que cada minuto se infectan 5 jóvenes.

Son necesarios esfuerzos masivos a nivel nacional e internacional para asignar recursos económicos destinados a continuar la investigación en ésta área así como para promover iniciativas de prevención con el fin de controlar esta terrible enfermedad que sigue afectando a muchos países .

México ocupa el 13º lugar en cuanto al número total de casos notificados mundialmente y el tercer lugar en el continente americano; sin embargo cuando se estima sobre el número de casos acumulados, México ocupa el 69<sup>th</sup> globalmente, y el 29<sup>th</sup> en América Latina, por lo cual está considerado entre los países con tasa de incidencia muy baja (2)

La tendencia de la propagación del VIH en América Latina y por ende México, es prácticamente la misma que en los países industrializados, en donde se observa que el número de infecciones se ha estabilizado e incluso se está reduciendo, aunque se trata de un panorama que no es uniforme en todo el país . La mayor parte de los países tienen una epidemia catalogada como concentrada, debido a que en la población general se encuentra una prevalencia menor al 1%, pero en grupos de población de riesgo, esta prevalencia resulta mucho mayor, alcanzando incluso 25% entre los grupos de adultos sexualmente promiscuos que no acostumbran usar condón o entre los drogadictos.

En México el desarrollo de la epidemia del SIDA ha transitado por diversas etapas desde sus orígenes: la primera abarca desde los primeros casos

registrados en 1983 hasta finales de 1987 en donde se tuvo un incremento lento en el número de casos; la segunda, de 1988 a 1991, en donde el crecimiento ya fue de tipo exponencial con un período de duplicación más corto; la tercera, entre 1992 a 1995, se caracteriza como crecimiento exponencial amortiguado, en donde se presentan incrementos importantes pero los períodos de duplicación son más prolongados; y finalmente, se puede considerar, que a partir de 1996, se ha observado una aparente estabilización de la epidemia.

Teniendo una población de 97.5 millones de habitantes, México tenía reportados 40,743 casos de SIDA hasta el 30 de septiembre de 1999(1)( ver Gráfica 5), sin embargo; esta cifra constituye sólo una aproximación a la magnitud real de la epidemia, debido a los fenómenos conocidos como retraso en la notificación y subregistro. Los estudios más recientes sobre esto, estiman que existe un retraso en la notificación de un 35% de los casos de SIDA (7) equivalente a 14,260, en tanto que el subregistro se ubica en un 18.5% (8) equivalente a 7,537 casos. De este modo, al aplicarle de manera acumulada estos porcentajes a la cifra de casos registrada, en realidad existen en nuestro país un total estimado de 62,540 casos de SIDA ya desarrollado en nuestro país.

La infección por VIH se ha venido incrementando en el país con una relación estimada de 3,000 a 4,000 casos por año (3). De los casos de SIDA se estima que el 60% o sea 37 mil 524 ya han fallecido. El número estimado de personas portadoras del VIH es de 187,621(5). Desde el punto de vista geográfico existen dos patrones: uno urbano, que se observa principalmente en las grandes ciudades de la República Mexicana y en la frontera norte, donde todavía se

encuentra un mayor porcentaje de casos en hombres y periodos de duplicación más largos (18 meses); y otro rural, con mayor proporción de casos entre mujeres y periodos de duplicación más rápidos (8 meses), el cual se está presentando en la región Centro y en el Sur del país.

El SIDA ha sido reportado en todos los estados de la República Mexicana, si se divide nuestro país por regiones, es posible darnos cuenta de cuál región es la que presenta mayor incidencia de casos de VIH/SIDA, de acuerdo a los datos publicados por CONASIDA a finales de 1998, la cantidad de casos de SIDA acumulados son presentados en el mapa 6.

El 55% de los casos de SIDA están concentrados en el Distrito Federal, Estado de México y Jalisco, fluctuando entre un grupo de edad de 25 a 44 años. Así el SIDA se ha convertido en la causa No. 3 de muerte en hombre y la 6 causa de muerte en mujeres dentro de este grupo de edad (15).

— Del total de casos diagnosticados en 1999, el 74.7% fueron transmisiones por vía sexual: homo y bisexual 35.3% y heterosexual 39.4%. La proporción entre hombres y mujeres de la población infectada con VIH-1 en este país es de 6:1 (5,9). Por vía sanguínea 1.4%, por vía perinatal 1.8% y se desconoce la forma de transmisión del 22.1% restante.

Además otra tendencia importante en la epidemia del SIDA en México, que en muchas ocasiones pasa desapercibido, es su ruralización, en 1994 representaron únicamente el 3.7% del total de casos (19), en tan sólo dos años esa proporción se elevó al 6% con más de dos mil casos registrados, lo cual significa un incremento relativo del 50%, sobre todo en aquellas entidades que

tienen fuertes flujos migratorios especialmente, las de tipo laboral a los Estados Unidos.

La epidemia de VIH/SIDA es el problema de salud pública más complejo en la actualidad, y cuyo impacto se refleja en toda la vida social y económica de nuestro país. Si bien se ha logrado un resultado exitoso en la prevención de la transmisión sanguínea, la infección continúa afectando principalmente a varones homosexuales o bisexuales promiscuos, sumado a lo anterior, la transmisión por vía heterosexual se ha incrementado paulatinamente. La alta frecuencia de otras enfermedades por transmisión sexual (ETS) en algunas poblaciones como entre las mujeres dedicadas a la prostitución, indica el riesgo de extensión de VIH a estos grupos.

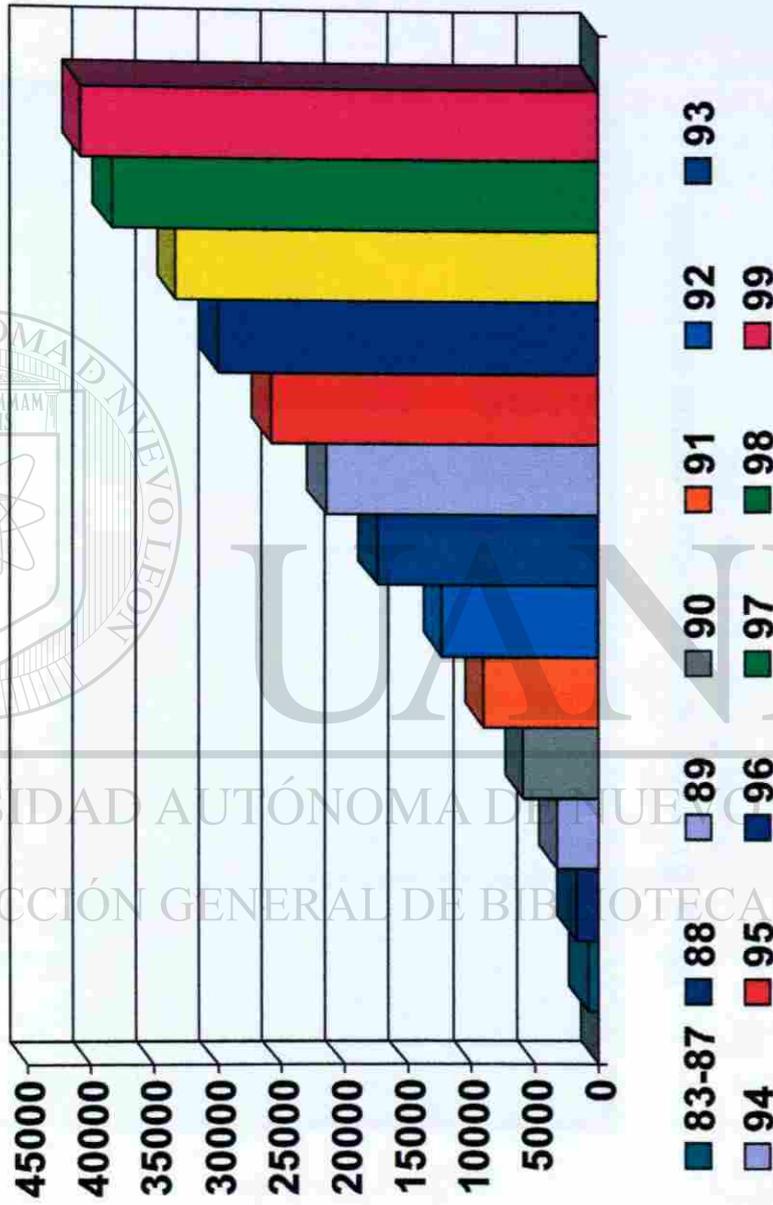
Actualmente es necesario abordar al SIDA como un problema global y como una enfermedad que no reconoce fronteras.

---

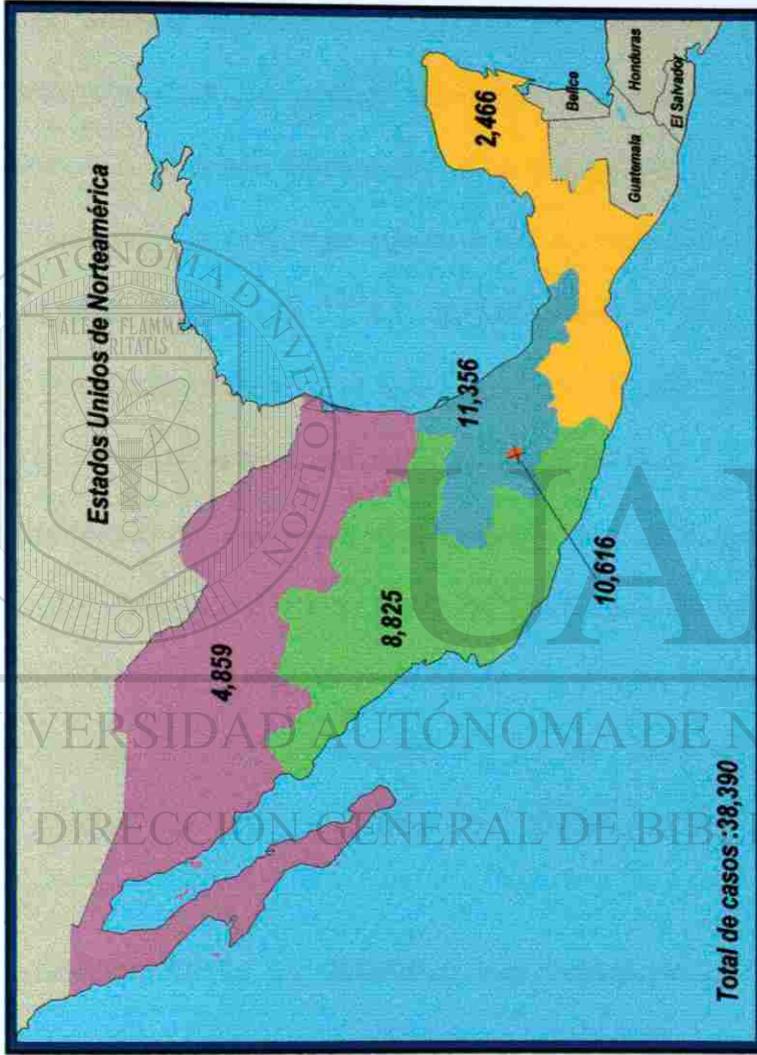
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Gráfica 5 . Casos de SIDA Acumulados en México  
1983-Septiembre de 1999



Fuente: Conasida



Mapa 6. Casos de SIDA Acumulados en México hasta Diciembre de 1998

### 2.6.2. Subtipos de VIH-1

El VIH-1 es dividido en tres grupos, M (mayor), O (outlier) y N (nuevo) (1). El grupo M ha sido subdividido en varios subtipos A-J, estos fueron originalmente definidos en base a las secuencias de los genes *env* y *gag*. Los subtipos son comúnmente referidos por letras que refleja el orden en el que ellos fueron reconocidos. En un árbol filogenético con disposición radial, todos los subtipos son equidistantes y manifiestan provenir de un hipotético ancestro común. (1) aunque algunas cepas de VIH-1 aparentemente provienen de poblaciones humanas, otros presumiblemente emergieron de recombinantes(2)

Un grupo muy más distante de los subtipos A-J, es el designado como O, este fue detectado en Camerún, este grupo O está más relacionado al VIH-1 que el VIH-2. El VIH-1 sufre mutaciones debido a que los retrovirus poseen un genoma de ARN, en donde la recombinación ocurre frecuentemente durante la transcripción en reversa. El subtipo E, es un recombinante con una región genética *gag/pol* del subtipo A pero con distinta región de envoltura de otro subtipo.(3)

Recientemente se ha detectado una nueva cepa viral en una mujer de Camerún, la cual no positiva para las pruebas de los dos grupos conocidos del VIH-1 (grupo M y O), a esta cepa la denominaron como YBF30, ésta reaccionó positivamente en una prueba de una cepa del virus SIV, aislada de un chimpance en Gabon. Cuando el genoma fue secuenciado, el resultado confirmó que

pertenecía a un grupo desconocido, a este grupo se le denominó grupo N (new)(4,5)

Aproximadamente el 50% de todas las cepas reportadas pertenecen al subtipo B, 16 % al subtipo A (16%), 9 % al C, 10% al D, 10 % para el E y en muy baja proporción al resto de los subtipos F, G y H. (6)

El subtipo B es el más estudiado, principalmente porque los virus de este subtipo representan la mayoría de los subtipos circulantes en el mundo occidental, la clara predominancia de los distintos subtipos en ciertos países nos permite hacer algunas inferencias acerca de la diseminación del VIH-1. En la epidemia en Latinoamérica, Europa occidental donde predomina el subtipo B pudieron haberse originado en los Estados Unidos, en donde el subtipo predominante también es el B. La distribución de los subtipos es muy amplia, en la tabla 4, se menciona la distribución global de los subtipos por regiones. (1)

**Tabla 4 .- Distribución global de los subtipos de VIH-1**

RÉGION	ALTA PREVALENCIA	MODERADA A BAJA PREVALENCIA	MUY BAJA PREVALENCIA
Norte América	B		A,C,D,E,O
Europa Occidental	B	A,C,D,F,G	
Centroamérica	B		
América del Sur	B	F	C
Europa del Este	B	A,C,D,F,G	
Africa del Oeste	A		C,D
Africa central	A	C,D,E,F,G,H,O	B
Africa del este	A	D	
Cuerno de Africa	C	A	
Sud Africa	C	B	D
Sudeste de Asia	E	B	C
Sur de Asia	C	B	A,E
Oeste de Asia	C		
Australia	B		

El subtipo B ha sido detectado también en México (7-12) como en otras países del continente Americano (13-19), los datos epidemiológicos de varios de estos estudios revelaron que el subtipo B es comúnmente asociado a la transmisión homosexual y al uso de drogas(13), sin embargo subtipos C y E que son los subtipos prevalentes en el Sur de Africa, India y Tailandia son relacionados con la transmisión heterosexual.(20) esto ha llevado a pensar que ciertos subtipos pueden tener diferentes propiedades fenotípicas resultando en una ventaja selectiva por una vía de transmisión dada.(21) En Tailandia por ejemplo donde los subtipos B y E están presentes, el subtipo E parece ser más fácilmente transmitido por vía heterosexual que el subtipo B (22) .

La información limitada es disponible considerando la distribución de subtipos de VIH-1 en México.(7-12) La predominancia del VIH-1 subtipo B fue mostrado en algunas regiones de México por serotipificación con péptidos sintéticos(7,8) ensayo de movilidad por heteroduplex(9,12) o por determinación por PCR específico de subtipo.(12) Vázquez-Walls y colaboradores, reportaron que el 11% de las muestras no son pertenecientes al subtipo B por ensayos de serotipificación con péptidos sintéticos o por PCR específico de subtipo de la región C2-V5.(8) Hasta ahora ninguna secuencia proveniente de México había sido reportada o depositada en la base de datos del GenBank .

El análisis del segmento C2-V5 del *env* , región en donde se encuentra el asa V3, muestra que es una región hipervariable perteneciente a la gp 120 de la envoltura del VIH-1, juega un papel esencial en la infectividad(28), anticuerpos neutralizantes contra esta región bloquean la formación de sincitios(29) y se ha

observado que la presencia de mutaciones en el V3 inhiben la fusogenicidad del VIH-1(30) además que también contribuyen al tropismo del virus por las células blanco(31), a pesar de la hipervariabilidad de V3(1) ha permanecido como el centro de atención porque ha estado involucrado en el diseño de estrategias de inmunización pasiva así como en el desarrollo de vacunas.

El estudio de la región *env* permanece como el blanco principal para la subtipificación del VIH-1 además de que puede proporcionar información de nuevos subtipos circulantes en una determinada área geográfica.(27)



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## 2.7. HIPÓTESIS

- El VIH-1 subtipo B, es el virus predominante del Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) en México.

## 2.8. OBJETIVOS

1. Identificar el subtipo genético del VIH de individuos infectados en cinco estados de México.
2. Caracterizar y analizar las variaciones genéticas de los subtipos encontrados.
3. Establecer la relación filogenética de los subtipos de VIH-1 encontrados en nuestro país.

## **CAPÍTULO 3**

### **MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **3.1. Muestras de individuos infectados con VIH**

Los individuos infectados con el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) se seleccionaron de manera aleatoria. Todos fueron seropositivos por ELISA y confirmados por la técnica de inmunoelectrotransferencia o Western Blot. Los pacientes provenían de 5 regiones geográficas de México: al Norte (Nuevo León), Oeste (Jalisco), Sur (Yucatán), Este (Puebla) y Centro (Ciudad de México) (ver Mapa 7). Después de que se firmó un consentimiento para la realización del estudio, se colectaron muestras de sangre y se les pidió a los participantes que contestaran un cuestionario corto, el cual incluía preguntas acerca de su edad, sexo, lugar de nacimiento, residencia y finalmente cualquier comportamiento de riesgo para contraer el SIDA. Se realizaron exámenes clínicos a todos y cuentas de CD4+ en la mayoría de ellos. En total se incluyeron en este estudio 65 hombres y 2 mujeres. La edad de los pacientes osciló entre los 20 y 67 años de edad (con un valor promedio de 43 años). La epidemiología y los datos clínicos de la población estudiada se encuentran resumidos en la siguiente Tabla 5.

**Tabla 5 . Datos Epidemiológicos y Clínicos**

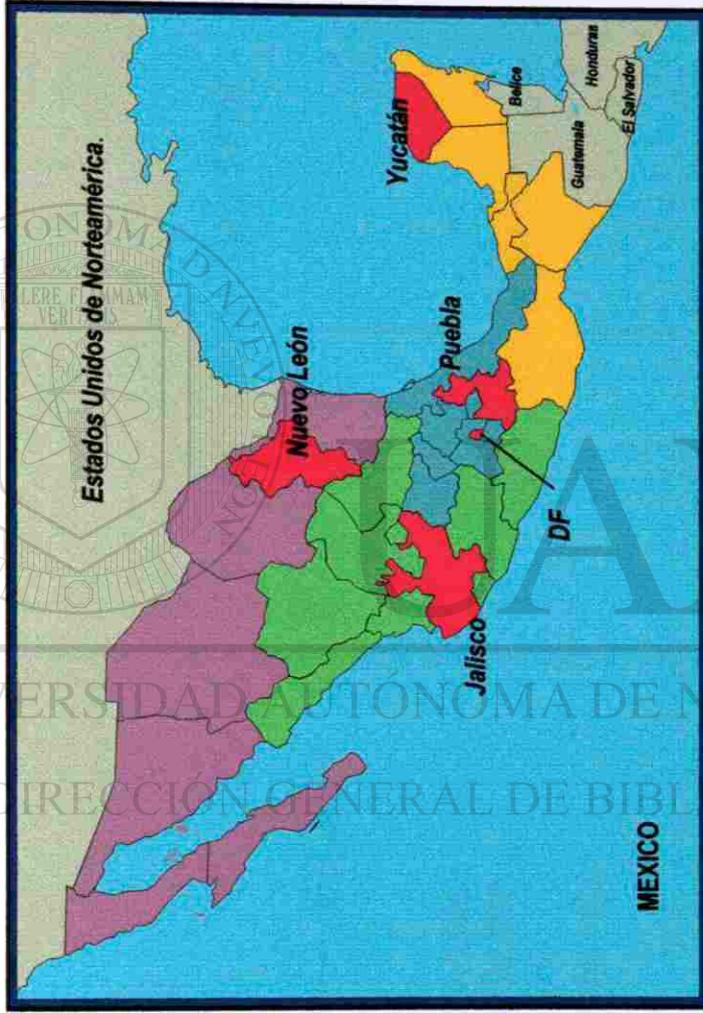
<i>Paciente</i>	<i>Región Geográfica</i>	<i>Año de Positividad al VIH</i>	<i>Estado de la Enfermedad<sup>1</sup></i>	<i>Modo de Transmisión<sup>2</sup></i>	<i>Conteo de CD4<sup>3</sup></i>
Mx-1	Cd. de México	92	A2	Ho	660
Mx-2	Cd. de México	94	A2	Ho	344
Mx-3	Cd. de México	96	B3	Ho	20
Mx-4	Cd. de México	91	C3	Ho	230
Mx-5	Cd. de México	96	A3	Ho	336
Mx-6	Cd. de México	96	B3	Ho/Bi	150
Mx-7	Cd. de México	85	B3	Ho	66
Mx-8	Cd. de México	95	A2	Ho	481
Mx-9	Cd. de México	98	C3	Ho/Bi	18
Mx-10	Cd. de México	94	B3	Ho	145
Mx-11	Cd. de México	93	A2	Ho	276
Mx-12	Cd. de México	90	A2	Ho	425
Mx-13	Cd. de México	98	C3	Ho	20
Mx-14	Cd. de México	92	B3	Ho	332
Mx-15	Cd. de México	95	A3	Ho/Bi	202
Mx-16	Cd. de México	95	A3	He	133
Mx-17	Cd. de México	92	A2	Ho	554
Mx-18	Cd. de México	91	C3	Ho/Bi	328
Mx-19	Cd. de México	94	C3	Ho/Bi	480
Mx-20	Cd. de México	88	C3	Ho	200
Mx-21	Cd. de México	97	A3	Ho	78
NL-1	Nuevo León	90	C3	Ho	143
NL-2	Nuevo León	97	C3	Ho/Bi	NA
NL-3	Nuevo León	93	C2	Ho/Bi	98
NL-4	Nuevo León	95	C3	Ho	55
NL-5	Nuevo León	97	C2	Ho	161
NL-6	Nuevo León	96	C2	Ho	6
NL-7	Nuevo León	97	C3	He	13
NL-8	Nuevo León	92	C3	Ho	111
NL-9	Nuevo León	98	C3	Ho/Bi	5
NL-10	Nuevo León	98	C3	Ho/Bi	38
J-1	Jalisco	99	NA	Ho	NA
J-2	Jalisco	98	A2	Ho	562
J-3	Jalisco	98	B3	Ho	371
J-4	Jalisco	90	A2	Ho	537
J-5	Jalisco	96	A2	Ho	644
J-6	Jalisco	88	B3	Ho	359
J-7	Jalisco	99	B3	Ho	380
J-8	Jalisco	97	C3	Ho	96
J-9	Jalisco	99	A2	Ho	550
J-10	Jalisco	99	B3	Ho	272
J-11	Jalisco	98	C3	Ho	76
P-1	Puebla	95	C2	He	244
P-2	Puebla	97	C3	He	28
P-3	Puebla	96	C2	He	235
P-4	Puebla	96	C3	He	162
P-5	Puebla	94	C3	He	41
P-6	Puebla	95	C3	Ho	63
P-7	Puebla	94	C3	Ho	105
P-8	Puebla	93	C3	Ho	88
P-9	Puebla	96	C2	Ho	335
P-10	Puebla	97	C2	Ho	314
P-11	Puebla	97	C3	He	2
P-12	Puebla	91	C3	He	16
Y-1	Yucatán	95	C3	Ho	199
Y-2	Yucatán	97	C3	Ho	35
Y-3	Yucatán	88	C3	Ho	215
Y-4	Yucatán	97	C3	Ho	93
Y-5	Yucatán	92	B3	Ho	246
Y-6	Yucatán	98	B2	Ho	244
Y-7	Yucatán	98	B2	Ho	230
Y-8	Yucatán	91	B3	Ho	433
Y-9	Yucatán	92	C3	Ho	7
Y-10	Yucatán	98	C2	Ho	125
Y-11	Yucatán	95	C3	Ho	107
Y-12	Yucatán	95	B3	Ho	57
Y-13	Yucatán	94	B2	Ho	381

<sup>1</sup> De acuerdo a la clasificación del CDC.

