

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

“El TARGA como factor determinante en el tamaño del reservorio y la diversidad de los genes accesorios y reguladores del provirus del VIH-1“

T E S I S

Que presenta

Luis León Fuentes Romero

Matrícula 2163801958

Para obtener el grado de Maestro en Biología Experimental

**Directora Interna: Dra. Roxana Uri Miranda Labra
Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa**

**Director Externo: Dr. Luis Enrique Soto Ramírez
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición SZ**

Jurado:

Presidente: Dr. Edmundo Bonilla González

Secretaria: Dra. Mónica Viveros Rogel

Vocal: Dra. Claudia Selene Zárate Guerra

Vocal: Dr. Moisés Vergara Mendoza

Correo electrónico: luisleon.fuentes@gmail.com

luis.fuentes@infecto.mx

Iztapalapa, Ciudad de México a Mayo del 2022



Posgrado en
Biología Experimental

“El programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana, pertenece al Programa Nacional de Posgrado de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el nivel consolidado, y cuenta con apoyo del mismo consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN020”

Miembros del jurado:

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada:

“El TARGA como factor determinante en el tamaño del reservorio y la diversidad de los genes accesorios y reguladores del provirus del VIH-1”, que presentó:

Luis León Fuentes Romero

El día 22 de Octubre del año 2021



Presidente

Dr. Edmundo Bonilla González

Adscrito a la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Laboratorio de Biología Celular y Molecular



Secretaria

Dra. Mónica Viveros Rogel

Adscrita al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Departamento de Infectología.



Vocal

Dra. Claudia Selene Zárate Guerra

Adscrita a la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, Posgrado en Ciencias Genómicas.



Vocal

Dr. Moisés Vergara Mendoza

Adscrita al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Departamento de Infectología.

Miembros del Comité Tutorial:

Dr. Luis Enrique Soto Ramírez

Co-director Adscrito al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Departamento de Infectología. Laboratorio de Virología Molecular.

Dra. Roxana Uri Miranda Labra

Co-directora Adscrita a la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Laboratorio de Fisiología Celular.

Dra. Claudia Selene Zárate Guerra

Asesora Adscrita a la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, Posgrado en Ciencias Genómicas.

RESUMEN

Introducción. El tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA) ha reducido de manera significativa la morbilidad y mortalidad para millones de pacientes que viven con el VIH/SIDA. Sin embargo, las mutaciones generadas por las proteínas reverso-transcriptasa (RT) del virus y la enzima de edición del ARN mensajero: apolipoproteína B (APOBEC) de la célula hospedera, son responsables de la evasión del sistema inmune intrínseco y de la falla al tratamiento antirretroviral. El estudio de las mutaciones del VIH asociadas con la resistencia a los antirretrovirales se ha enfocado principalmente en el gen de la polimerasa (*pol*) que codifica para las enzimas virales proteasa, reverso-transcriptasa e integrasa, que son esenciales para la formación y la replicación del VIH. Sin embargo, el estudio de las mutaciones de los genes virales accesorios como *vif*, *nef*, *vpr* y *vpu* que son de gran importancia para la evasión de las restricciones celulares a patógenos intracelulares y de los genes *tat* y *rev* que regulan las primeras etapas de la transcripción y la traducción de las proteínas virales, es limitado con respecto a su diversidad genómica en los pacientes con y sin tratamiento antirretroviral.

Objetivo. Determinar la diversidad de los genes accesorios *vif*, *nef*, *vpr* y *vpu*, y de los genes reguladores *tat* y *rev* del provirus del VIH-1, bajo la presión selectiva de los fármacos antirretrovirales, en pacientes con y sin falla al TARGA, así como en pacientes sin tratamiento.

Metodología. Se realizó la determinación cuantitativa del VIH integrado en el genoma del hospedero (provirus) por qPCR a partir de las PBMCs de los 3 grupos de pacientes infectados con VIH: 24 pacientes sin TARGA, 38 pacientes sin falla al TARGA y 7 pacientes con falla al TARGA. Las secuencias provirales de los 4 genes accesorios *vif*, *nef*, *vpr* y *vpu* y de los 2 genes reguladores *tat* y *rev* se obtuvieron por la técnica de Sanger. Se utilizaron los programas MEGA, SimPlot v3.5.1, Statgraphic v15, Muscle y ViPR, para el análisis filogenético comparativo de las secuencias de los 6 genes virales entre los grupos de estudio. Para el análisis filogenético de cada gen, se realizó el análisis de la diversidad y del polimorfismo de los dominios funcionales, así como la diversidad promedio del conjunto y la distancia genómica. Las secuencias de los genes *vif*, *nef*, *vpr*, *vpu*, *tat* y *rev* de los

pacientes sin tratamiento se registraron en la base de datos de secuencias genéticas de los Institutos Nacionales de Salud de los EUA (NIH) *GenBank*.