<sup>2</sup> Ho – homosexual, Ho/Bi – homosexual/bisexual, He – heterosexual.

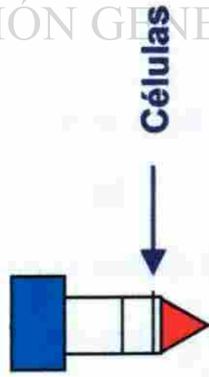
<sup>3</sup> Número de CD4<sup>+</sup>/ml de sangre.

<sup>4</sup> Distancia nucleotídica al sitio consenso del serotipo B del VIH.



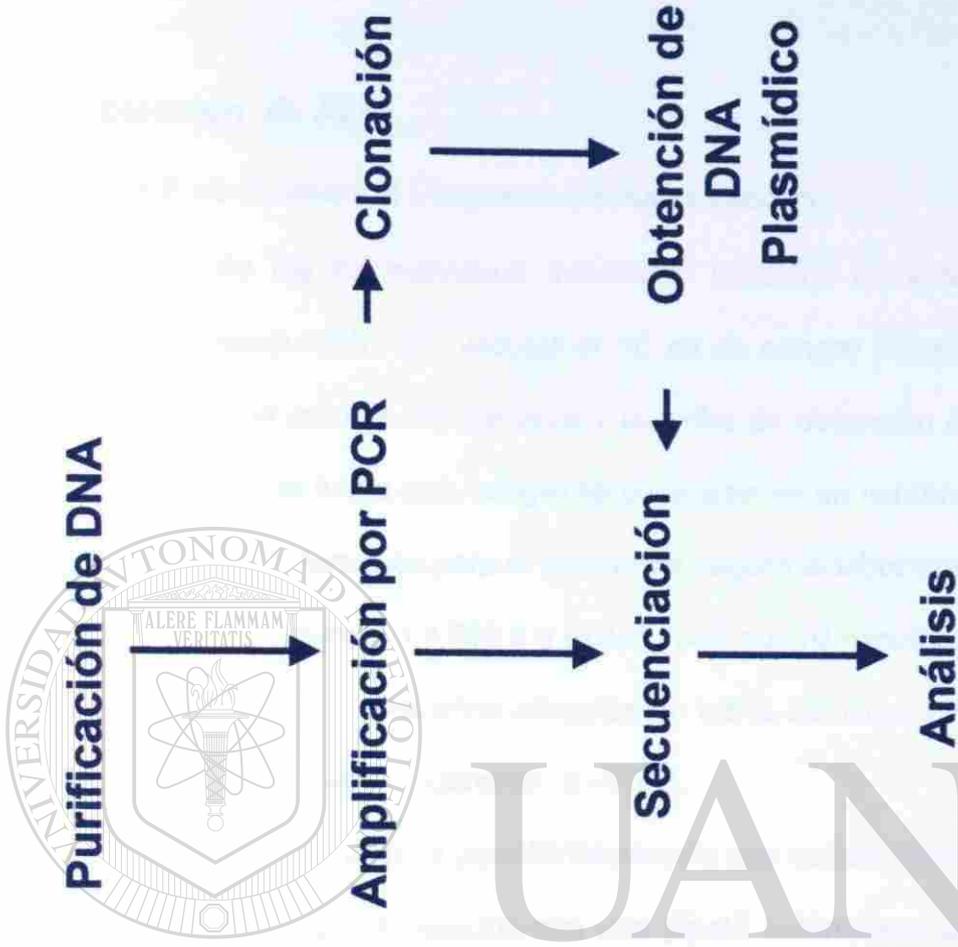
Mapa 7. Localización de los cinco Estados que presentan la más alta incidencia de los casos de SIDA en México.

**Figura 8**



67 muestras de individuos  
Seropositivos por ELISA  
y confirmados por  
Inmunoelctrotransferencia

**Diagrama de Flujo**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

### 3.2. Obtención de ADN

En la figura 8 se muestra el Diagrama de flujo utilizado.

De cada uno de los 67 individuos infectados incluidos en este estudio, se obtuvieron por venopunción con vacutainer 10 ml de sangre heparinizada. Cada tubo se rotuló con el nombre del paciente y la fecha de obtención de la muestra, en todos los casos, los tubos con sangre se colocaron en un contenedor con tapa de rosca a prueba de derrames para el transporte seguro al laboratorio. Los tubos con sangre se centrifugaron a  $3,300 \times g$  (4,400 rpm) por 10 minutos, se obtuvo el plasma y se guardaron en pequeñas alícuotas en tubos de microcentrifuga de 1.5 ml que inmediatamente se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Se obtuvieron 200  $\mu\text{l}$  de la porción intermedia que corresponde a la capa de leucocitos (Buffy Coat) por aspiración con una pipeta automática, posteriormente el ADN fue aislado con el sistema QIAGEN(QIAamp Blood ,QIAGEN Chatsworth,CA.):

1. Se colocó 200  $\mu\text{l}$  de la capa de leucocitos (Buffy Coat) en un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml.
2. Se añadió 25  $\mu\text{l}$  de la enzima QIAGEN proteasa o Proteinasa K (disuelta en 1.4 ml de agua destilada) y 200  $\mu\text{l}$  del Buffer AL (se preparó este buffer decantando todo el reactivo AL1 en el buffer AL [reactivo AL2] ) a la muestra). Se agitó inmediatamente en un vortex por 15 segundos, (en este paso los leucocitos se lisaron y se obtuvo una solución homogénea ) .

3. Se incubó a 70°C por 10 minutos y posteriormente se añadieron 210 µl de etanol absoluto a la muestra y se mezcló en vortex.
4. Se colocó en las columnas QIAamp el contenido de los tubos del paso anterior, se centrifugaron a 6,000 x g (8,000 rpm) por 1 minuto. El eluente se recuperó en los tubos de colección. En este paso el ADN quedó adherido a la columna y se descartó el eluente.
5. Se lavó el ADN pasando 500 µl del buffer AW (se preparó este reactivo añadiendo 40 ml de etanol absoluto) en las columnas QIAamp. Se centrifugó a 6,000 x g (8,000 rpm) por 1 minuto. Nuevamente se descartó el eluente.
6. Se repitió el paso anterior con la diferencia de que se centrifugó a alta velocidad por 3 minutos.
7. Finalmente, el ADN se eluyó de las columnas con 200 µl del buffer AE (solución acuosa de Tris/HCl) o agua destilada precalentada a 70°C. Se incubó la columna a temperatura ambiente por 1 minuto y se centrifugó a 6000 x g (8000 rpm) por 1 minuto. La cantidad de ADN que se obtiene de la capa de leucocitos produce 5-10 veces más ADN que el volumen equivalente de sangre total.

El ADN purificado se le determinó la concentración por espectrofotometría a una longitud de onda de 260 nm. La integridad del ADN se verificó por electroforesis en Gel de agarosa al 1% y tinción con Bromuro de Etidio.

### 3.3. Amplificación de las Secuencias del VIH-1 por PCR

La detección molecular de la presencia de secuencias genómicas del VIH-1 se realizó mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), específicamente mediante un PCR anidado o en nido, con la enzima AmpliTaq DNA polimerasa (GeneAmp PCR Reagent Kit with AmpliTaq DNA Polymerase Perkin Elmer). Esta enzima es termoestable y recombinante, de 94kDa. La frecuencia de error (error rate) es de 1 en 50,000-100,000 pares de base, esto significa que pudiera haber solo 1 error en todas las 67 muestras. Se clonó en orden para tomar la variante viral dominante para conseguir las quasi-especies de PBMC de los pacientes, la técnica no añade errores a los datos.

PCR en nido (nested) fue usado para amplificar la región C2-V5 del gene *env* como se describió previamente (1,2). Este fue utilizado para incrementar la especificidad de la reacción de amplificación.

Este procedimiento involucra dos reacciones de PCR, usando un par de primers diferente en cada reacción. En la primera reacción de PCR el producto obtenido con el primer par de oligonucleótidos sirve como templado para la segunda reacción de PCR. En la segunda reacción, se usa otro nuevo set de par de oligonucleótidos que hibridan en una secuencia interna del producto obtenido en la primera reacción. Usando este procedimiento el producto que se amplifica es seleccionado 2 veces para la especificidad del gene. El uso del PCR en nido puede mejorar la producción del producto específico del gene que cuando es usado solamente un único par de oligonucleótidos.

Se uso una técnica de PCR para amplificar la región del C2-V5 y del gen *env* tal y como se describió anteriormente (1,2). Se usaron los oligonucleótidos ED3 y ED14 en la primera corrida, mientras que se aplicaron ED5 y ED12 en el siguiente ciclo del PCR.(1)

La manipulación de las reacciones se realizó en un área exclusiva para reacciones de PCR separada del equipo termociclador (DNA Thermal Cycler 480, Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT) y de cualquier sustancia o templado que pudiera contaminar la reacción de PCR.

Mezcla de reacción:

REACTIVO	CANTIDAD(VOLUMEN)
Amortiguador de PCR 10X (MgCl <sub>2</sub> )	5 µl
dNTPs mix (d ATP, d GTP, d CTP, d TTP)	8 µl
Oligonucleótidos o Iniciadores	1 µl
Oligonucleótidos o Iniciadores	1 µl
H <sub>2</sub> O destilada	33.5 µl
Taq DNA polimerasa	0.5 µl
Templado	1 µl
Volumen Final	50 µl

El templado siempre se añadió en un lugar aparte diferente del área exclusiva del PCR.

Oligonucleótidos utilizados para la primera reacción de PCR:

ED3            5' TTA GGC ATC TCC TAT GGC AGG AAG AAG CGG 3'

ED14          5' TCT TGC CTG GAG CTG TTT GAT GCC CCA GAC 3'

Oligonucleótidos usados en la segunda reacción de PCR:

ED5            5' ATG GGA TCA AAG CCT AAA GCC ATG TG 3'

ED12          5' AGT GCT TCC TGC TGC TCC CAA GAA CCC AAG 3'

Los dos pares de oligonucleótidos utilizados en los dos corrimientos del PCR fueron descritos previamente por Delwart y cols (1) y fueron proporcionados por el Departamento de Inmunología y Enfermedades Infecciosas de la Escuela de Salud Pública de Harvard . El programa de amplificación usado para la primera reacción de PCR con los oligonucleótidos ED3 y ED14 fué el siguiente:

PASO DE LA REACCIÓN	TEMPERATURA/TIEMPO
Desnaturalización inicial	94°C / 2 min
Desnaturalización	94°C / 1 min
Alineamiento	55°C / 1 min
Extensión	72°C / 1 min
Ir al paso 2 por 2 ciclos	
Desnaturalización	94°C / 15 sec
Alineamiento	55°C / 45 sec
Extensión	72°C / 1 min
Ir al paso 6 por 36 ciclos	
Extensión Final	72°C / 7 min

El programa de amplificación usado para la segunda reacción de PCR con los oligonucleótidos ED5 y ED12 fué el siguiente:

PASO DE LA REACCIÓN	TEMPERATURA/TIEMPO
Desnaturalización inicial	94°C / 2 min
Desnaturalización	94°C / 1 min
Alineamiento	57°C / 1 min
Extensión	72°C / 1 min
Ir al paso 2 por 2 ciclos	
Desnaturalización	94°C / 15 sec
Alineamiento	57°C / 45 sec
Extensión	72°C / 1 min
Ir al paso 6 por 32 ciclos	
Extensión Final	72°C / 7 min

Para el análisis de los productos de amplificación de PCR, se realizó un corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1.5 %. La detección de los

fragmentos amplificados se llevó a cabo mediante una tinción del gel con Bromuro de Etidio.

### **3.4. Clonación de los productos amplificados del virus por PCR**

En 65 de los pacientes, los productos de la amplificación se clonaron para caracterizar las secuencias de los nucleótidos en el vector TA pCR-2.1 presente en el estuche de : TOPO TA Cloning, [pCR2.1-TOPO] Invitogen, San Diego, CA).

El vector plasmídico (PCR. 2.1-TOPO) está linearizado y tiene una timina (T) en los extremos 3'. Ya que la Taq polimerasa tiene actividad de transferasa terminal y adiciona adeninas (A) en el extremo 3' de los productos de PCR, es necesario que el vector contenga una timina para que ocurra una ligación eficiente entre el vector y el producto de PCR.

#### **3.4.1. Reacción de ligación con el sistema TOPO TA cloning**

Se mezcló en un tubo eppendorf de 0.5 a 2 µl del producto de PCR con el vector TA en las siguientes cantidades, hasta obtener un volumen de 5 µl (se utilizó un control negativo)

1. 1.0 µl de Producto de PCR
2. Agua estéril hasta un volumen final de 3.0 µl
3. 1.0 µl de Vector Topo pCR

4. Las muestras se mezclaron y se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente (25°C), se colocaron los tubos en hielo y se procedió inmediatamente a la reacción de transformación

### 3.4.2. Transformación de *E. coli*

Se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante, se descongelaron las células competentes y se añadió a cada vial de células 2 µl de Beta-mercaptoetanol 0.5M:

1. Se añadió a cada vial 2 µl de la reacción de ligación y se mezcló gentilmente.
2. Se incubó en hielo por 30 minutos.
3. Se calentaron las células por espacio de 30 segundos a 42°C sin agitación.
4. Inmediatamente se transfirieron los tubos al hielo y se incubaron por espacio de 2 minutos.

5. Se añadió 250 µl del medio SOC ( 2% de triptona, 0,5% de extracto de levadura, 10 mM de NaCl, 2.5 mM de KCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM de MgSO<sub>4</sub> y 20 mM de glucosa a temperatura ambiente).
6. Se incubaron los tubos por 30 min a 37°C en agitación constante .
7. Se plaquearon 50 µl de cada transformación selectivas con ampicilina y X-Gal (medio LB: Luria-Bertani: Composición: 1.0% de triptona, 0.5% de extracto de levadura, 1.0% de NaCl, pH 7.0, para la solución de X-Gal, hacer una solución stock de 40 mg/ml, se disolvieron 400 mg X Gal en 10

ml de dimetilformamida, para añadir esta solución a las placas, se colocaron 40 µl de la solución stock en la placa LB )

8. Se incubaron toda la noche a 37°C
9. Se recolectaron sólo las colonias blancas o ligeramente azules para el análisis, que fueron las que contenían el producto de PCR clonado .

#### Análisis de las clonas positivas:

1. Se tomaron las colonias blancas y se cultivaron en el medio LB con ampicilina
2. Se aisló el ADN plasmídico usando un estuche de QIAGEN.
3. Se digirió el plásmido con enzimas de restricción ( Eco RI )para determinar si contenía el producto de PCR.
4. Como método alternativo se determinó si el plásmido contenía el inserto mediante una reacción de PCR.

#### Procedimiento para el método alternativo:

Se preparó un cocktail de PCR como se muestra a continuación:

REACTIVO	VOLUMEN
Amortiguador de PCR 10X (MgCl <sub>2</sub> )	2 µl
dNTPs mix (d ATP, d GTP, d CTP, d TTP)	3.2 µl
Oligonucleótidos o Iniciadores (Es7)	0.4 µl
Oligonucleótidos o Iniciadores (Es8)	0.4 µl
H <sub>2</sub> O destilada	13.85 µl
Taq DNA polimerasa	0.15 µl
Volumen Final	20 µl

Se tomó una colonia blanca y ésta fué resuspendida en los 20 µl del coctel de PCR, se siguió el siguiente programa de amplificación:

PASO DE LA REACCIÓN	TEMPERATURA/TIEMPO
Desnaturalización inicial	94°C / 2 min
Desnaturalización	94°C / 1 min
Alineamiento	55°C / 1 min
Extensión	72°C / 1 min
Ir al paso 2 por 20-30 ciclos	
Extensión final	72°C / 7 min

Para el análisis del plásmido en el coctail de PCR, se realizó un corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1.5 %. La detección de los fragmentos amplificados se llevó a cabo mediante una tinción del gel con Bromuro de Etidio.

### 3.4.3. Obtención del ADN Plasmídico

El ADN plasmídico se purificó con el estuche QIAprep Spin Miniprep, (QIAGEN, Chatsworth, CA) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. El QIAprep miniprep usa el método de lisis alcalina de Birnboim y Doly, donde la bacteria es lisada bajo condiciones de lisis alcalina y el lisado es subsecuentemente neutralizado y ajustado en condiciones de altas concentraciones de sales en un solo paso, listo para la purificación en la membrana de silica gel. El procedimiento consiste de tres pasos básicos:

- Preparación y eliminación del lisado bacteriano.
- Adsorción del ADN en la membrana del QIAprep.
- Lavado y elución del ADN plasmídico.

Este protocolo está diseñado para la purificación de 20 µg de ADN plasmídico de 1.5 ml de un cultivo de *E. coli* en medio LB. La técnica utilizada fue la siguiente:

1. Se centrifugó el medio líquido de LB conteniendo *E. coli* por 5 minutos a 10,000 rpm.
2. El sedimento es resuspendió en 250 µl del buffer P1 (el Buffer P1 es un buffer de resuspensión [50 mM Tris/HCl (pH 8.0), 10mM EDTA, 100µg/ml RNasa A] y se transfirió a un tubo de microcentrifuga.
3. Se añadió 250 µl. de buffer P2 [ 200 mM NaOH, 1% SDS (pH 13.2) mezcló gentilmente invirtiendo los tubos 4-6 veces,( ya que no se recomienda agitar en un vortex porque se fragmenta el ADN genómico). En este paso las bacterias se lisaron y se formó una solución viscosa y ligeramente clara, se dejó reposar por un tiempo no mayor de 5 min.
4. Se añadieron 350 µl de buffer N3, (éste es un buffer de neutralización, su composición es: 3.0 M de acetato de potasio pH4.3) se invirtió el tubo inmediatamente y gentilmente por 4-6 veces. En este paso se precipitaron las proteínas y el ADN genómico.
5. Se centrifugó por 10 minutos.
6. Durante la centrifugación se colocaron las columnas de QIAprep en tubos de colección de 2 ml.
7. Se colocó el sobrenadante del paso No.5 dentro de las columnas QIAprep

8. Se centrifugó por 30-60 segundos, se descartó el líquido que quedó en el tubo de colección. En este paso, el ADN plasmídico se adhirió a la columna.
9. Se lavó el ADN plasmídico pasando por la columna 0.5 ml de buffer PB (solución acuosa de isopropanol e hidróxido de guanidina) y se centrifugó por 30-60 segundos.
10. Se lavaron nuevamente las columnas de QIAprep con 0.75 ml de buffer PE (éste es un buffer de lavado, su composición es: Tris/HCl) y se centrifugó por 30-60 segundos.
11. Se descartó el líquido que quedó en el tubo de colección y se centrifugó por 1 minuto adicional para remover residuos del buffer de lavado.
12. Se colocaron las columnas en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml limpios. Para eluir el ADN se añadió 50  $\mu$ l del buffer EB (buffer de elución 10mM Tris/HCl, pH8.5.) o agua destilada en el centro de la membrana de sílica, se reposó por 1 minuto y se centrifugó por 1 minuto. El ADN plasmídico obtenido, se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %. La visualización se llevó a cabo mediante una tinción del gel con Bromuro de Etidio.

### 3.5. Secuenciación de Genes del VIH-1

A cada una de las clonas se le determinó la secuencia de nucleótidos de ambas cadenas mediante el procedimiento enzimático establecido por Sanger( ). Este

se realizó en un secuenciador automático ABI 373A (Applied Biosystems, Foster City, CA). Se emplearon para la secuenciación los oligonucleótidos descritos previamente ED5, ED12, ES7, ES8, ED31 y ED33 (1). Se diseñaron dos oligonucleótidos adicionales para obtener al menos dos secuencias independientes a lo largo de la región V1-V5, estos fueron E36B y E46B (Oligonucleótidos E36B y E46B fue fabricado por Keystone Labs. BIOSOURCE INTERNATIONAL)

Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados fueron los siguientes:

OLIGONUCLEÓTIDOS	SECUENCIAS DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS
ED5	5'- ATG GGA TCA AAG CCT AAA GCC ATG TG -3'
ED12	5'- AGT GCT TCC TGC TGC TCC CAA GAA CCC AAG-3'
Es7	5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT CTG TTA AAT GGC AGT CTA GC-3'
Es8	5'- CAG GAA ACA GCT ATG ACC CAC TTC TCC AAT TGT CCC TCA-3'
ED31	5'- CCT CAG CCA TTA CAC AGG CCT GTC CAA AG-3'
ED33	5'- TTA CAG TAG AAA AAT TCC CCT C-3'
E36B	5'-CTG TGT AAT GAC TGA GGT GTT A-3'
E46B	5'-CTA CTT CTT CTT CTG CTA G-3'

Para cada reacción se utilizó el siguiente protocolo:

REACTIVOS	CANTIDAD
Dye Terminator	8 µl
Primer	0.3 µl (10 pmol)
H <sub>2</sub> O destilada	9.7 ml
Template	2 µl
Volumen final	20 µl

El programa utilizado para la secuenciación se describe a continuación:

PASO DE LA REACCIÓN	TEMPERATURA/TIEMPO
Desnaturalización inicial	94°C / 2 min
Desnaturalización	96°C / 10 sec
Alineamiento	50°C / 5 sec
Extensión	60°C / 4 sec
Ir al paso 2 por 24 ciclos	
Al finalizar el programa	4°C

### 3.5.1. Precipitación con Etanol

Se llevó a cabo en tubos nuevos de microcentrífuga de 1.5 ml de la siguiente manera:

1. A cada tubo se le adicionó 2.0 µl de Acetato de sodio 3M, pH 4.6 y 50 µl de etanol al 95%.
2. Se transfirió el contenido de los tubos de reacción de secuenciación (20µl) a los tubos de microcentrífuga conteniendo la solución anterior. Se agitó en vortex y se colocaron en hielo por 10 minutos.
3. Se centrifugó a 14,000 rpm por 15 minutos.
4. Cuidadosamente se decantó el sobrenadante.
5. Se lavó el sedimento con añadir 250 µl de etanol al 70% y se centrifugó por 10 minutos a 14,000 rpm.
6. Cuidadosamente se aspiró el sobrenadante.
7. Se secó el sedimento en una centrifuga de vacío por 15 minutos.

### 3.6. Análisis Filogenético y Estadístico

Las secuencias de nucleótidos fueron ensambladas y editadas con el programa Sequencher v.3 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI). Se realizaron alineaciones múltiples del ADN con CLUSTAL W, v.1.7 (3). Los análisis filogenéticos se realizaron usando un programa del PHYLIP, v3.5 (4) y CLUSTAL W, v.1.7 (20). El apareamiento de las distancias evolutivas de las secuencias nucleotídicas se computaron por el programa DNA DIST dentro del modelo de dos parámetros de Kimura. El parámetro de las proporciones de transición/transversión fue de 1.5.

Los programas de NJplot y Tree View fueron usados para dibujar los árboles filogenéticos (5,6). Se usó un programa de identificación de recombinantes (RIP) para la búsqueda de sitios potenciales de recombinación a lo largo de las muestras estudiadas (7). El nivel de significancia de la diversidad de nuestras muestras y de las muestras de referencia se evaluó de acuerdo a la prueba t student.

## Capítulo 4

### RESULTADOS

El diseño del estudio poblacional se realizó basándonos en los análisis de datos epidemiológicos de la infección por VIH-1 en México (1,25). El número de muestras de cada sitio geográfico fue proporcional al número total de infecciones por VIH-1 reportadas para cada área y al modo de transmisión predominante del VIH-1 en esa región.

Se obtuvieron 67 muestras al azar de sangre periférica de pacientes infectados con el VIH-1 de México para este estudio., provenientes de 5 regiones geográficas del país, representadas por 21 muestras de la ciudad de México, 10 de Nuevo León, 11 de Jalisco, 12 de Puebla y 13 de Yucatán.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

#### 4.1. Obtención de ADN de 67 muestras obtenidas de pacientes infectados con VIH-1

El ADN fue obtenido a partir de sangre periférica de pacientes infectados con VIH de la Ciudad de México, Nuevo León, Jalisco, Puebla y Yucatán, el cuál se cuantificó por espectrofotometría a una longitud de onda de 260 nm y su integridad se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 1% y tinción con bromuro de etidio, como se muestra en las figuras 9 – 13.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18



**Fig. 9a** .- Electroforesis en gel de agarosa del ADN genómico obtenido de sangre periférica de 1-13 pacientes infectados con VIH de la Ciudad de México. Gel de agarosa al 1.0 % teñido con bromuro de etidio. Marcador de peso molecular 1 kb (M), del carril número 1-5 corresponde a un control positivo de ADN y 4 diluciones del ADN (1:2, 1:4, 1:8 y 1:16 respectivamente) y los carriles del 6-18 corresponde a las muestras 1-13 de la ciudad de México

M 1 2 3 4 5 6 7 8



**Fig. 9b** .- Electroforesis en gel de agarosa del ADN genómico obtenido de sangre periférica de 14-21 pacientes infectados con VIH de la Ciudad de México. Gel de agarosa al 1.0 % teñido con bromuro de etidio. Marcador de peso molecular 1 kb (M), los carriles del 1-8 corresponden a las muestras 14-21 de los pacientes infectados de la Ciudad de México



**Fig.10 .-** Electroforesis en gel de agarosa del ADN genómico obtenido de sangre periférica de pacientes infectados con VIH del estado de Nuevo León. Gel de agarosa al 1.0 % teñido con bromuro de etidio. Marcador de peso molecular 1 Kb (M), el carril 1 corresponde a un control C(-) y los carriles del 2-11 son las muestras de 10 pacientes de Nuevo León.

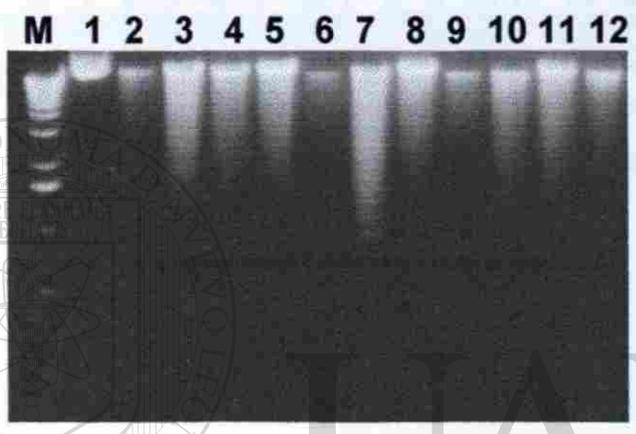
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



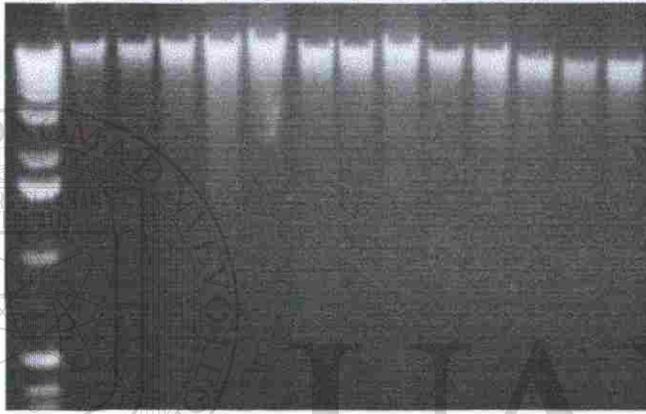
**Fig 11** .- **Electroforesis en gel de agarosa del ADN genómico obtenido de sangre periférica de pacientes infectados de Jalisco.** Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Marcador de peso molecular 1Kb (M) , el carril No. 1 corresponde a un control positivo y los carriles 2-12 corresponden a las 11 muestras de los pacientes Jalisco.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



**Fig. 12 .-** Electroforesis en gel de agarosa de ADN genómico obtenido de sangre periférica de pacientes infectados del estado de Puebla. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Marcador de peso molecular 1 Kb (M). El número de carril corresponde a las 12 muestras obtenidas de Puebla

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13



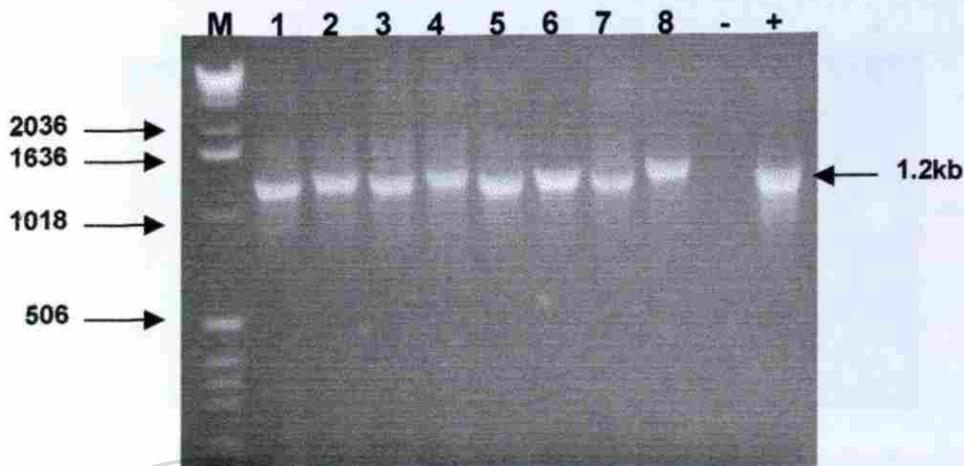
**Fig13 .-** Electroforesis en gel de agarosa del ADN genómico obtenido de sangre periférica de pacientes infectados con VIH del estado de Yucatán. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Marcador de peso molecular 1 Kb (M), los carriles del 1-13 corresponden a las 13 muestras de los pacientes de Yucatán.

## 4.2. Amplificación de las Secuencias del VIH-1 por PCR

Para la amplificación de la región del gene *env* que codifica a la glicoproteína gp120 se utilizaron las condiciones previamente establecidas por Delwart.(18, 19) El PCR en nido (nested) fue usado para amplificar la región C2-V5 del gene *env*.

En las 67 muestras de las cinco regiones analizadas se obtuvo un producto amplificado de 1.2kb como se muestran en las figuras 14 – 18, los cuales fueron visualizados por electroforesis en agarosa al 1.5% y tinción con bromuro de etidio, utilizándose un marcador de peso molecular de 1kb y controles positivos y negativos de la reacción.

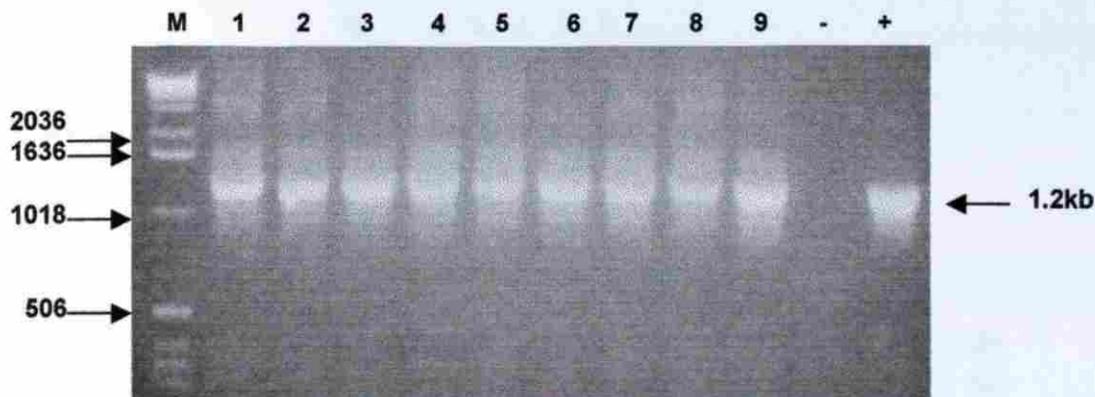
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



**Fig14a.- Amplificación del gene Env de VIH en ADN genómico de sangre periférica por PCR en nido (nested) en muestras de la Ciudad de México.** Gel agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio. Marcador de peso molecular 1 Kb (M), los carriles 1-8 corresponden a las muestras de la Ciudad de México y presentan un producto amplificado de 1.2 kb, control negativo (-) y control positivo (+).



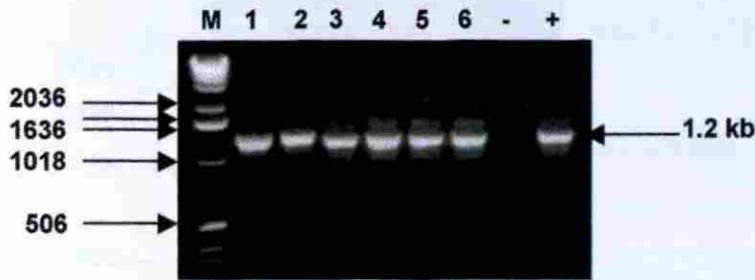
**Fig 14b .- Amplificación del gene Env de VIH en ADN genómico de sangre periférica por PCR en nido (nested) en muestras de la Ciudad de México.** Gel agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio. Marcador de peso molecular 1Kb (M), los carriles 1-9 corresponden a las muestras 9-17 de la Ciudad de México y presentan un producto amplificado de 1.2 kb, control negativo (-) y control positivo (+).



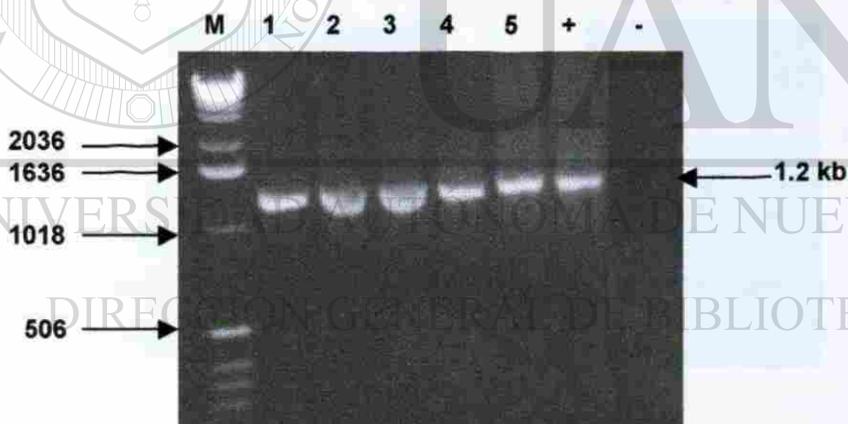
**Fig15a** .- Amplificación del gene Env de VIH en ADN genómico de sangre periférica por PCR en nido (nested) en muestras de Nuevo León. Gel agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio. Marcador de peso molecular 1 Kb (M), los carriles del 1-9 corresponden a muestras de Nuevo León y presentan un producto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



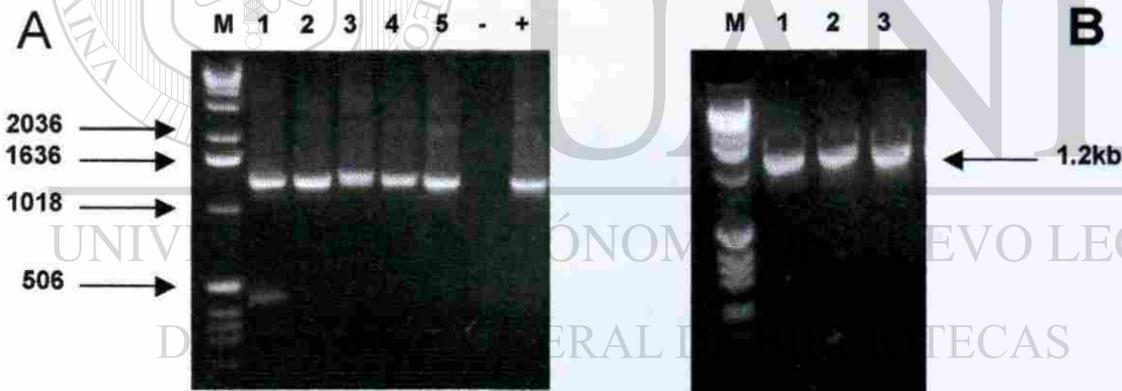
**Fig16a.- Amplificación del gene Env de VIH en ADN genómico de sangre periférica por PCR en nido (nested) en muestras de Jalisco.** Gel agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio. Marcador de peso molecular (M), los carriles 1-6 corresponden a las muestras 1-6 de Jalisco y presentan un producto amplificado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



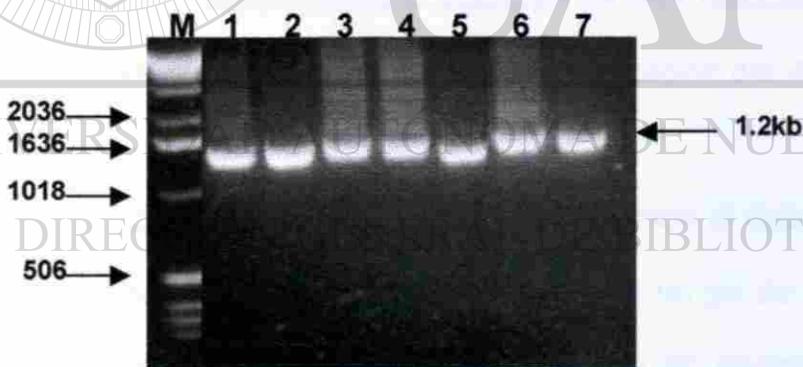
**Fig. 17a.- Amplificación del gene Env de VIH en ADN genómico de sangre periférica por PCR en nido (nested) en muestras de Puebla.** Gel agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio. Marcador de peso molecular 1 kb (M), los carriles 1-4 corresponden a las muestras 1-4 de Puebla y presentan un producto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



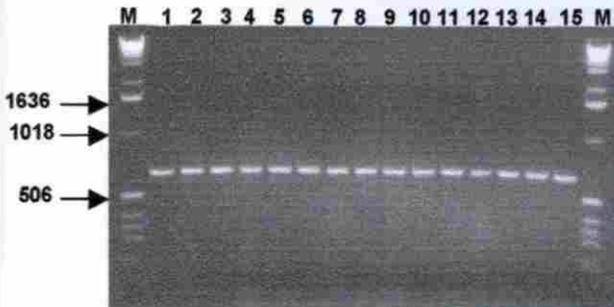
**Fig18b.- Amplificación del gene Env de VIH en ADN genómico de sangre periférica por PCR en nido(nested) en Muestras de Yucatán.** Gel agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio. Marcador de peso molecular 1 kb (M), los carriles 1-7 corresponden a las muestras 7-13 de Yucatán que presentan un producto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

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

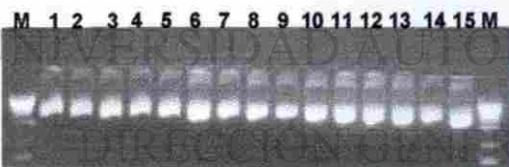
En 65 de las 67 muestras analizadas en este estudio, los productos de la amplificación fueron clonados para caracterizar las secuencias de los nucleótidos en el vector TA pCR-2.

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).

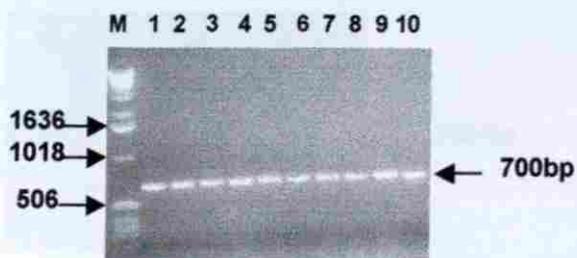
Para visualizar si el gene *Env* fue clonado usando el sistema de Vector T por PCR a partir de colonias transformadas, se utilizó un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio, observándose que las 65 muestras clonadas de ADN de los pacientes infectados con VIH, mostraron un producto amplificado 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

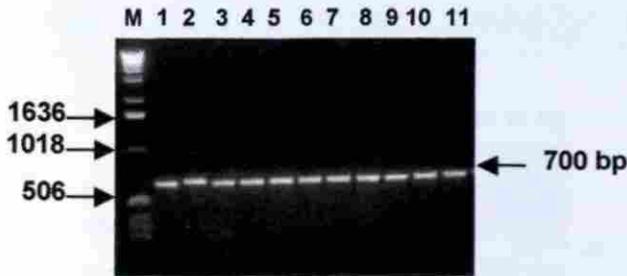


**Fig 20a Determinación del gene Env clonado usando el sistema de Vector T por PCR a partir de colonias transformadas.** Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. Marcador de peso molecular de 1kb (M). Los carriles 1-10 son colonias transformadas que muestran un producto amplificado de 700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

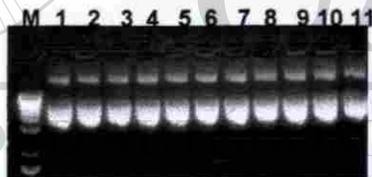
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



**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.

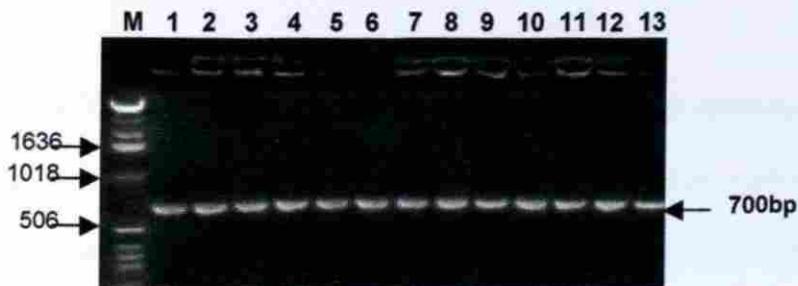
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**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

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13



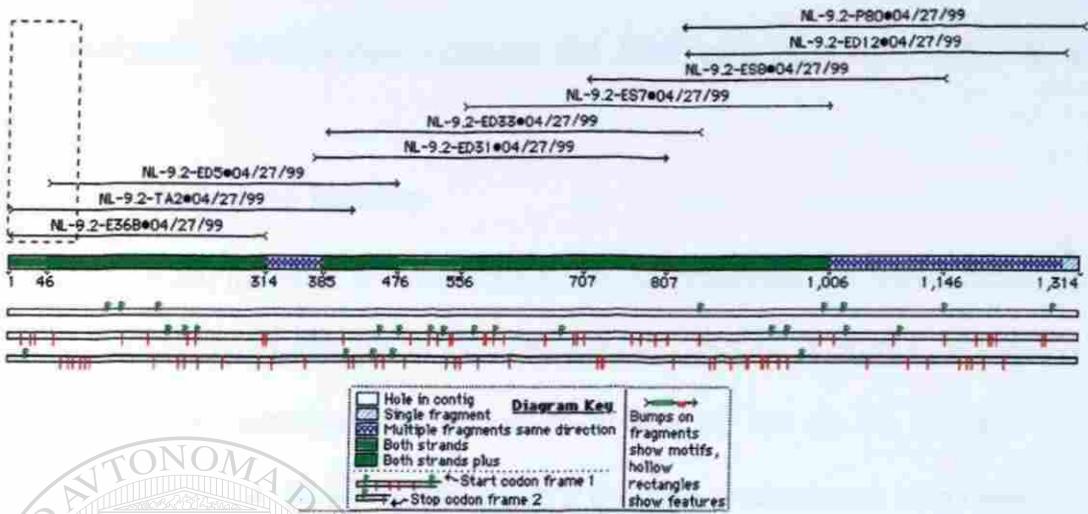
**Fig 23b.- Minipreparación de Plásmido obtenido de colonias transformadas con el Vector T y el producto de PCR de 700 pb .** Marcador de peso molecular 1kb (M). Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. En los carriles 1-13 se muestra el ADN plasmídico de las muestras 1-13 del estado de Yucatán

#### 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

CCACACACACACACAGAGAGGTATACATATAGACCAGGAGAGCATTTTATGCACAGGGAGCGTATAGGA  
 CCACACACACACACAGAGAGGTATACATATAGACCAGGAGAGCATTTTATGCACAGGGAGCGTATAGGA  
 CCACACACACACACAGAGAGGTATACATATAGACCAGGAGAGCATTTTATGCACAGGGAGCGTATAGGA  
 1630 1640 1650 1660 1670 1680 1690 1700  
 CCACACACACACACAGAGAGGTATACATATAGACCAGGAGAGCATTTTATGCACAGGGAGCGTATAGGA

P N N N T A R R S I H I G P G R A F Y A T G D V I G

ATATAGGACCCAGGAGAGAGCAT  
 ATATAGGACCCAGGAGAGCAT



CATATAGGACCCAGGAGAGCAT  
 CATATAGGACCCAGGAGAGCAT



**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 delección 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.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



#### 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.



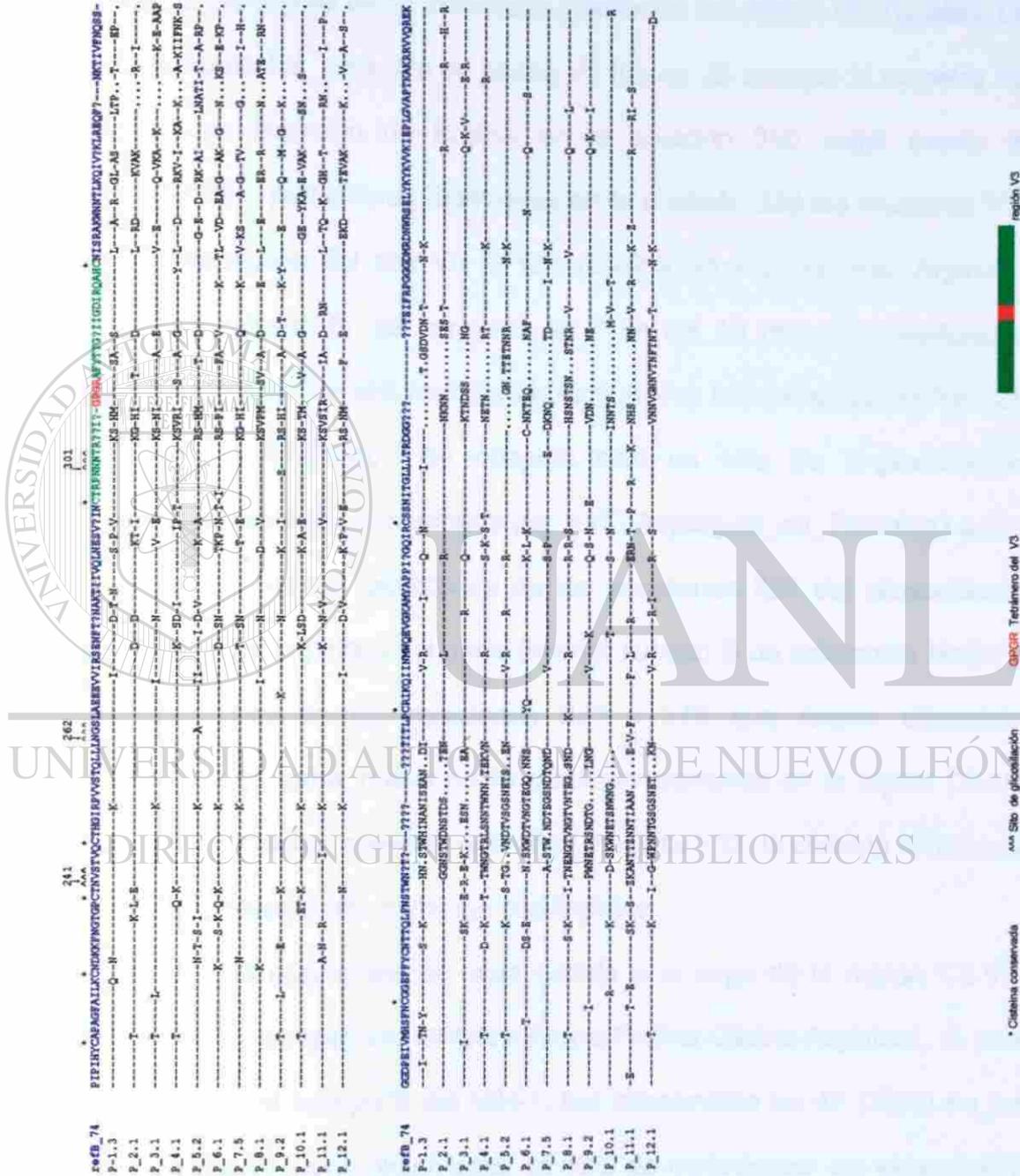
#### 4.4.1.4. Estado de Puebla.

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.

Alineamiento de las Secuencias Proteicas de VIH-1 Env (region C2-V5 del gp120) Muestras de Puebla



\* Cladista conservada

800aa Sitio de glicosilación

800aa Tratamiento del V3

region V3

#### 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 .

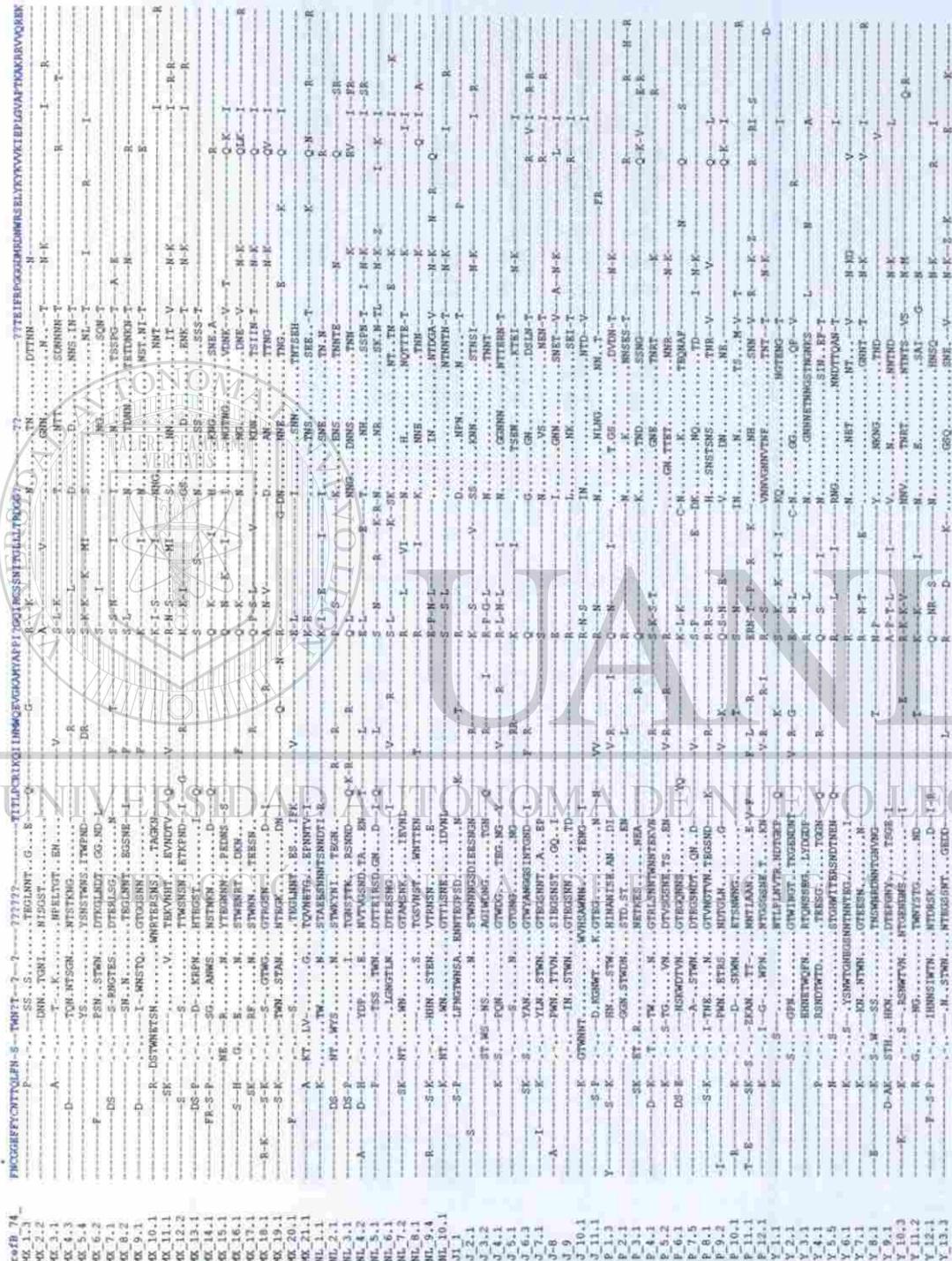
Al analizar las secuencias de cada estado a lo largo de la región C2-V5, encontramos que el tetrapéptido GPGR (Glicina-Prolina-Glicina-Arginina), el cual es predominante en el subtipo B del VIH-1, fue conservado en 47 (70%) de las muestras estudiadas. Fueron observadas un 30% de mutaciones en esta región: 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)





Figura 31b

Alineamiento de la Secuencia proteica de VIH-1 env (región C2-V5 del gp120). Muestras de 5 estados de México (parte 2)



región V3

GPCR Tentarnero del V3

Caselina conservada

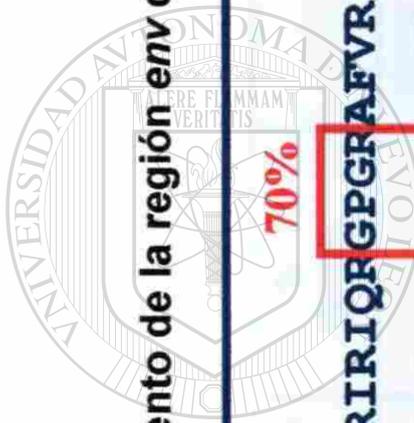


región V3

Tabla 6 .Alineamiento de la región env del asa V3

<b>HXB2:</b>	<b>CTRPNNTRKRIRIQGPGRAFRIG-KIGNMRQAHC</b>
<b>Mx</b>	---?---S-H...---YAT-?I---DI---
<b>NL</b>	---S-?---S-?---YAT-DI---DI---
<b>J</b>	---S-?---S-?---YAT-?I---DI---
<b>P</b>	---S-?---S-?---YAT-?I---DI---
<b>Y</b>	---?---H...---YAT-?I---DI---

Mx: Cd. de México  
 J: Jalisco  
 NL: Nuevo León  
 Y: Yucatán  
 P: Puebla



70%

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
 DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

JUAN

**Tabla 7. Variación en la región env del asa V3**

Estados	Muestras de estudio	% GPR	Variaciones
Cd. de México	21	76	<b>GPGG, GPGS, GPGA,</b> <b>GWGR, APGR</b>
Nuevo León	10	80	<b>GPGS, GPRR</b>
Jalisco	11	64	<b>GPGS, GPGK, HPGG</b>
Puebla	12	75	<b>GPGS, RPGR</b>
Yucatán	13	54	<b>GPGS, GPEG, GPGG,</b> <b>APGR</b>

#### **4.5. Análisis Filogenético y Estadístico de Todas las muestras provenientes de 5 estados.**

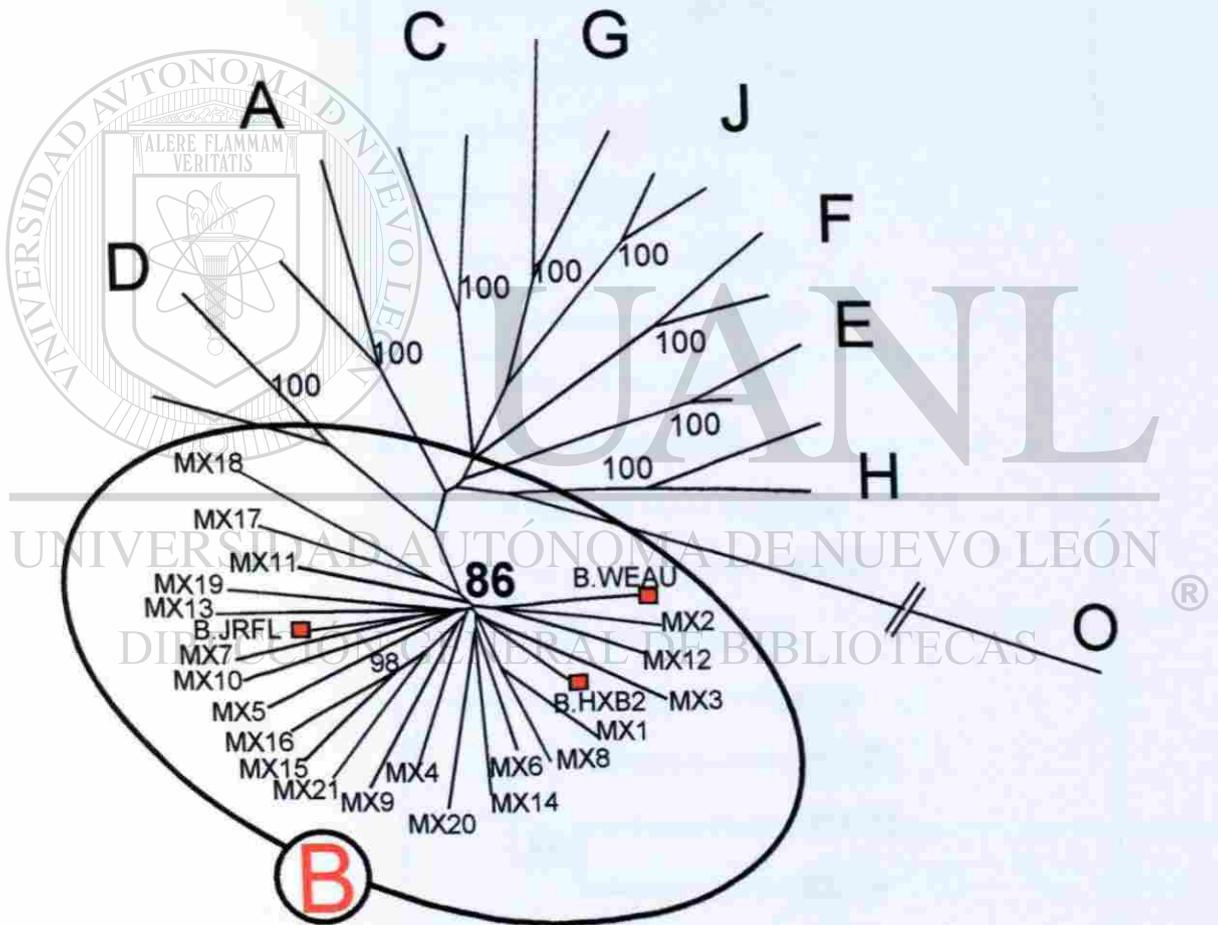
Los análisis filogenéticos se realizaron usando un programa del PHYLIP, 3.5 (21) y CLUSTAL W, v.1.7 (20). Los programas de NJplot y Tree View fueron usados para dibujar los árboles filogenéticos (22,23).

Los análisis filogenéticos revelaron que todas las muestras de México en este estudio se encontraban entre las variantes del VIH-1 subtipo B. El valor obtenido de todas nuestras muestras fue de 95% (valor bootstrap) después de haberlas repetido 100 veces. Los valores obtenidos en cada uno de los estados fue: 86 % para la Ciudad de México (figura 32 a y b), 90 % en Nuevo León (figura 33 a y b), 93 % en Jalisco (figura 34 a y b), 95 % en Puebla (figura 35 a y b) y finalmente 90 % para el estado de Yucatán (figura 36 a y b), siendo estos valores altamente significativos.

No se encontraron evidencias de subgrupos geográficos dentro de este subtipo entre las secuencias mexicanas en base a los análisis de la región C2-V5 del gen *env* como se muestra en las figuras 37a y b. Los análisis filogenéticos amplificados, incluyendo las referencias de las secuencias del subtipo B de la base de datos del GenBank (10) no revelaron ninguna asociación específica con la de las secuencias mexicanas (datos no mostrados). Los pares relacionados epidemiológicamente de las muestras de México (MX15/MX16, J7/J9, NL7/NL10, Y6/Y10) fueron filogenéticamente confirmados con valores porcentuales altos (valor bootstrap).

Figura 32a

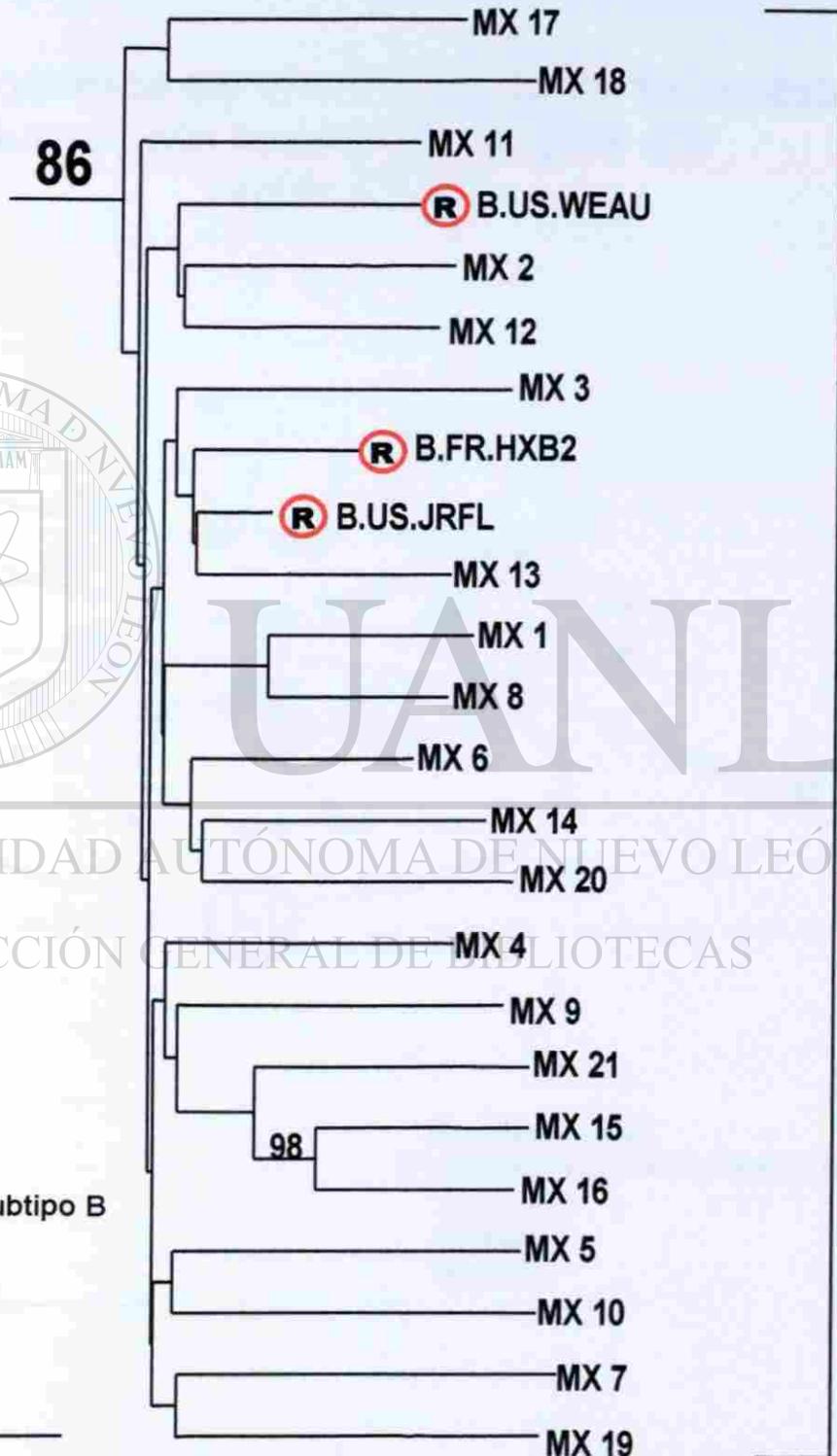
Relación Filogenética del VIH-1 obtenido de las muestras de la Ciudad de México basadas en el gene *env* region C2-V5



MX México  
■ Referencias VIH-1 subtipo B  
B.WEAU  
B.HXB2  
B.JRFL

Figura 32b

Relación Filogenética del VIH-1 obtenido de las muestras de la Ciudad de México basadas en el gene *env* region C2-V5



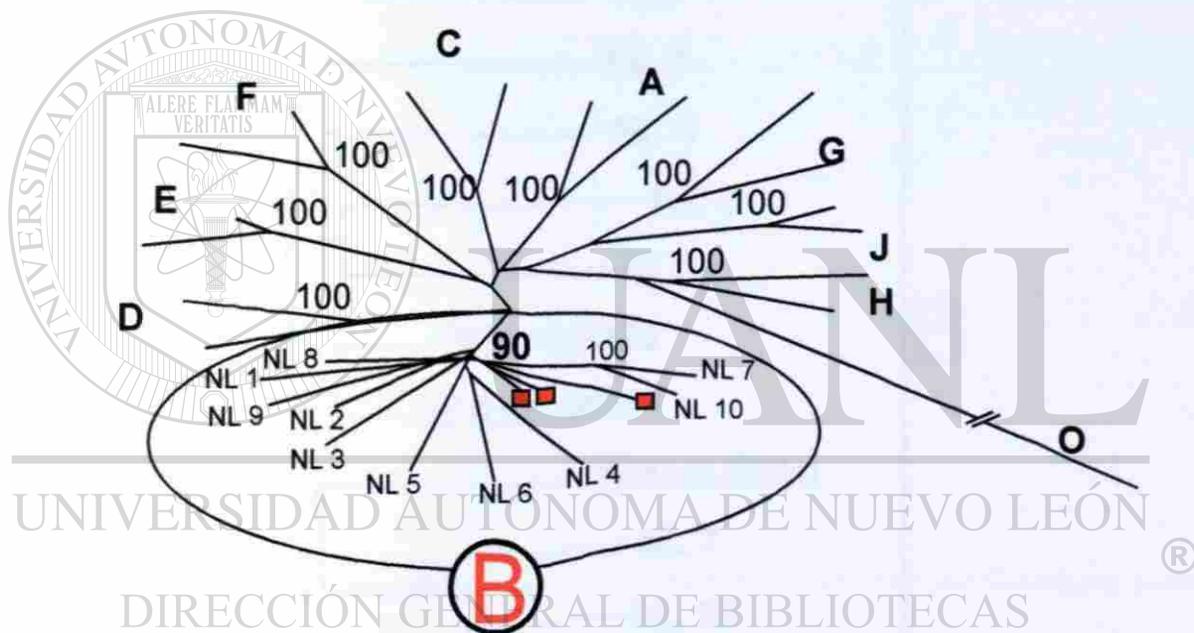
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

MX México  
**R** Referencias VIH-1 subtipo B  
B.US.WEAU  
B.FR.HXB2  
B.US.JRFL

0.1

Figura 33a

Relación Filogenética del VIH-1 obtenido de las muestras de Nuevo León basadas en el gene *env* región C2-V5

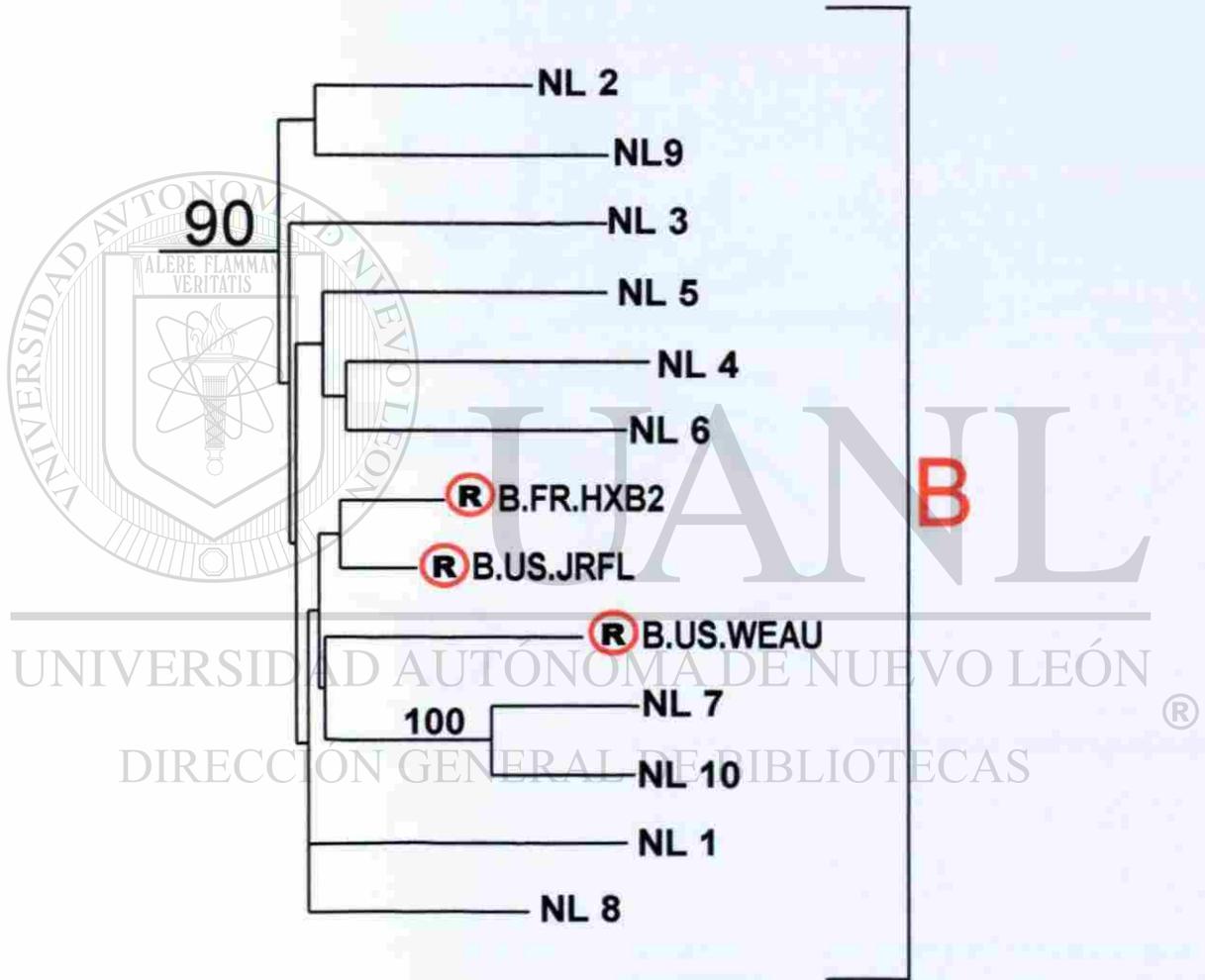


- NL Nuevo León
- Referencias VIH-1 subtipo B
- B.WEAU
- B.HXB2
- B.JRFL

0.1

Figura 33b

Relación Filogenética del VIH-1 obtenido de las muestras de Nuevo León basadas en el gene *env* región C2-V5



NL Nuevo León

**(R)** Referencias VIH-1 subtipo B

B.US.WEAU

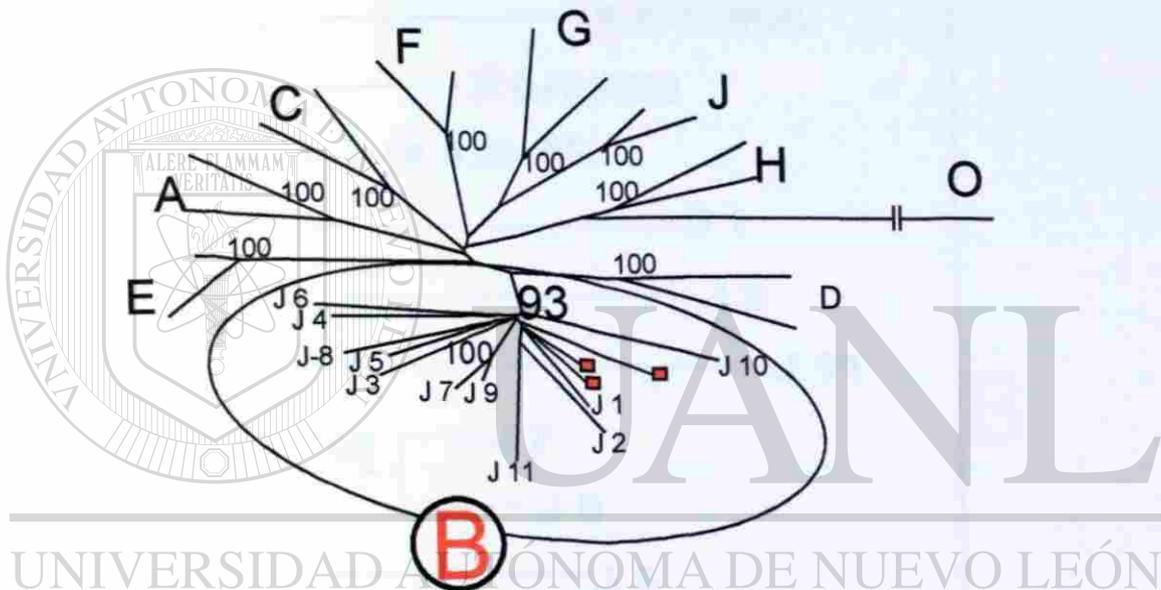
B.FR.HXB2

B.US.JRFL

0.1

Figura 34a

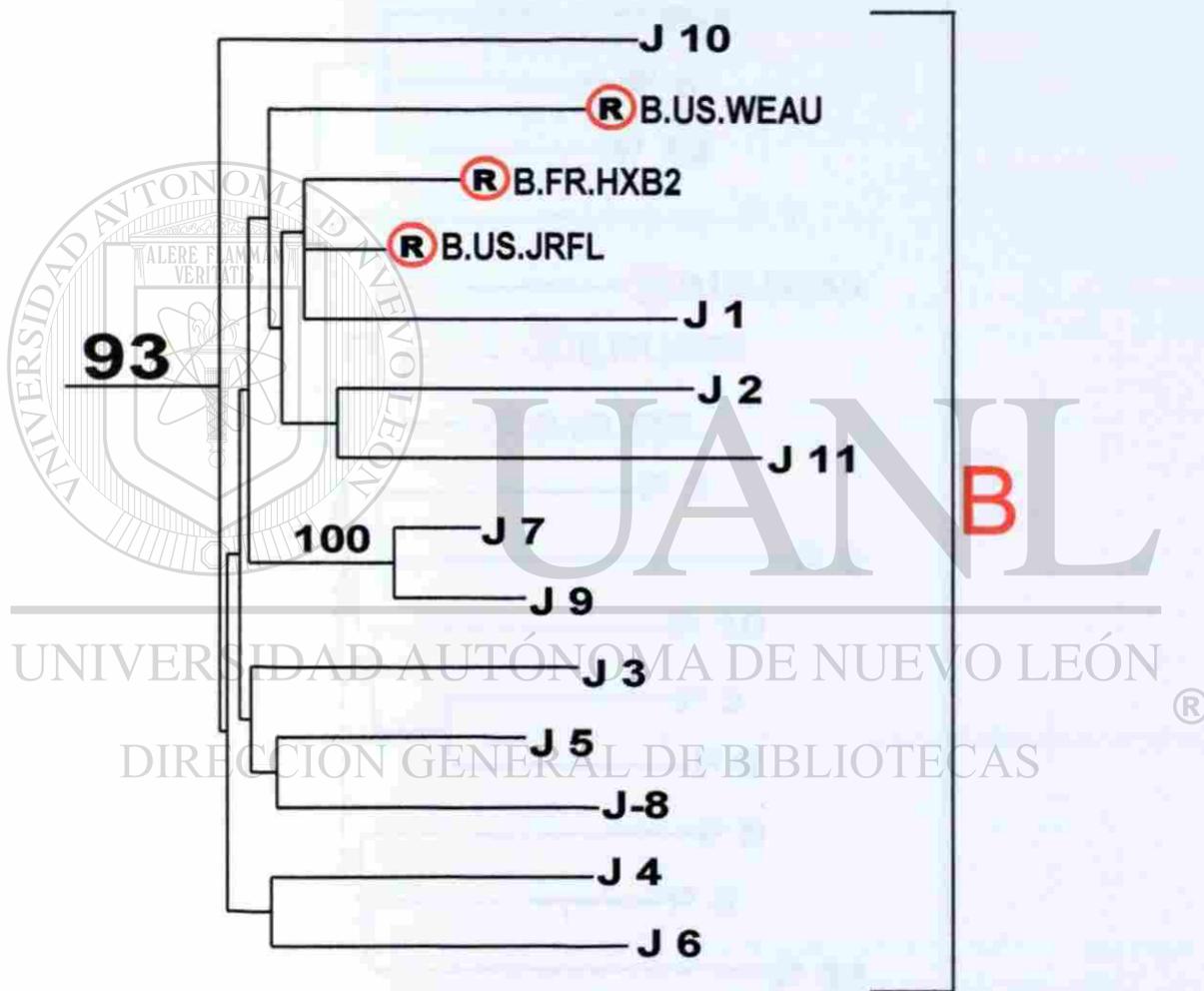
Relación Filogenética del VIH-1 obtenido de las muestras de Jalisco basadas en el gene *env* region C2-V5



J : Jalisco  
■ Referencias VIH-1 subtipo B  
B.WEAU  
B.HXB2  
B.JRFL

0.1

Figura 34b  
 Relación Filogenética del VIH-1 obtenido de las  
 muestras de Jalisco basadas en el gene *env*  
 region C2-V5



J: Jalisco

**(R)** Referencias VIH-1 subtipo B

B.US.WEAU

B.FR.HXB2

B.US.JRFL

0.1

Figura 35a

Relación Filogenética del VIH-1 obtenido de las muestras de Puebla basadas en el gene *env* región C2-V5

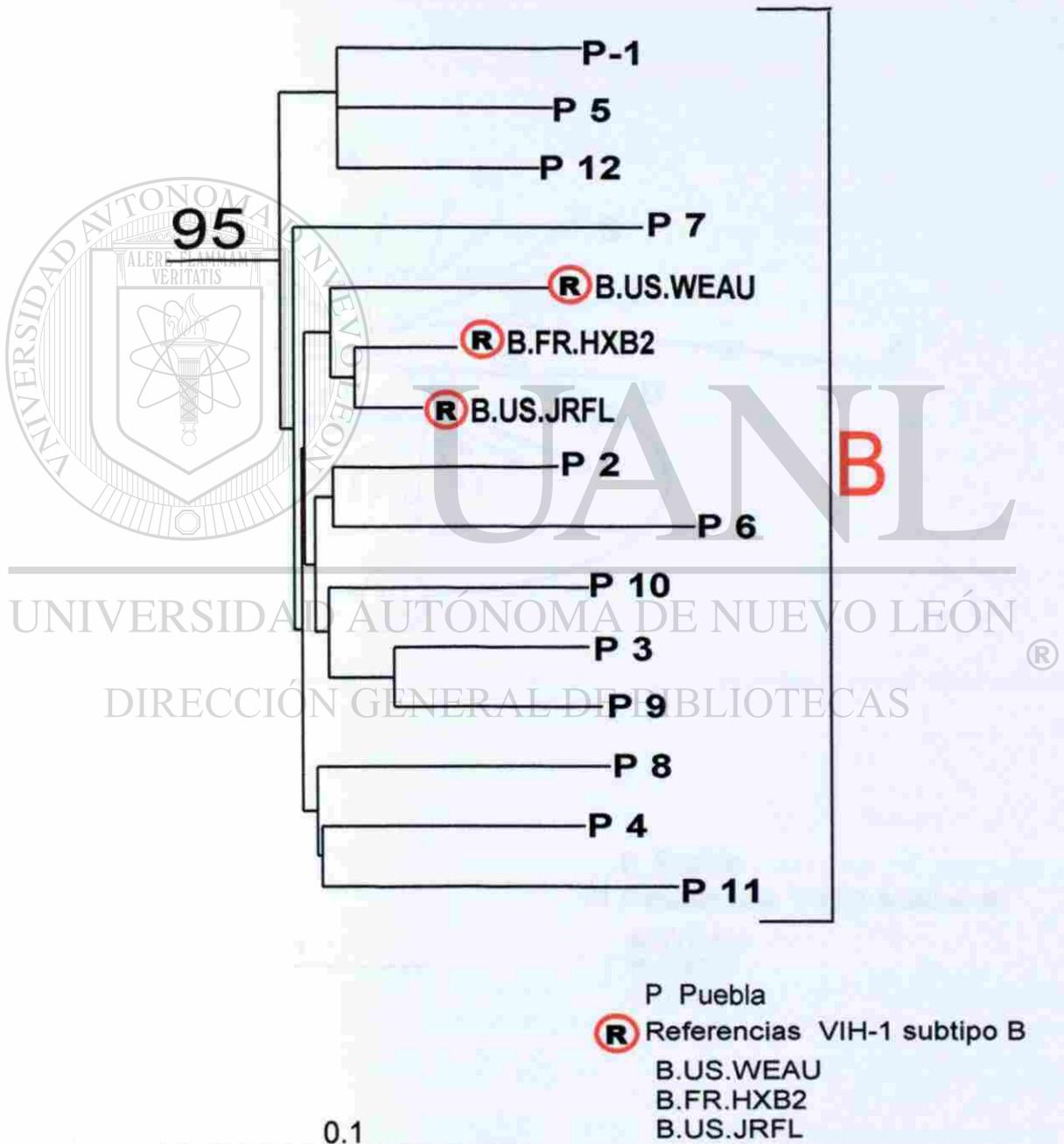
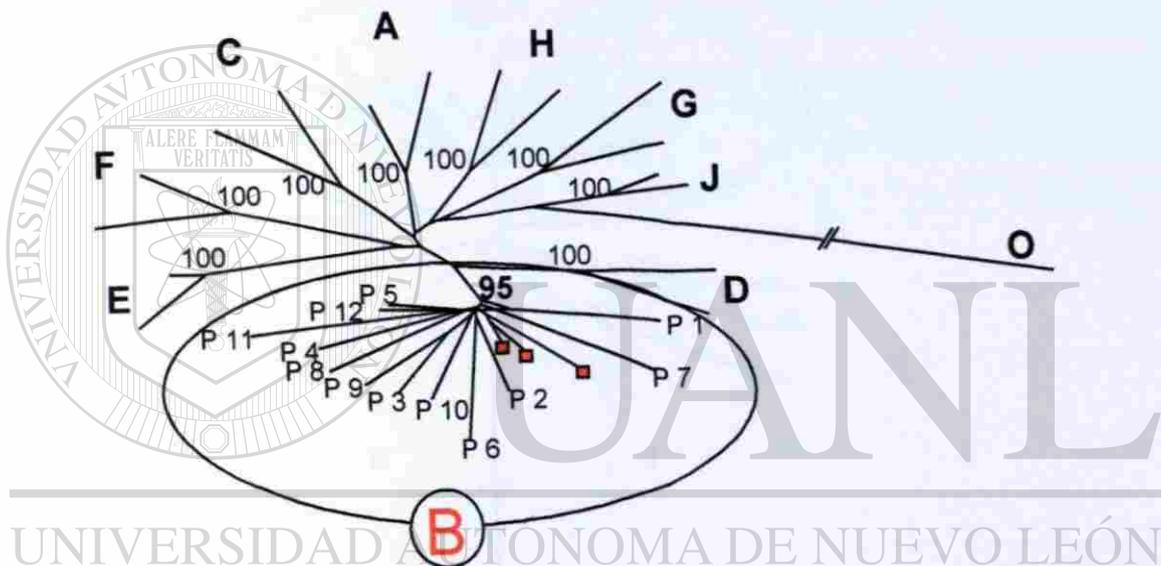


Figura 35b

Relación Filogenética del VIH-1 obtenido de las muestras de Puebla basadas en el gene *env* región C2-V5



P Puebla

■ Referencias VIH-1 subtipo B

B.WEAU

B.HXB2

B.JRFL

0.1

Figura 36a

Relación Filogenética del virus obtenido de las muestras de Yucatán basadas en el gene env región C2-V5

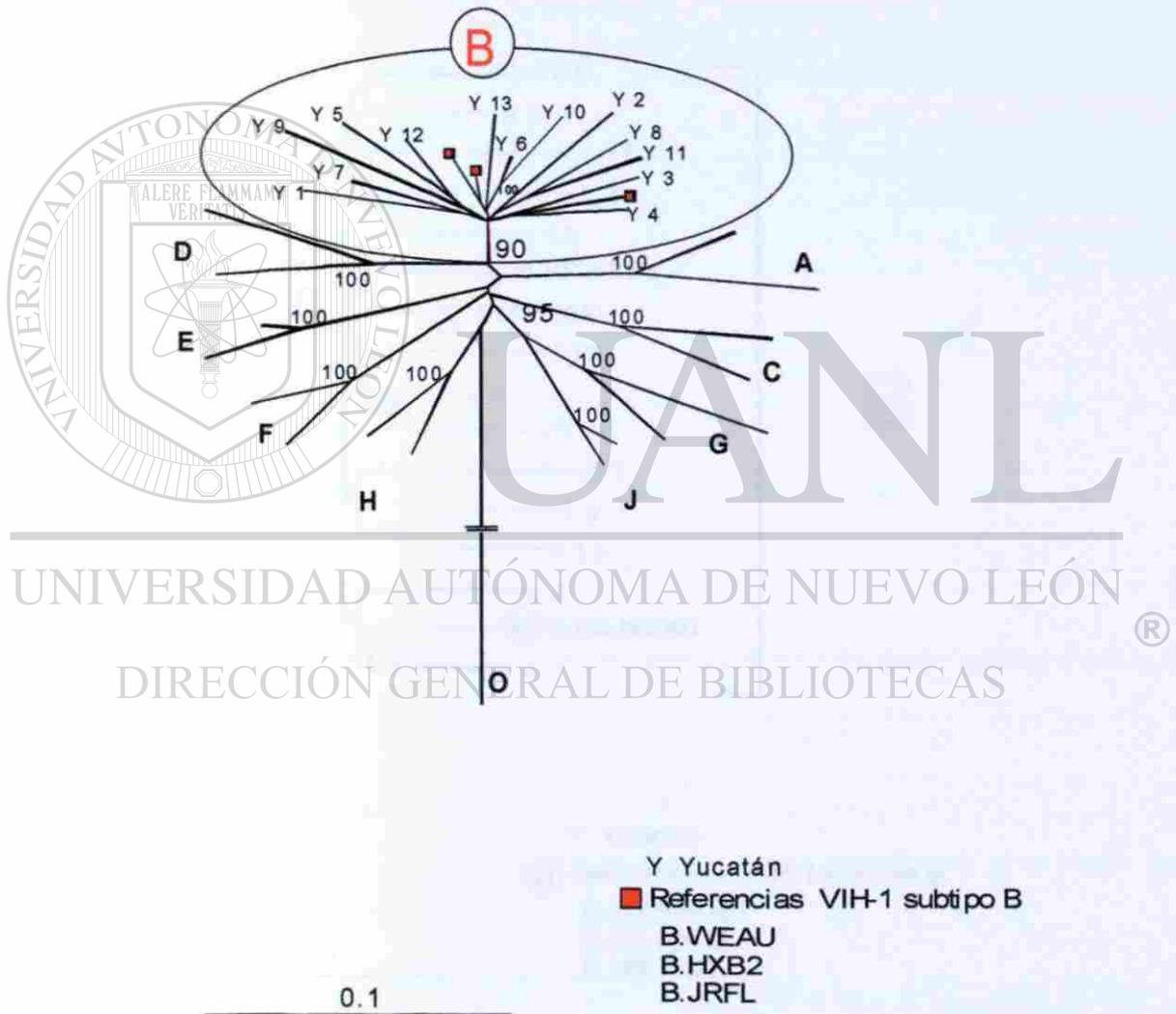
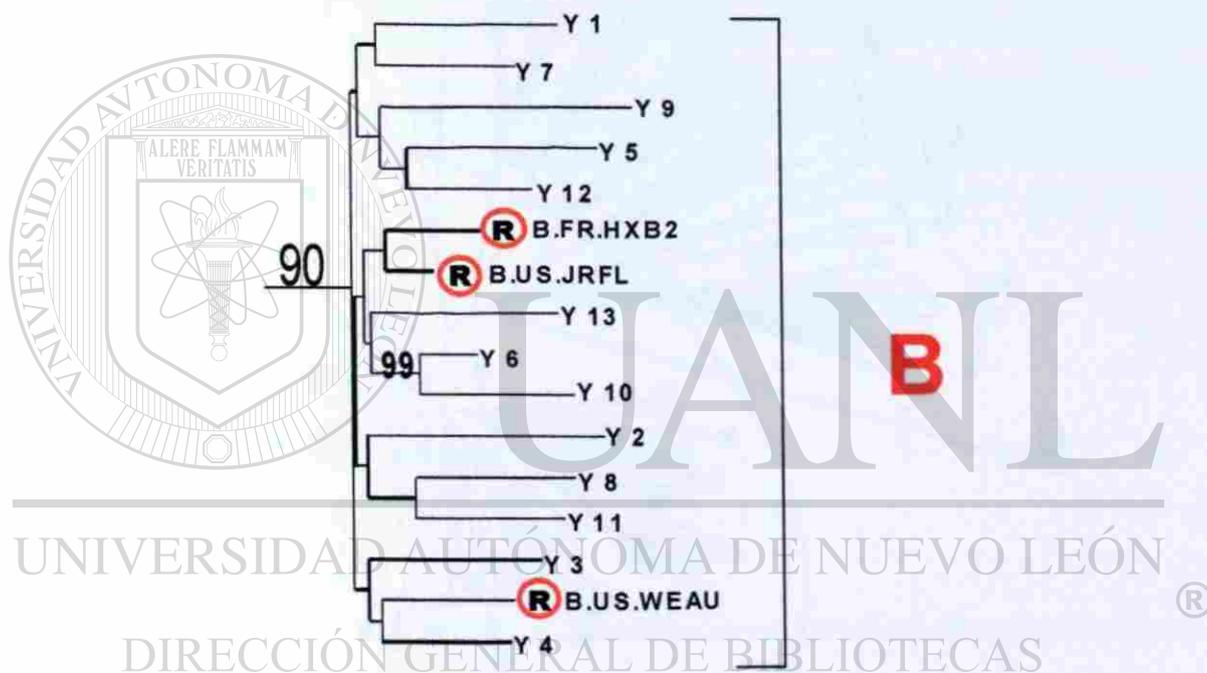


Figura 36b

Relación Filogenética del VIH-1 obtenido de las muestras de Yucatán basadas en el gene *env* región C2-V5



Y Yucatán

**R** Referencias VIH-1 subtipo B

B.US.WEAU

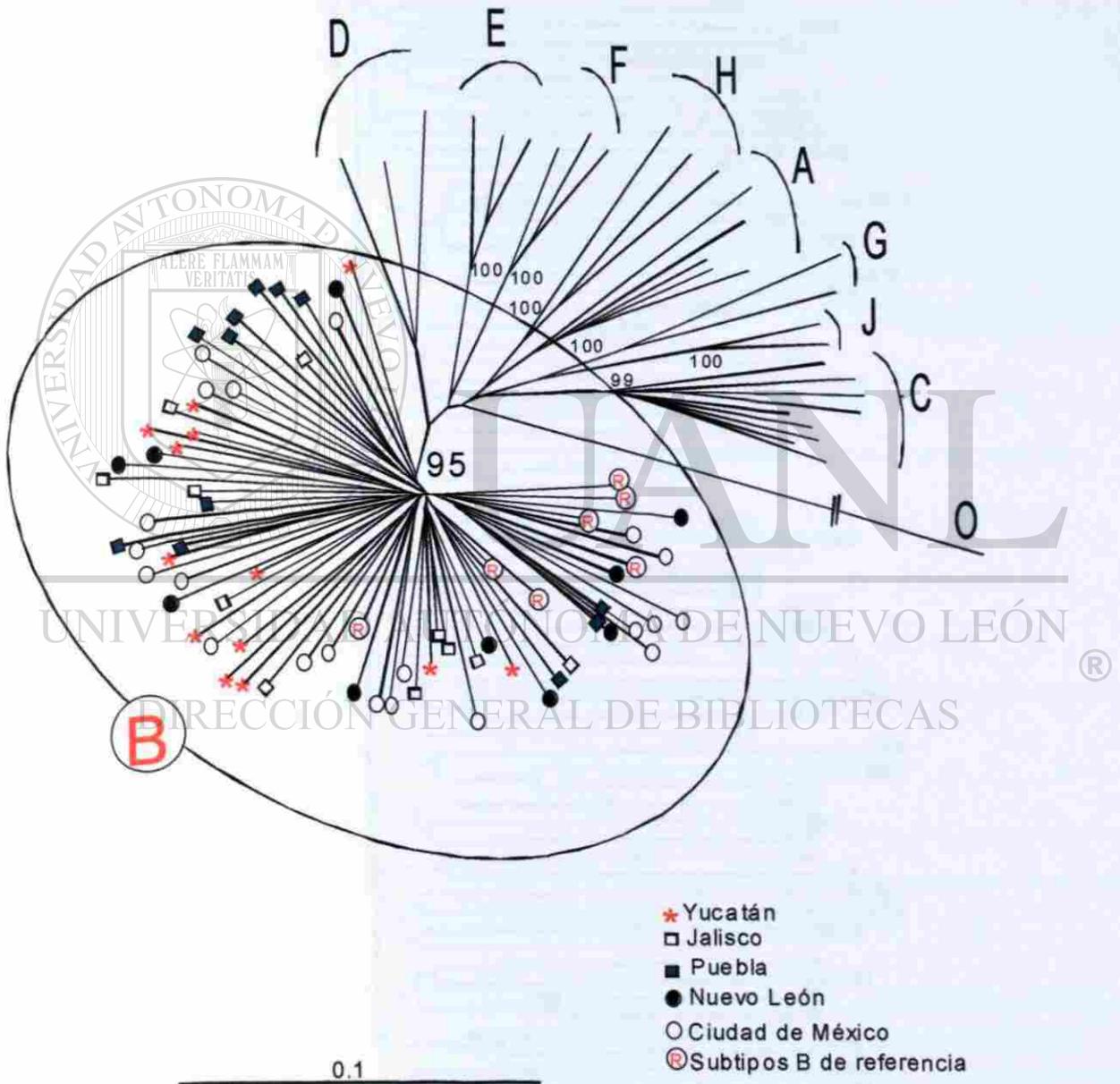
B.FR.HXB2

B.US.JRFL

0.1

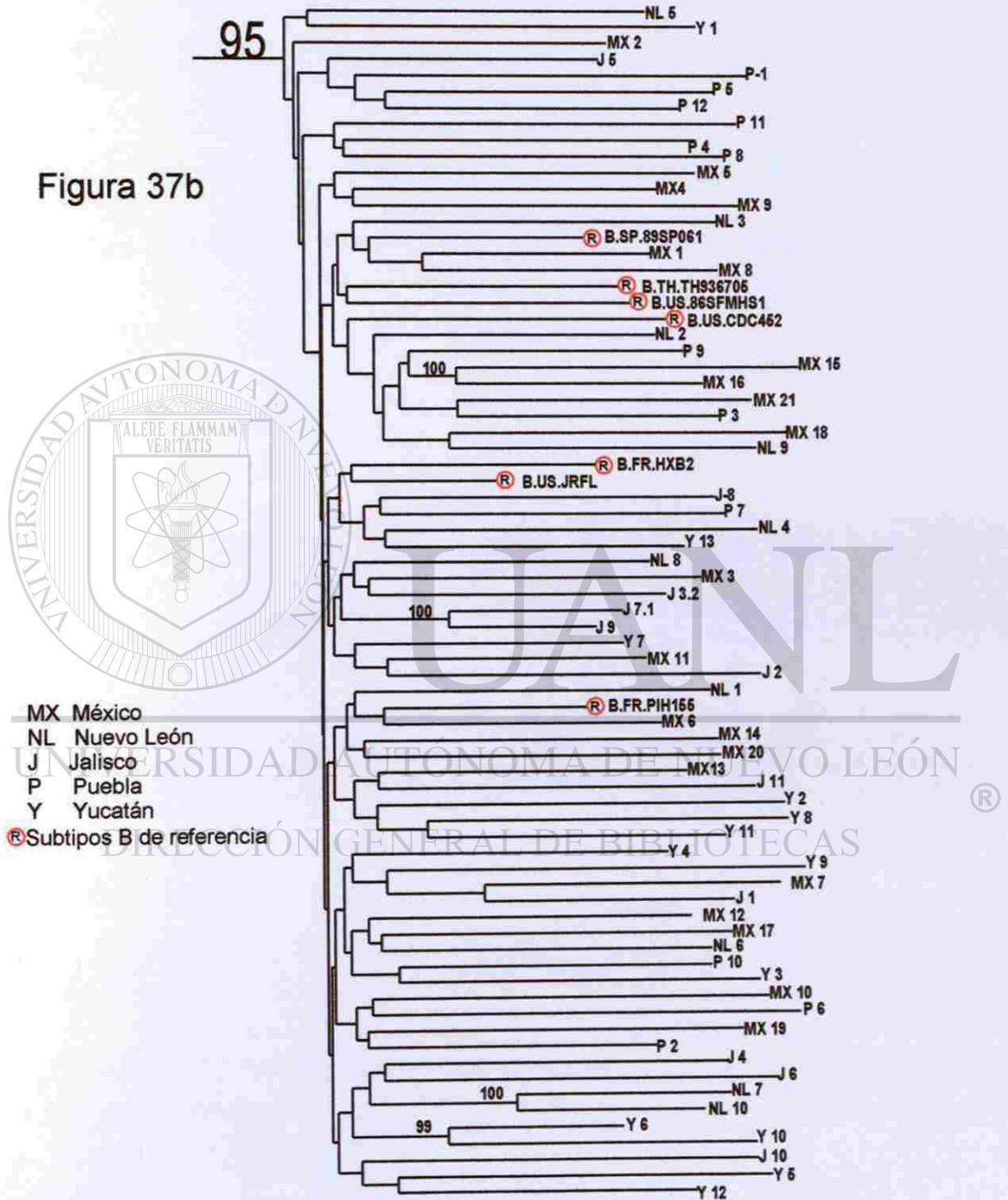
Figura 37a

Relación Filogenética del VIH-1 obtenido de las muestras de cinco estados de México basadas en el gene *env* región C2-V5



# Relación Filogenética del VIH-1 obtenido de las muestras de cinco estados de México basadas en el gene *env* región C2-V5

Figura 37b



La diversidad de los nucleótidos entre los 67 aislados de México fue más alta que la diversidad observada entre las 74 secuencias de referencia del subtipo B obtenidas de la base de datos del Banco de Genes (10). Las secuencias de referencia empleadas en este análisis fueron originarias de 14 países: Estados Unidos (50 secuencias con el subtipo B), Australia (2), Brasil (3), Canadá (2), Alemania (2), Francia (1), Italia (1), Gabon (1), Gran Bretaña (2), Haití (3), Japón (2), Holanda (2), Tailandia (2), Zaire (1). Para comparar los niveles de diversidad entre los aislados de México y las secuencias del subtipo B no mexicanas se realizó el siguiente análisis de 3 pasos. Primero, se construyó una secuencia consenso para cada grupo basada en la secuencia de los nucleótidos. Segundo, se computaron las distancias apareadas de cada aislado para la secuencia consenso dentro del grupo. Finalmente se compararon los valores promedios entre los dos grupos y se evaluaron estadísticamente. El alineamiento de este análisis fue limitado a 896 nucleótidos que es la posición del nucleótido de 6860 a 7756 del mapa HXB2 (26). El valor promedio de diversidad entre el grupo de los 67 aislados mexicanos fue de 8.9% (rango de 5.1-11.8%) mientras que entre el grupo de las secuencias de referencia del subtipo B el valor promedio fue del 6% (rango de 2.9 a 10.3%). Las diferencias fueron estadísticamente significativas (valor de  $p < 0.001$ ). Los valores de diversidad obtenidos en los 67 virus se muestra en la tabla 8.

**Tabla 8 . Datos sobre los valores de diversidad obtenidos de los 67 individuos infectados.**

<i>Pacientes</i>	<i>Región Geográfica</i>	<i>Año de Positividad al VIH</i>	<i>Estrato de la Enfermedad<sup>1</sup></i>	<i>Modo de Transmisión<sup>2</sup></i>	<i>Cuenta de CD4<sup>3</sup></i>	<i>Diversidad<sup>4</sup></i>
Mx-1	Cd. de México	92	A2	Ho	660	7.2%
Mx-2	Cd. de México	94	A2	Ho	344	7.6%
Mx-3	Cd. de México	96	B3	Ho	20	7.4%
Mx-4	Cd. de México	91	C3	Ho	230	6.9%
Mx-5	Cd. de México	96	A3	Ho	336	9.1%
Mx-6	Cd. de México	96	B3	Ho/Bi	150	7%
Mx-7	Cd. de México	85	B3	Ho	66	10.6%
Mx-8	Cd. de México	95	A2	Ho	481	7.2%
Mx-9	Cd. de México	98	C3	Ho/Bi	18	9.3%
Mx-10	Cd. de México	94	B3	Ho	145	9.9%
Mx-11	Cd. de México	93	A2	Ho	276	7.6%
Mx-12	Cd. de México	90	A2	Ho	425	9.4%
Mx-13	Cd. de México	98	C3	Ho	20	6.9%
Mx-14	Cd. de México	92	B3	Ho	332	8.5%
Mx-15	Cd. de México	95	A3	Ho/Bi	202	9.8%
Mx-16	Cd. de México	95	A3	He	133	10.1%
Mx-17	Cd. de México	92	A2	Ho	554	9.1%
Mx-18	Cd. de México	91	C3	Ho/Bi	328	10.9%
Mx-19	Cd. de México	94	C3	Ho/Bi	490	9.2%
Mx-20	Cd. de México	98	C3	Ho	200	9.6%
Mx-21	Cd. de México	97	A3	Ho	78	9.4%
NL-1	Nuevo León	90	C3	Ho	143	6.9%
NL-2	Nuevo León	97	C3	Ho/Bi	NA	7.6%
NL-3	Nuevo León	93	C2	Ho/Bi	98	9.6%
NL-4	Nuevo León	95	C3	Ho	55	9.7%
NL-5	Nuevo León	97	C2	Ho	161	8.8%
NL-6	Nuevo León	96	C2	Ho	6	8.8%
NL-7	Nuevo León	97	C3	He	13	8.6%
NL-8	Nuevo León	92	C3	Ho	111	6.8%
NL-9	Nuevo León	98	C3	Ho/Bi	5	10.1%
NL-10	Nuevo León	98	C3	Ho/Bi	38	8.7%
J-1	Jalisco	99	NA	Ho	NA	9.4%
J-2	Jalisco	98	A2	Ho	562	9.1%
J-3	Jalisco	98	B3	Ho	371	6.7%
J-4	Jalisco	90	A2	Ho	537	8.5%
J-5	Jalisco	96	A2	Ho	644	7.2%
J-6	Jalisco	88	B3	Ho	359	10.7%
J-7	Jalisco	99	B3	Ho	380	6.2%
J-8	Jalisco	97	C3	Ho	96	8.4%
J-9	Jalisco	99	A2	Ho	550	5.1%
J-10	Jalisco	98	B3	Ho	272	9.3%
J-11	Jalisco	98	C3	Ho	76	10.1%
P-1	Puebla	95	C2	He	244	11%
P-2	Puebla	97	C3	He	28	7.9%
P-3	Puebla	96	C2	He	235	6.7%
P-4	Puebla	96	C3	He	162	10.4%
P-5	Puebla	94	C3	He	41	10.7%
P-6	Puebla	95	C3	Ho	63	11.7%
P-7	Puebla	94	C3	Ho	105	8.1%
P-8	Puebla	93	C3	Ho	88	10%
P-9	Puebla	96	C2	Ho	335	8.6%
P-10	Puebla	97	C2	Ho	314	9.1%
P-11	Puebla	97	C3	He	2	10.1%
P-12	Puebla	91	C3	He	16	9.2%
Y-1	Yucatán	95	C3	Ho	199	9.5%
Y-2	Yucatán	97	C3	Ho	35	11.5%
Y-3	Yucatán	88	C3	Ho	215	9.1%
Y-4	Yucatán	97	C3	Ho	93	8.9%
Y-5	Yucatán	92	B3	Ho	246	11%
Y-6	Yucatán	98	B2	Ho	244	6.4%
Y-7	Yucatán	98	B2	Ho	230	6.6%
Y-8	Yucatán	91	B3	Ho	433	10.6%
Y-9	Yucatán	92	C3	Ho	7	11.3%
Y-10	Yucatán	98	C2	Ho	125	8.6%
Y-11	Yucatán	95	C3	Ho	107	9.9%
Y-12	Yucatán	95	B3	Ho	57	9%
Y-13	Yucatán	94	B2	Ho	381	7%

<sup>1</sup> de acuerdo a la clasificación del CDC.

<sup>2</sup> Ho – homosexual, Ho/Bi – homosexual/bisexual, He – heterosexual.

<sup>3</sup> Número de CD4<sup>+</sup>/ml de sangre.

<sup>4</sup> Distancia nucleotídica al sitio consenso del serotipo B del VIH.

## DISCUSIÓN

En México, al igual que en el resto de los países del mundo, el VIH/SIDA se ha convertido en un serio problema de salud pública. Hasta el 30 de septiembre de 1999, los casos diagnosticados de SIDA en nuestro país eran 40,743, estimándose 187,621 infectados con el VIH.(1) A pesar de la magnitud de esta epidemia, en la actualidad la información que se tiene acerca de la distribución de subtipos de VIH-1 en México es limitada.(2-7)

El subtipo B es el más estudiado principalmente porque los virus de este subtipo representan la mayoría de los subtipos circulantes en el mundo, es el subtipo predominante en los Estados Unidos, Europa Occidental, Latinoamérica, Australia (10) aunque otros subtipos no pertenecientes al B ya han sido detectados en Estados Unidos(15), Brasil(13), Argentina(14), Honduras(10,11,12), y Uruguay(10).

La predominancia del VIH-1 subtipo B ha sido mostrada en algunas regiones de México por serotipificación con péptidos sintéticos(2,3), ensayo de movilidad por heteroduplex (4,7) o por determinación por PCR(7). Vazquez-Walls y colaboradores, habían reportaron previamente por ensayos de serotipificación con péptidos sintéticos o por PCR específico del subtipo de la región C2-V3, observándose la presencia del subtipo B en un 89% y, el 11% restante pertenecían a subtipos no B.(3) que no correspondían a los subtipos A, B, C, D y E. Gudino y cols.(4) reportaron el subtipo B mediante el ensayo de movilidad por heteroduplex, de la región V1-V5 y Vázquez-Walls(2) en otro estudio basado

también en el mismo ensayo reportó el subtipo B , pero únicamente en muestras obtenidas de un solo estado (Guadalajara), sin embargo estos estudios son indeterminados(3), además de limitados en los análisis filogenéticos y en la subtipificación en el país.(2) Por lo anterior, decidimos analizar y caracterizar filogenéticamente el subtipo predominante en México tomando en cuenta las regiones con mas alta incidencia de casos de VIH/SIDA: Ciudad de México(centro), Nuevo León(norte), Jalisco(oeste), Puebla (este) y Yucatán(sur).

La región de envoltura del VIH-1 sigue considerándose como el blanco principal para la subtipificación(8). El análisis del segmento C2-V5 del gene *env* puede proveer de información acerca de los subtipos de virus circulantes en un área geográfica dada(9). Basados en el análisis de secuencias del gene *env*, el subtipo B fue el virus predominante entre la población estudiada. La clasificación filogenética como subtipo B fué soportada por un alto valor porcentual de 95 %(valor bootstrap) en un análisis global de todas las muestras analizadas y por el análisis individual de cada estado (86 % para Ciudad de México, 90% en Nuevo León, 93% en Jalisco, 95% en Puebla y un 90 % para Yucatán), considerándose estos resultados altamente significativos. Los pares relacionados epidemiológicamente de muestras de México (MX15/MX16, NL7/NL10, J7/J9, y Y6/Y10 ) fueron filogenéticamente confirmados con valores altos de bootstrap.

Además en base a los análisis de la región C2-V5 del gen *env*, no se encontraron evidencias de subgrupos geográficos dentro de este subtipo entre las secuencias mexicanas. Los análisis filogenéticos amplificados, incluyendo las referencias de las secuencias del subtipo B de la base de datos del GenBank(16) no revelaron ninguna asociación específica con la de las secuencias mexicanas

(datos no mostrados). Ninguna de las muestras de México mostraron evidencias de recombinación intersubtipos (RIP) a lo largo de las regiones del gen *env* analizadas ( datos no mostrados ).

Se determinó la diversidad de los nucleótidos entre los 67 virus de México y se comparó con 74 subtipos B de referencia, provenientes de 14 países y que están referidos en la base de datos del GenBank (9).

El valor promedio de diversidad entre el grupo de los 67 aislados mexicanos fue de 8.9% (rango de 5.1-11.8%) mientras que entre el grupo de las secuencias de referencia del subtipo B el valor promedio fue del 6% (rango de 2.9 a 10.3%) (valor de  $P < 0.001$ ). Este descubrimiento sugiere múltiple introducción de VIH-1 en México y una historia relativamente larga de circulación de este virus en el país. La diversidad de los nucleótidos entre los 67 aislados de México fue más alta que las observadas en las 74 secuencias de referencia del subtipo B referidas de la base de datos del GenBank (9), además como resultado de este trabajo, las secuencias nucleotídicas de los 67 virus obtenidos de pacientes infectados fueron registradas en la base de datos del GenBank, con un número de acceso: AF200855-AF200921, mencionando además que ninguna de las secuencias provenientes de México han sido reportadas y depositadas en la base de datos del GenBank en el tiempo en que se desarrolló este trabajo.

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:

GP GS (6 casos) GP GG (3), AP GR (3), GP GK (2), GP GA (1), GP RR (1), HP GG (1), RP GR (1) GP EG (1) y GP WR (1). (Tabla 6)

Además, observamos que los tetrapéptidos HP GG y GP EG, de Jalisco y Yucatán respectivamente, no han sido reportados previamente (9).

Nos centramos en esta región porque el GP GR forma parte del Determinante Principal de Neutralización Viral (PND). Varios estudios han mostrado que el PND de los aislados del VIH-1 reside en el tercer dominio variable (V3) de la gp 120, este dominio V3, es un segmento de 35-37 aminoácidos, que posee dos residuos de cisteína en los extremos, lo que permite que se unan por medio de un enlace disulfuro formando un loop o asa (posición 303-338). La Rosa y cols(17), mostraron que el PND contiene secuencias conservadas, reportó que arriba del 90% de las muestras estudiadas presentaron un tripéptido GP G (Glicina-Prolina-Glicina). Anticuerpos contra los aminoácidos de esta región conservada son capaces de neutralizar a los aislados del VIH-1. De nuestras muestras estudiadas, solo 59 (88%) presentaron este tripéptido característico.

Estudios previos(18) mostraron que las mutaciones en el PND pueden reducir o suprimir la formación de sincitios sin afectar la expresión de la gp160, el procesamiento o la unión a la molécula CD4. Esto sugiere que aunque el PND es distinto de los dominios que participan directamente en la unión de CD4, elementos del PND son requeridos para llevar a cabo el evento de fusión a membranas.

Las mutaciones observadas en el tetrapéptido GP GR de nuestras muestras, sugiere muy probablemente que las funciones de tropismo celular, neutralización por anticuerpos y formación de sincitios pueden encontrarse afectados en las

muestras que presentaron estas substituciones, principalmente el estado de Yucatán, que es el que presentó un mayor porcentaje de variación.

El PND no participa directamente en la unión de CD4, porque los anticuerpos no bloquean la unión gp120-CD4 (20), los resultados presentados por estos investigadores, mostraron deleciones pequeñas, inserciones, o substituciones que no afectan significativamente la unión de la envoltura con CD4. Después de que se llevó a cabo la unión con el CD4, la adición de anticuerpos contra el PND, neutralizó completamente la infectividad viral. Esto demuestra que hay un paso después de que se efectuó la unión que sí es bloqueada por los anticuerpos contra el PND.

El origen de las mutaciones *in vivo* es más debido en parte a la presión selectiva impuesta por los anticuerpos neutralizantes generados durante la infección. Variantes resistentes a los anticuerpos neutralizantes han sido seleccionados *in vitro* e *in vivo* con mutaciones dentro y fuera del PND, además hay evidencia de que los virus aislados de individuos en etapas de SIDA avanzado son más citopáticos, tienen una cinética de crecimiento acelerado y el tropismo celular está incrementado(21-24).

Es importante mencionar que la región C2-V5 a analizar presenta uniones disulfuro importantes para conservar la estructura conformacional de la gp120, los virus provenientes de Nuevo León y Jalisco presentaron los 10 residuos de cisteína presentes en esta región, los otros presentaron substituciones por otro aminoácido, en especial uno de ellos, la muestra DF14 presentó dos substituciones, uno de ellos en la cisteína que forma parte del asa V3, esto nos lleva a pensar que perdió la estructura conformacional importante en donde se

encuentra el PND. En una infección natural por VIH, la respuesta de anticuerpos para la gp120 es dirigida a los epítopes conformacionales que son dependientes de la integridad de los puentes disulfuro, además que probablemente exista alguna alteración en el tropismo celular, inducción de la formación de sincitios o bien en la neutralización por anticuerpos(25,26)

Los carbohidratos presentes en la gp120, representan aproximadamente el 50% de la masa molecular de la glicoproteína. Esta continúa siendo la más divergente entre los genes, se encuentran al menos 24 sitios de glicosilación (NxS/NxT) presentes a lo largo de las secuencias proteínicas de la gp120, en el subtipo de referencia HXB2, cerca de la mitad de estos sitios de glicosilación son altamente conservados. y no están distribuidos al azar en la molécula gp 120(27).

De los 24 sitios de N glicosilación solo 5 sitios pueden ser importantes para la infectividad viral. Estos sitios son representados por: los números del aa presente en el subtipo de referencia HXB2 : 88, 141, 197, 262 y 276; de todos ellos, los números que forman parte de las secuencias de nuestros pacientes a lo largo de la región C2-V5, son los sitios de glicosilación presentes en las posiciones 262 y 276, la posición 262 está localizada fuera de la región hipervariable de la gp120 y la posición 276 está localizada adyacente a la región hipervariable V3. Estos sitios de N-glicosilación son importantes para la infectividad viral(27). Willey y cols (31) estudiaron las mutaciones en varios sitios de N-glicosilación, encontrando que el perteneciente a la posición 262 tuvo severo daño en la infectividad, esta pérdida fue atribuida a la sustitución de el aminoácido asparagina (N) por un residuo de glutamina. Muestras de MX

presentaron en forma altamente conservada el sitio de glicosilación localizado en la posición 262. Además de que adquirieron sitios extra de glicosilación.

Uno de las funciones importantes de los azúcares es el procesamiento y el plegamiento de las proteínas de envoltura como se demostró por inhibidores de las glicosidasas(28)

Debe ser considerada la posibilidad de que la presencia de los azúcares enmascaren ciertos epítopes antigénicos presentes en la gp120 a la respuesta inmune. Se ha documentado que los carbohidratos pueden afectar el reconocimiento inmune de antígenos virales, se ha encontrado que una mutante del virus de la influenza produjo un azúcar que se localizó en un sitio que es considerado como el blanco de los anticuerpos neutralizantes, en este caso, la capacidad del virus para evadir a la respuesta inmune es conseguido a través de un enmascaramiento del sitio blanco por los azúcares(29)

Otros estudios han demostrado que la desglicosilación de las proteínas de envoltura del virus de la leucemia murina y el virus de la leucemia felina producen anticuerpos neutralizantes más eficientemente que su contraparte glicosilada(29) ®

Estos descubrimientos ilustran que las moléculas de carbohidratos de estas glicoproteínas pueden influir en el reconocimiento inmune. Evidencias también indican que ciertas modificaciones en las moléculas de carbohidratos de un virus glicoproteico, tal como la desialización de la gp 160, puede redirigir la respuesta inmune a un epítipo antigénico que es expuesto a un segmento proteico noglicosilado(30)

Estas observaciones demuestran que la modificación de las moléculas de carbohidrato de un virus que posee glicoproteínas puede ser capaz de influir en la accesibilidad de epítopes antigénicos por el sistema inmune.

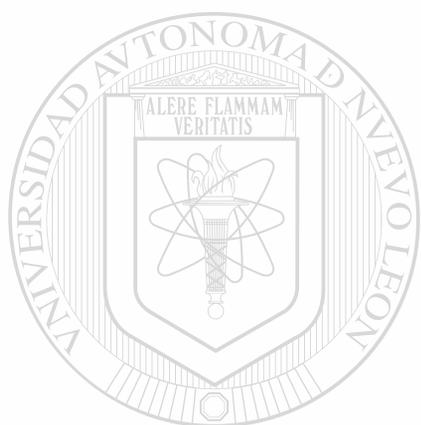
Los resultados de este estudio fueron limitados, por un lado al tamaño de la muestra y por el otro de que la mayoría de los virus fueron aislados de hombres infectados por comportamientos homosexual y bisexual. Las mujeres no estuvieron representadas en este estudio (solo dos muestras de mujeres) incluso cuando la proporción de los hombres: mujeres entre la población infectada por el VIH-1 en México fue de 6:1 (1)

La subtipificación y la caracterización genética nos permite analizar los patrones de la epidemia en el país y en las comunidades, además para identificar grupos de riesgo y ayudar a identificar las vías de transmisión locales e internacionales, se puede usar como una poderosa herramienta a nivel de epidemiología molecular, ya que puede proveer de información más precisa acerca de la epidemiología y transmisión del VIH-1 en la población y en los individuos y puede contribuir a datos esenciales para el diseño y evaluación de los esfuerzos de prevención contra el VIH.

## CONCLUSIONES

- Este estudio demostró que el VIH-1 Subtipo B es el virus predominante del SIDA epidémico en México.
- 67 cepas de virus recolectadas en 5 distintas áreas geográficas del país reflejan el modo de transmisión predominante en México.
- Este estudio sugiere un papel relativamente insignificante de los subtipos que no pertenecen al B en la epidemia en México.
- Nuestro estudio ha contribuido con 67 secuencias de VIH-1 en México en la base de datos del Gen Bank por primera vez.
- Nosotros también observamos dos nuevos tetrapéptidos HPGG Y GPEG en el asa V3 que no han sido reportados en estudios previos.
- La identificación de múltiples subtipos genéticos del virus y una mejor comprensión de la diversidad genética del mismo son críticos para fortalecer los esfuerzos internacionales para el control de la pandemia por el VIH.
- Los resultados en este estudio son limitados debido al pequeño tamaño de las muestras de cada sitio y no excluye la presencia de otros subtipos en el País.
- Este estudio representa la primera búsqueda de la infección de VIH usando la epidemiología molecular basada en la secuenciación del genoma viral en México y justifica seguir monitoreando la epidemia del SIDA en todos los estados de República Mexicana, lo cual nos llevará finalmente a conocer el o los tipos de virus existentes así como las secuencias de los mismos que se

encuentran en el país, esto nos permitirá entender la etiología, transmisión y tropismo del VIH-1 en México..



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## PERSPECTIVAS

Una de las principales aportaciones del presente estudio es haber contribuido a las primeras 67 secuencias genómicas del Virus de Inmunodeficiencia Humana tipo 1 (VIH-1) de México en ser registrados en la base de datos del GenBank, además de que dos nuevos tetrapéptidos HPGG y GPEG presentes en el asa V3 fueron observados y que no habían sido reportados previamente.

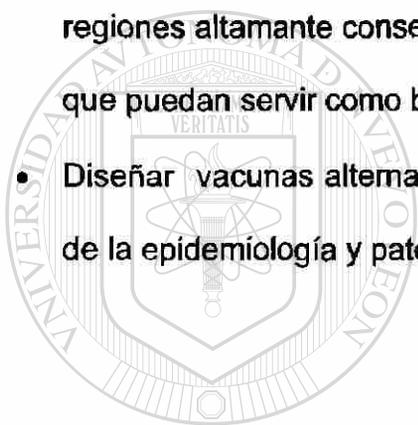
Con el incremento de la infección por el VIH en los países en desarrollo, la implementación de una vacuna efectiva permanece como prioridad.

Elegimos estudiar la gp 120 (región C2-V5) del gene env, porque es la glicoproteína más externa del VIH y porque en esta región se encuentra el asa V3, el cuál es el blanco de anticuerpos neutralizantes y además porque posee un papel esencial en la infectividad y en el tropismo viral.

El análisis de las secuencias de nucleótidos de la región gp 120 del gene env en cinco distintas áreas geográficas de nuestro país contribuyó a nuestro entendimiento de la evolución y diseminación del VIH-1. La diversidad vista en la población en estudio, el conocimiento actual de las secuencias particulares en especial de la región V3, es esencial para el diseño de vacunas efectivas y estrategias de inmunización pasiva.

Estos hechos abren desde nuestro punto de vista las siguientes perspectivas:

- Genotipificar cepas de VIH circulantes en otros estados de nuestro país con alta incidencia por VIH, así como genotipificar las infecciones adquiridas por otras vías de transmisión como la heterosexual y las adquiridas por transmisión vertical madre-hijo.
- Es también clara la importancia de continuar el esfuerzo para identificar regiones altamente conservadas, epítopos neutralizantes fuera de la región V3 que puedan servir como blanco adicional para el desarrollo de vacunas.
- Diseñar vacunas alternativas desarrollada en base a las propiedades únicas de la epidemiología y patogenicidad del VIH-1 en nuestro país.



UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

# BIBLIOGRAFÍA

## INTRODUCCIÓN

### Origen e Historia del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida

1. Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM, et al. *Pneumocystis carinii* pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med* 1981;305:1425.
2. Mildvan D, Mathur U, Enlow RW, et al. Opportunistic Infections and immune deficiency in homosexual men. *Ann Intern Med* 1982;96:700-704
3. Sonnabend J, Witkin SS, Purtilo DT, Acquired immunodeficiency syndrome, opportunistic infectious and malignancies in male homosexuals: a hypothesis of etiologic factors in pathogenesis. *JAMA* 1983;249:2370-2374.

---

4. Centers for Disease Control. Epidemiologic aspects of the current outbreak of Kaposi's sarcoma and opportunistic infections. *N Engl J Med* 1982;306:248-252
5. Curran J W, Lawrence DN, Jaffe H, et al. Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) associated with transfusions. *N Engl J Med* 1984; 310:69.
6. Jaffe HW, Francis DP, McLane MF, et al. Transfusion-associated AIDS: serologic evidence of human T-cell leukemia virus infection of donors. *Science* 1984;223:1309.

7. Rubinstein A, Sicklick M, Gupta A, et al. Acquired immunodeficiency with reversed T4/T8 ratios in infants born to promiscuous and drug-addicted mothers. *JAMA* 1983;249:2350.
8. Oleske J, Minnefor A, Cooper R Jr, et al. Immune deficiency syndrome in children, *JAMA* 1983; 249:2345.
9. Piot P, Quinn TC, Taelman H, et al. Acquired immunodeficiency syndrome in a heterosexual population in Zaire. *Lancet* 1984;2:65.
10. Masur H, Michelis MA, Greene JB, et al. An outbreak of community-acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia: initial manifestation of cellular dysfunction. *N Engl J Med* 1981;305:1431
11. Essex M, McLane MF TH, Lee TH, et al. Antibodies to cell membrane antigens associated with human T-cell leukemia virus in patients with AIDS. *Science* 1983;220:859
12. Gallo RC, Sarin PS, Gelmann EP, et al. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS), *Science* 1983;220:865.
13. Barre-Sinoussi F, Chermann J-C, Rey F et al. Isolation of T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983; 220, 868.
14. Essex Myron E. Origin of acquired immunodeficiency syndrome. In: DeVita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA, Curran J, Essex M, Fauci AS, eds. *AIDS: Etiology, Diagnosis, Treatment and Prevention*, 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott –Raven Publishers., 1997;45-74

15. Essex M, Kanki P. Origins of the AIDS virus. *Sci Am* 1988;259:64.

### **Características de los Retrovirus**

1. Barre-Sinoussi F, Cherman JC, Rey F, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983;220:868-871.
2. Gallo RC, Salahuddin Sz, Popovic M, et al. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and a risk for AIDS. *Science* 1984;224:497-500.
3. Clavel F, Mansinho K, Charmaret S, et al. Human immunodeficiency virus type 2 infection associated with AIDS in West Africa. *N Engl J Med* 1987;316:1180-1185.
4. Kanki PJ, Barin F, M'Boup S, et al. New human T-lymphotropic retrovirus related to simian T-lymphotropic virus type III (STLV-III<sub>AGM</sub>). *Science* 1986;232:238-243.
5. Wong-Staal F. Human Immunodeficiency Viruses and Their Replication. Fields BN, ed. *Fundamental Virology*. 2<sup>nd</sup> ed. Raven Press. Ltd. New York. 1991;709-723
6. Essex M. Origin of AIDS. In: DeVita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA, Curran J, Essex M, Fauci AS, eds. *AIDS: Etiology, Diagnosis, Treatment and Prevention*, 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott –Raven Publishers., 1997;1-20

## **Estructura Viral y Genética**

1. Wong-Staal F. Human Immunodeficiency Viruses and Their Replication. Fundamental Virology. 2<sup>nd</sup> ed. Raven Press. Ltd. New York. 1991;709-723
2. Korber B, Kuiken C, Foley B, Hahn B, McCutchan F, Mellors J, and Sodroski J (ed): Human Retroviruses and AIDS 1998. Los Alamos: Theoretical Biology and Biophysics, Group T-10, Los Alamos National Laboratory; 1998.
3. Pavlakis GN, The Molecular Biology of Human Immunodeficiency Virus Type 1. In: DeVita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA, Curran J, Essex M, Fauci AS, eds. AIDS: Etiology, Diagnosis, Treatment and Prevention, 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott –Raven Publishers., 1997;45-74
4. Haseltine W, Wong-Staal F. The molecular biology of the AIDS virus. Sci Am 1988;259:52-63
5. HIVInSite. 1997. Structure, Expression, and Regulation of the HIV-1 Genome. <http://hivinsite.ucsf.edu/akb/1997/03genome/index.html>
6. Subbramanian RA, and Cohen EA. Molecular Biology of the Human Immunodeficiency Virus Accessory Proteins. J. Virology, 1994;68:6831-6835.
7. Abbas AB, Lichtman AH, and Pober JS. Inmunología Celular y Molecular. 2da. Ed. McGraw-Hill. Interamericana. 1999. 505-515.

## **Ciclo de vida del VIH-1**

1. HIV Mode of infection [http://www.brown.edu/Courses/Bio\\_160/hiv/moi.html](http://www.brown.edu/Courses/Bio_160/hiv/moi.html)

2. Dalgleish AG, Beverly PC, Clapham PR, et al. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 1984; 312:763.
3. Arthos J, Deen KC, Chaikin MA, et al. Identification of the residues in human CD4 critical for the binding of HIV. *Cell* 1989; 57: 469.
4. Lasky LA, Nakamura G, Smith DH, et al. Delineation of a region of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 glycoprotein critical for interaction with the CD4 receptor. *Cell* 1987; 50:975.
5. Klatzmann D, Barre-Sinoussi F, Nugeyre MT, et al. Selective tropism of lymphadenopathy-associated virus (LAV) for helper-inducer T-lymphocytes. *Science* 1984; 225:59.
6. Essex Myron E. The Life Cycle of Human Immunodeficiency Virus Type 1 in: DeVita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA, Curran J, Essex M, Fauci AS, eds. *AIDS: Etiology, Diagnosis, Treatment and Prevention*, 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott –Raven Publishers., 1997;45-74
7. Freed EO, Myers DJ, Risser R. Characterization of the fusion domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:4650.
8. <http://hivinsite.ucsf.edu/akb/1997/03genome/index.html>

### **Inmunopatogénesis de la infección por HIV-1**

1. Fauci AS: Host facto and the pathogenesis of HIV-induced disease. *Nature* 1996;384:529-534.

2. Pantaleo G, Graziosi C, and Fauci AS: The Immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *N Eng J Med* 1993;328:327.
3. Fauci AS: The human immunodeficiency virus: infectivity and mechanisms of pathogenesis. *Science* 1988;239:617.
4. Haynes Bf, Pantaleo G, Fauci A. Toward an Understanding of the *Correlates of Protective Immunity to HIV Infection*. *Science* 1996;271:324-328
5. Levy JA: HIV pathogenesis and long-term survival. *AIDS* 1993;7:1401.
6. Easterbrook PJ: Non-progression in HIV infection. *AIDS* 1994;8:1179.
7. Emilie D, Peuchmaur M, Maillot M, Crevon M, Brousse N, Delfraissy J, Dormont J, and Galanaud P: Production of interleukins in human immunodeficiency virus-1 replicating lymph nodes. *J Clin Invest* 1990;86:148-159.
8. Dragic T, Litwin V, Allaway GP, Martin SR, Huang Y, Nagashima KA, Cayanan C, Maddon PJ, Koup RA, Moore JP, and Paxton WA: HIV-1 entry into CD4<sup>+</sup> cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature (London)* 1996;381:667-673.
9. Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, Feng Y, Kennedy PE, Murphy PM, and Berger EA: CC CKR5: A RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  receptor as a fusion cofactor for macrophage -tropic HIV-1. *Science* 1996;272:1955-1958.
10. Choe H, Farzan M, Sun Y, Sullivan N, Rollins B, Ponath PD, Wu L, Mackay CR, LaRosa G, Newman W, Gerard N, and Sodroski J: The beta-chemokine

receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* 1996;85:1135-1148.

11. Doranz BJ, Rucker J, Yi Y, Smyth RJ, Samson M, Peiper SC, Parmentier M, Collman RG, and Doms RW: A dual-tropic primary HIV-1 isolates that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell* 1996;85:1149-1158.

### **Características Clínicas de la infección**

1. Fauci AS: Multifactorial nature of human immunodeficiency virus diseases: Implications for therapy. *Science* 1993;262:1011-1018.
2. Cooper DA, Gold J, Maclean P, *et al*: Acute AIDS retrovirus infection: definition of a clinical illness associated with seroconversion. *Lancet* 1985;i:537-540.
3. Tindall B, Barker S, Donovan B: Characteristics of the acute clinical illness associated with human immunodeficiency virus infection. *Arch Intern Med* 1988;148:945-949.
4. Tindall B, and Cooper DA: Primary HIV infection: host responses and intervention strategies. *AIDS* 1991;5:1.
5. Cameron P, Pope M, Granelli-Piperno A, and Steinman RM: Dendritic cells and the replication of HIV-1. *J Leukocyte Biol* 1996;59:158-171.
6. Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM, *et al*: *Pneumocystis carinii* pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men:

evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. N Engl J Med 1981;305:1425-1431.

7. Seigal FP, Lopez C, Hammer GS, *et al*: Severe acquired immunodeficiency in male homosexuals, manifested by chronic perianal ulcerative *herpes simplex* lesions. N Engl J Med 1981;305:1439-1444.
8. Mildvan D, Mathur U, Enlow RW, *et al*: Opportunistic infections and immune deficiency in homosexual men. Ann Intern Med 1982;96:700-704.
9. Friedman-Kien AE, Laubenstein LJ, Rubinstein P, *et al*: Disseminated Kaposi's sarcoma in homosexual men. Ann Intern Med 1982;96:693-700.
10. Wei X, Chosh SK, Taylor ME, *et al*: Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. Nature 1995;373:117.
11. Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M: Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV/1 infection. Nature 1995;373:123.

- 
12. MMWR. 1993 Revised Classification System for HIV Infection and Expanded Surveillance Case Definition for AIDS Among Adolescents and Adults December 18, 1992 / 41(RR-17)

### **Respuesta inmune al VIH**

1. Gaines H, von Sydow M, Sonnerborg A, *et al*: Antibody response in primary human immunodeficiency virus infection. Lancet 1987;i:1249-1253.

2. Barin F, McLane MF, Allan JS, Lee TH, Groopman JE, Essex M: Virus envelope protein of HTLV-III represents major target antigen for antibodies in AIDS patients. *Science* 1985;228:1094-1096.
3. Prince AM, Pascual D, Kosolapov LB, Kurokawa D, Baker L: Prevalence, clinical significance, and strain specificity of neutralizing antibody to the human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 1987;156:268-272.
4. Romagnani S, and Maggi R: Th1 versus Th2 responses in AIDS. *Current Opinion in Immunology* 1994;4:616-622.
5. Wei X, Chosh SK, Taylor ME, *et al*: Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* 1995;373:117.
6. Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Marakowitz M: Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV/1 infection. *Nature* 1995;373:123.
7. Piatak M, Saag MS, Yang LC, *et al*: High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science* 1993;259:1749.
8. Phihips RE, Rowland-Jones S, Nixon DF, Gotch FM, Edwards JP, Ogunlesi AO, Elvin JG, Rothbard JA, Bangham CR, Rizza CR, and McMichael A: Human immunodeficiency virus genetic variation that can escape cytotoxic T cell recognition. *Nature (London)* 1991;354:453-459.
9. Borrow P, Lewicki H, Wei X, Horwitz MS, Peffer N, Meyers H, Nelson JA, Gairin JE, Hahn BH, Oldstone MB, and Shaw GM: Antiviral pressure exerted by HIV-1 specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary

infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus. *Nature Med* 1997;3(2):205-211.

10. Pantaleo G, Soudeyns H, Demarest JF, Vaccarezza M, Graziosi C, Paolucci S, Daucher MB, Cohen OJ, Denis F, Biddison WE, Seakaly RP, and Fauci AS: Evidence for rapid disappearance of initially expanded HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cell clones during primary infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:9848-9853.

11. Pantaleo G, Soudeyns H, Demarest JF, Vaccarezza M, Graziosi C, Paolucci S, Daucher MB, Cohen OJ, Denis F, Biddison WE, Seakaly RP, and Fauci AS: Accumulation of human immunodeficiency virus-specific cytotoxic T lymphocytes away from the predominant site of virus replication during primary infection. *Eur J Immunol* 1997;27:3166-3173.

## Epidemiología

### Epidemiología del VIH/SIDA a nivel Mundial y en México

1. CONASIDA. 1999. México Web Site, <http://www.cenids.ssa.gob.mx/conasida>
2. Uribe\_Zuñiga P, Magis\_Rodríguez C, and Bravo\_García E. 1998. AIDS in México, *Journal of the International Association of Physicians in AIDS care (IAPAC)*, <http://www.thebody.com/iapac/mexico/mexico.html>, vol. November.
3. HIVInSite. 1997. México Health: Church under attack for its war on AIDS, <http://hivinsite.ucsf.edu/ads/9709/97090304.html>, IPS Wire.
4. HIVInSite. 1998. México, [http://HIVInSite.ucsf.edu/international/latin\\_america/2098.3be2.html](http://HIVInSite.ucsf.edu/international/latin_america/2098.3be2.html), vol. 1999.

5. MAP. 1998. The Status and Trends of the HIV/AIDS Epidemics in the World. Comprehensive report from MAP (Monitoring the AIDS Pandemic) Network.
6. Valdespino-Gómez JL, García-García ML, Río-Chiriboga C, Cruz-Palacios C, Loo-Méndez E, y López-Sotelo A. Las Enfermedades de Transmisión Sexual y la Epidemia de VIH/SIDA. Salud Pública de México. 1995;37:549-555.
7. Martínez-Aguilar G, Vázquez-De Kartzow R, Nava-Frías M, Santos-Preciado JI, Infección por VIH en Niños Mexicanos. . Salud Pública de México. 1995;37:572-580
8. Río-Zolezzi A, Liguori AL, Magis-Rodríguez C, Valdespino-Gómez JL, García-García ML, Sepúlveda-Amor J, La Epidemia del VIH/SIDA y la Mujer en México.. . Salud Pública de México. 1995;37:581-591.
9. Uribe-Zúñiga P, Hernández-Tepichín G, Río-Chiriboga C, Ortiz V, Prostitución y SIDA en la Ciudad de México. . Salud Pública de México. 1995;37:592-601.
10. Magis-Rodríguez C, Río-Zolezzi A, Valdespino-Gómez JL, García-García ML, Casos de SIDA en el Área Rural en México. . Salud Pública de México. 1995;37:615-623
11. <http://www.aids.sida.org> .Amigos contra el SIDA. 1999.
12. Magis-Rodríguez C, Bravo-García E, Anaya-López L, Uribe-Zúñiga P. La Situación del SIDA en México a finales de 1998. Enfermedades Infecciosas y Microbiológicas.1998;18:236-244.

13. Kuri –Morales P, Fortalecimiento de la Vigilancia Epidemiológica del VIH/SIDA. Boletín Epidemiológico Semanal. 1999.
14. Pérez-Blas A, Explican Cifras sobre el SIDA. 1999.  
<http://www.cenids.ssa.gob.mx/conasida/cifras.htm>
15. Anaya L, Subestimación de la Incidencia de SIDA en México, debida al retraso en la notificación. 1998.  
<http://www.ssa.gob.mx/conasida/revista/1997/>
16. Anaya L, Subestimación de la Incidencia de SIDA en México, debida al retraso en la notificación. SIDA-ETS. 1997;3:35-38
17. Avila C, Stetler H, Sepúlveda J, Dickinson E, Castro K, Ward J, Romero G, Valdespino JL. The Epidemiology of HIV Transmission among paid Plasma Donors, Mexico City, Mexico. AIDS 1989;3:631-633.
18. Izazola-Licea JA, Valdespino-Gómez JL, Gortmaker SL, Townsend J, Becker J, Palacios-Martinez M, Mueller NE, Sepulveda-Amor J. HIV-1 Seropositivity and Behavioral and Sociological Risks Among Homosexual and Bisexual Men in Six Mexican Cities. J Acquired Immune Def 1991;4:614-622.
19. Hernandez M, Uribe P, Gortmaker S, Avila C, De Caso LE, Mueller N, Sepulveda J. Sexual Behavior and Status for Human Immunodeficiency Virus Type 1 among Homosexual and Bisexual Males in Mexico City. J Epidemiol. 1992;135:883-894.
20. Olivares-López. SIDA Asociado con Transfusión de Sangre. Salud Pública de México. 1993;35:351-356.

### **Subtipos de VIH-1**

1. Korber B, Kuiken C, Foley B, Hahn B, McCutchan F, Mellors J, and Sodroski J (ed): *Human Retroviruses and AIDS 1998*. Los Alamos: Theoretical Biology and Biophysics, Group T-10, Los Alamos National Laboratory; 1998.
2. Korber B, Theiler J, Wolinsky S. *Limitations of a Molecular Clock Applied to Considerations of the Origin of HIV-1*. *Science* 1998;280:1868-1871.
3. Brodine S, Mascola JR, McCutchan FE. *Genotypic Variation and Molecular Epidemiology of HIV*. *Infect Med* 1997;14:739-748
4. Balter M. *New HIV Strain Could Pose Health Threat*. *Science* 1998;281:1425-1426
5. Simon F, Mauciere P, Roques P, Loussert-Ajaka I, Müller-Trutwin M, Saragosti S, Georges-Courbot MC, Barre-Sinoussi F, and Brun-Vezinet F. *Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O*. *Nature Med* 1998;4:1032-1037
6. Burke DS and McCutchan FE. *Global Distribution of Human Immunodeficiency Virus-1 Clades*. *AIDS. Biology, Diagnosis, Treatment and Prevention*, Fourth edition. Edited by Vincent T. De Vita Jr., Samuel Hellman, and Steven a. Rosenberg. Lippincott-Raven Publishers.1997
7. Vázquez-Valls E, Cheingsong-Popov R, Sierra-Quevedo JJ, Lister S, Lopez Marquez F, Weber J, Zuniga-Gonzalez L, Campos-Lopez P, and Esparza J. 1996. *Monotypic HIV-1 subtype B in Guadalajara, Mexico (Abstract 2070)*. *XI International AIDS Conference, Vancouver (Canada)*.

8. Vázquez-Valls E, Sierra-G JJ, Lopez-Marquez FC, Escoto-Delgadillo M, Lopez-Lomeli MC, and Campos-Lopez PI. 1998. No differences in Mexico between HIV-1 subtype B, sexual preferences and routes of transmission (Abstract 11180). 12th World AIDS Conference, Geneva (Switzerland).
9. Gudino JC, Martinez F, Alcantara P, and Soler C. 1996. Genotyping of Mexican HIV-1 isolates (Abstract 2071). XI International AIDS Conference, Vancouver (Canada).
10. Soto-Ramirez L, Renjifo B, Marlink R, and Essex M. 1996. Mexican HIV-1 V3 loop sequences grouped according to route of transmission (Abstract 2081). XI International AIDS Conference, Vancouver (Canada).
11. Soler Claudin C, and Gudino Rosales JC: [11 years since the discovery of the human immunodeficiency virus]. *Salud pública Mex* 1995;37:499-509.
12. Soler Claudin C, and Gudino Rosales JC. 1998. Subtyping of HIV-1 in Mexico by envHMA and gagPCR-FLP (Abstract 11198). 12th International AIDS Conference, Geneva (Switzerland).
13. Renjifo B, Blackard J, Klaskala W, Chaplin B, Shah P, McLane MF, Barin F, Esparza J, Zelaya JE, Osmanov S, Soto R, Fernandez JA, Baum M, Essex HIV-1 subtype B in Honduras. *Virus Res.*60: 191-197 (1999).
14. Lara C, Sallberg M, Johansson B, Rivera I, and Sonnerborg. The Honduran Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Epidemic is Dominated by HIV-1 Subtype B as determined by V3 Domain Sero-and Genotyping. *J Clin Microbiol.* 35: 783-784.(1997)

15. Candal DH, Pau CP, Luo C-C, Granade T, Steller H, Amador L, Meza R, Nuñez C, Schochetman G, George JR. 1997. Genetic Variability of HIV type 1 in Honduras. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 13:1349-1350 (1997)
16. Sabino E, Diaz R, Brigido L, Learn G, Mullins J, Reingold A, Duarte A, Mayer A, and Bush M. Distribution of HIV-1 subtypes seen in AIDS clinic in Sao Paulo City, Brazil. *AIDS* .10:1579-1584 (1996)
17. Campodonico M, Janssens W, Heyndrickx L, Fransen K, Leonaers A, Fay FF, Taborda M, Van Der Groen G, and Fay O. HIV Type 1 in Argentina and Genetic Heterogeneity of the V3 Region. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 12:79-81 (1996)
18. Warren R, Wong M, Melcher G, Blatt S, Cahn P, Perez H, Zapiola I, Bouzas MB, Muchnik G, Anderson S, and Kennedy R. Serologic Evaluation of Human Immunodeficiency Virus Type 1- Infected Individuals from Argentina and the United States Indicates a Similar Distribution of Subgroup B Isolates. *J Clin Microbiol*. 33:481-483.. 1995.
19. Cabello A, Cabral M, Vera ME, Kiefer R, Azorero R, Eberle J, Gürtler L, and Von Brunn A. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 11: 1135-1137. .1995.
20. Essex, M. Confronting the AIDS vaccine Challenge. *Technol. Rev.* 97: 23-29. 1994.
21. Van Harmelen, J, Wood R, Lambrick M, Rybicki E, Williamson A, Williamson C. An Association between HIV-1 subtypes and Mode of Transmission in Cape Town, South Africa. *AIDS*. 11:81-87. 1997.

22. Kunansont C, Foy H, Kreiss J, et al. HIV-1 Subtypes and Male to Female Transmission in Thailand. *Lancet*. 345: 1078-1083.. 1995.
23. Artenstein A, Coppola AE, Brown JK, Carr E, Sanders-Buellk E, Galbarini Jr, Mascola TC, VanCott P, Schonbrood and McCutchan. Multiple Introductions of HIV-1 subtype E into the Western Hemisphere. *Lancet*. 346:1197-1198.
24. Brodine SK, Mascola PJ, Weiss SI, Ito KR, Porter AW, Artenstein FC, Garland FE, McCutchan and Burke DS. Detection of diverse HIV-1 Genetic Subtypes in USA. *Lancet*. 346: 1198-1199.1995.
25. Clewey JP, Arnold KL, Barlow PR, Grant and Parry JV. Diverse HIV-1-1 Subtypes in the UK. *Lancet*. 347:1487. 1996.
26. Fransen k, Buve JN, Nkengasong M, Laga and Van der Groen G. Longstanding presence in Belgians of multiple non-B HIV-1 Subtypes. *Lancet* 347: 1403.1996.
- 
27. Pieniazek D, Yang C, and Lal RB: *Phylogenetic analysis of gp41 envelope of HIV-1 groups M, N, and O*, p. III-112-117. In B. Korber and C. Kuiken and B. Foley and B. Hahn and F. McCutchan and J. Mellors and J. Sodroski (ed.): *Human Retroviruses and AIDS 1998*. Theoretical Biology and Biophysics, Group T-10, Los Alamos National Laboratory: Los Alamos, 1998.
28. Moore JP and Nara PL, The role of the V3 loop of gp 120 in HIV infection. *AIDS* 1991;5 (Suppl.2):S21\_S33.

29. Goudsmit J, Boucher CA, Melen RH, Epstein LG, Smith L, van der Hoek L, and Bakker M. Human antibody response to a strain-specific HIV-1 gp120 epitope associated with cell fusion inhibition. *AIDS* 1988;2:157-164.
30. Grimaila RJ, Fuller BA, Rennert PD, Nelson MB, Hammarskjöld M, Potts B, Murray M, Putney SD, and Gray G. Mutations in the principal neutralization determinant of human immunodeficiency virus type 1 affect syncytium formation, virus infectivity, growth kinetics and neutralization. *J Virol* 1992;66:1875-1883.
31. Chesebro B, Wehrly K, Nishio J, and Perryman S. Macrophage-tropic human immunodeficiency virus isolates from different patients exhibit unusual V3 envelope sequence homogeneity in comparison with T cell tropic isolates: definition of critical amino acids involved in cell tropism. *J Virol* 1992;66:6547-6554.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

## MATERIALES Y METODOS GENERAL DE BIBLIOTECAS

1. Delwart EL, Shpaer EG, McCutchan FE, Louwagie J, Grez M, Rubsamen-Waigmann H, and Mullis JI: Genetic relationships determined by a DNA Heteroduplex mobility assay: Analysis of HIV-1 env genes. *Science* 1993;262:1257-1261
2. Novitsky VA, Montano MA, and Essex M: Molecular epidemiology of an HIV-1 subtype A subcluster among injection drug users in the southern Ukraine. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1998;14:1079-1085

3. Tompson JD, Higgins DG and Gibson TJ: CLUSTAL W. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994;22:4673-4680.
4. Felsenstein J: PHYLIP . phylogeny inference package, 3.572c. University of Washington:Seattle, WA, 1996.
5. Perriere G, and Gouy M: WWW-query:an on-line retrieval system for biological sequence banks. *Biochimie* 1996;78:364-369.
6. Page RDM: TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comp Appl Biosciences* 1996;12:357-358.
7. Siepel AC, Halpern AL, Macken C, and Korber BT: A computer program designed to screen rapidly for HIV type 1 intersubtype recombinant sequences. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1995;11:1413-1416.

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
**RESULTADOS**

1. <http://www.cenids.ssa.gob.mx/conasida>, CONASIDA. 1999. Mexico Web Site, vol. 1999.
2. CONASIDA. 1997. Programa de fortalecimiento para la Prevencion y Control del VIH/SIDA y otras enfermedades de transmision sexual.
3. Delwart EL, Shpaer EG, McCutchan FE, Louwagie J, Grez M, Rubsamen-Waigmann H, and Mullins JI: Genetic relationships determined by a DNA heteroduplex mobility assay: Analysis of HIV-1 *env* genes. *Science* 1993;262:1257-1261.

4. Novitsky VA, Montano MA, and Essex M: Molecular epidemiology of an HIV-1 subtype A subcluster among injection drug users in the Southern Ukraine. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1998;14:1079-1085.
5. Korber BT, Foley BT, Kuiken CL, Pillai SK, and Sodroski JG: *Numbering positions in HIV relative to HXB2CG*, p. III-102-111. In B. Korber and C. Kuiken and B. Foley and B. Hahn and F. McCutchan and J. Mellors and J. Sodroski (ed.): *Human Retroviruses and AIDS 1998*. Theoretical Biology and Biophysics, Group T-10, Los Alamos National Laboratory: Los Alamos, 1998.
6. Tompson JD, Higgins DG, and Gibson TJ: CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994;22:4673-4680.
7. Felsenstein J: *PHYLIP: phylogeny inference package, 3.572c*. University of Washington: Seattle, WA, 1996.
8. Perriere G, and Gouy M: WWW-query: an on-line retrieval system for biological sequence banks. *Biochimie* 1996;78:364-369.
9. Page RDM: TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comp Appl Biosciences* 1996;12:357-358.
10. Korber B, Kuiken C, Foley B, Hahn B, McCutchan F, Mellors J, and Sodroski J (ed.): *Human Retroviruses and AIDS 1998*. Los Alamos: Theoretical Biology and Biophysics, Group T-10, Los Alamos National Laboratory; 1998.

11. Korber BT, Foley BT, Kuiken CL, Pillai SK, and Sodroski JG: *Numbering positions in HIV relative to HXB2CG*, p. III-102-111. In B. Korber and C. Kuiken and B. Foley and B. Hahn and F. McCutchan and J. Mellors and J. Sodroski (ed.): *Human Retroviruses and AIDS 1998*. Theoretical Biology and Biophysics, Group T-10, Los Alamos National Laboratory: Los Alamos, 1998.

## DISCUSSION

1. <http://www.cenids.ssa.gob.mx/conasida>, CONASIDA 1999 Mexico Web Site, vol. 1999.
2. Vázquez-Valls E, Cheingsong-Popov R, Sierra-Quevedo JJ, Lister S, Lopez Márquez F, Weber J, Zuniga-Gonzalez L, Campos-Lopez P, and Esparza J. 1996. Monotypic HIV-1 subtype B in Guadalajara, Mexico (Abstract 2070). XI International AIDS Conference, Vancouver (Canada).
3. Vázquez-Valls E, Sierra-G JJ, Lopez-Marquez FC, Escoto-Delgadillo M, Lopez-Lomeli MC, and Campos-Lopez PI. 1998. No differences in Mexico between HIV-1 subtype B, sexual preferences and routes of transmission (Abstract 11180). 12th World AIDS Conference, Geneva (Switzerland).
4. Gudino JC, Martinez F, Alcantara P, and Soler C. 1996. Genotyping of Mexican HIV-1 isolates (Abstract 2071). XI International AIDS Conference, Vancouver (Canada).
5. Soto-Ramirez L, Renjifo B, Marlink R, and Essex M. 1996. Mexican HIV-1 V3 loop sequences grouped according to route of transmission (Abstract 2081). XI International AIDS Conference, Vancouver (Canada).

6. Soler Claudin C, and Gudino Rosales JC: [11 years since the discovery of the human immunodeficiency virus]. *Salud pública Mex* 1995;37:499-509.
7. Soler Claudin C, and Gudino Rosales JC. 1998. Subtyping of HIV-1 in Mexico by envHMA and gagPCR-FLP (Abstract 11198). 12th International AIDS Conference, Geneva (Switzerland).
8. Pieniazek D, Yang C, and Lal RB: *Phylogenetic analysis of gp41 envelope of HIV-1 groups M, N, and O*, p. III-112-117. In B. Korber and C. Kuiken and B. Foley and B. Hahn and F. McCutchan and J. Mellors and J. Sodroski (ed.): *Human Retroviruses and AIDS 1998. Theoretical Biology and Biophysics*, Group T-10, Los Alamos National Laboratory: Los Alamos, 1998.
9. Korber B, Kuiken C, Foley B, Hahn B, McCutchan F, Mellors J, and Sodroski J (ed.): *Human Retroviruses and AIDS 1998. Los Alamos: Theoretical Biology and Biophysics*, Group T-10, Los Alamos National Laboratory; 1998.
10. Renjifo B, Blackard J, Klaskala W, Chaplin B, Shah P, McLane MF, Barin F, Esparza J, Zelaya JE, Osmanov S, Soto R, Fernandez JA, Baum M, Essex HIV-1 subtype B in Honduras. *Virus Res*.60: 191-197 (1999)
11. Lara C, Sallberg M, Johansson B, Rivera I, and Sonnerborg. The Honduran Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Epidemic is Dominated by HIV-1 Subtype B as determined by V3 Domain Sero-and Genotyping. *J Clin Microbiol.* 35: 783-784.(1997)

12. Candal DH, Pau CP, Luo C-C, Granade T, Stetler H, Amador L, Meza R, Nuñez C, Schochetman G, George JR. 1997. Genetic Variability of HIV type 1 in Honduras. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 13:1349-1350 (1997)
13. Sabino E, Diaz R, Brigido L, Learn G, Mullins J, Reingold A, Duarte A, Mayer A, and Bush M. Distribution of HIV-1 subtypes seen in AIDS clinic in Sao Paulo City, Brazil. *AIDS* .10:1579-1584 (1996)
14. Campodonico M, Janssens W, Heyndrickx L, Fransen K, Leonaers A, Fay FF, Taborda M, Van Der Groen G, and Fay O. HIV Type 1 in Argentina and Genetic Heterogeneity of the V3 Region. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 12:79-81 (1996)
15. Warren R, Wong M, Melcher G, Blatt S, Cahn P, Perez H, Zapiola I, Bouzas MB, Muchnik G, Anderson S, and Kennedy R. Serologic Evaluation of Human Immunodeficiency Virus Type 1- Infected Individuals from Argentina and the United States Indicates a Similar Distribution of Subgroup B Isolates. *J Clin Microbiol*. 33:481-483.. 1995.
16. Korber B, Kuiken C, Foley B, Hahn B, McCutchan F, Mellors J, and Sodroski J (ed.): *Human Retroviruses and AIDS 1998*. Los Alamos: Theoretical Biology and Biophysics, Group T-10, Los Alamos National Laboratory; 1998.
17. LaRosa GJ, Davide JP, Weinhold K, Waterbury JA, Profy AT, Lewis JA, Langlois AJ, Dreesman GR, Boswell RN, Shadduck P, Holley LH, Karplus M, Bolognesi DP, Matthews TJ, Emini EA, and Putney SD: Conserved

*sequence and structural elements in the HIV-1 principal neutralizing determinant. Science 1990;249:932-935.*

18. Freed EO, Myers DJ, and Risser, R: *Identification of the principal neutralizing determinant of human immunodeficiency virus type 1 as a fusion domain. J Virol 1991;65:190-194.*

19. Javaherian K, Langlois AJ, LaRosa GJ, Profy AT, Bolognesi DP, Herlihy WC, Putney SD, and Matthews TJ: *Broadly neutralizing antibodies elicited by the hypervariable neutralizing determinant of HIV-1. Science 1990;250:590-593.*

20. Leonard CK, Spellman MW, Riddle L, Harris RJ, Thomas JN, Gregory T. *Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells. J Biol Chem 1990;265:10373-10382.*

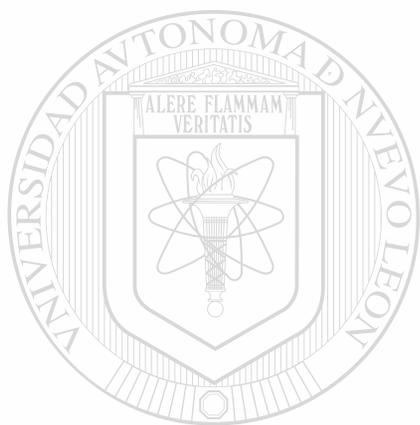
21. Cheng-Mayer C, Seto D, Tateno M, and Levy J: *Biological features of HIV-1 that correlate with virulence in the host. Science 1988;240:80-82*

22. Fenyö EM, Morfeldt-Manson L, Chiodi F, Lind B, vonGegerfelt A, Albert J, Olausson E, and Asjö, B: *Distinct replicative and cytopathic characteristics of human immunodeficiency virus isolates. J Virol 1988;62:4414-4419.*

23. Sakai K, Dewhurst S, Ma X, and Volsky DJ: *Differences in cytopathogenicity and host cell range among infectious molecular clones of human immunodeficiency virus type 1 simultaneously isolated from an individual. J Virol 1988;62:4078-4085.*

24. Tersmette N, Lange JMA, DeGoede REY, DeWolf F, Eeftink-Schattenkerk JKM, Schellekens PTA, Coutinho RA, Huisman JG, Goudsmit J, and Miedema F: Association between biological properties of human immunodeficiency virus variants and risk for AIDS and AIDS mortality. *Lancet* 1989;i:983-985.
25. Chou MJ, Lee TH, Hatzakis A, Mandalaki T, Mc Lane MF, Essex M, Antibody responses in early human immunodeficiency virus type 1 infection in hemophiliacs. *J Infect Dis* 1988,157:805
26. Moore JP, Ho DD, Antibodies to discontinuous or conformationally sensitive epitopes on the gp120 glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1 are highly prevalent in sera of infected humans. *J. Virol* 1993;67:863
27. Lee WR, Syu W, Du B, Matsuda M, Tan S, Wolf A, Essex M and Lee T: Nonrandom distribution of gp 120 N-linked glycosylation sites important for infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl Acad. Sci USA* 1992;89:2213-2217.
28. Gruters RA, Neefjes JJ, Tersmette M, et al. Interference with HIV-induced syncytium formation and viral infectivity by inhibitors of trimming glucosidase. *Nature* 1987;330:74.
29. Elder JH, McGee Js, Alexander S, Carbohydrate side chains of Rauscher leukemia virus envelope glycoprotein are not required to elicit a neutralizing antibody response. *J Virol* 1986;57:340

30. Benjourad A, Gluckman J-C, Rochat H, Montagnier L, Bahraoui E, Influence of carbohydrate moieties on the immunogenicity of human immunodeficiency virus type 1 recombinant gp160. *J virol* 1992;66:2473
31. Willey RL, Smith DH, Lasky LA, Theodore TS, Earl PL, Moss B, Capon DJ, and Martin MA. In Vitro Mutagenesis Identifies a Region within the Envelope Gene of the Human Immunodeficiency Virus that is Critical for Infectivity. *J Virology* 1998;62:139-147.



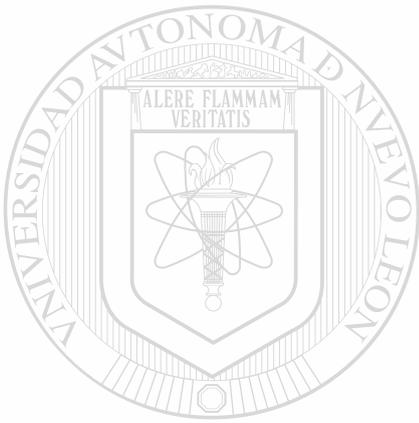
UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