Resultados. Se obtuvieron 184 secuencias provirales de los genes accesorios y reguladores de 24 pacientes sin tratamiento antirretroviral. No fue posible obtener las secuencias de los mismos genes de los pacientes con tratamiento, por lo que se optó por utilizar secuencias previamente reportadas en la base de datos de GenBank para el análisis comparativo entre el grupo de pacientes con y sin tratamiento. Donde se encontró un tendencia a agruparse de ambos grupos en los árboles filogenéticos, una mayor similitud a la secuencia de referencia (HXB2), así como un mayor polimorfismo en los pacientes sin tratamiento con respecto a los pacientes con tratamiento; con la excepción del gen *rev* que mostró una diferencia filogenética, una disimilitud y un polimorfismo mayor y significativo en pacientes con tratamiento.

Conclusiones. Este trabajo aporta información sobre la diversidad de los genes accesorios y reguladores del VIH en pacientes con y sin tratamiento antirretroviral. Estos pacientes presentaron características clínicas (CV, CPV y CD4) que concuerdan con lo reportado por otros autores, lo que puede significar que existe una correlación de la CPV y la probabilidad para amplificar y secuenciar partes del genoma viral. Existe una dispersión (variabilidad) de los taxa en el grupo de los pacientes sin tratamiento. El análisis de variabilidad concuerda con investigaciones previas donde se demuestra que los pacientes con tratamiento tienen una baja diversidad en el genoma proviral, con excepción del gen *rev*, ya que este gen presentó, en pacientes con tratamiento, un agrupamiento filogenético, una disimilitud y polimorfismo que es estadísticamente diferente a los pacientes sin tratamiento por lo que tiene que ser corroborado con estudios subsecuentes. En este estudio se realizó por primera vez un análisis comparativo de la diversidad de los genes accesorios y reguladores del VIH en pacientes mexicanos sin tratamiento antirretroviral

ÍNDICE

Miembros del jurado:	II
Miembros del Comité Tutorial:	III
RESUMEN	IV
INTRODUCCIÓN	1
Figura 1. Modelo gráfico del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH).....	3
Figura 2. Modelo gráfico del genoma del VIH.....	3
Latencia viral	4
Proteínas reguladoras Tat y Rev en los procesos de propagación viral	4
Figura 3 Ciclo de patogénesis del VIH. Al interior de la célula hospedera.....	6
Las proteínas accesorias del VIH-1 y su función en los procesos de evasión de la restricción celular	7
Vif.....	7
Vpr	7
Vpu.....	8
Nef	8
Nuevos factores de restricción celular	9
Antirretrovirales y reservorio viral	10
Figura 4 Grupos de fármacos antirretrovirales para el VIH.....	12
Las mutaciones como el principal motor de la diversificación y la adaptación viral	12
Diversidad y evolución viral	14
Diversidad y tratamiento antiretroviral	14
Justificación	16
Hipótesis	17
Objetivo General	17
Objetivos específicos	17
Materiales y Métodos:	18
Carga proviral y viral	18
Amplificación	19
Figura 5. Esquema del genoma del VIH donde se muestra la posición de los oligonucleótidos	19

Tabla 1. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación y la secuenciación de los genes accesorios y reguladores del VIH.....	20
Secuenciación	21
Análisis de datos.....	21
Análisis Estadístico.....	23
Resultados	23
Determinación cuantitativa de la carga viral en pacientes con y sin falla al TARGA.	23
Tabla 2. Resumen de datos clínicos de los pacientes con TARGA y que presentan falla	23
Tabla 3. Resumen de datos clínicos de los pacientes con TARGA y que no presentan falla	24
Tabla 4. Resumen de datos clínicos de los pacientes que no tienen TARGA.	24
Tabla 4. Análisis estadístico de la carga viral (CV), carga proviral (CPV) y conteo de células CD4+	25
Gráfica 1 Promedio del conteo de las células CD4+ de los tres grupos estudiados.	26
Gráfica 2. Promedio de la carga proviral (CPV) de los tres grupos estudiados.	26
Gráfica 3. Promedio de la cuantificación de la carga viral de los tres grupos estudiados.	27
Amplificación y secuenciación de los genes accesorios y reguladores.....	27
Figura 6. Amplificación de los genes tat y rev a partir de las CMSP de 9 pacientes sin TARGA (gel de agarosa	28
Figura 7. Amplificación del gen nef de 985 pb a partir de CMSP de 9 pacientes sin TARGA (gel de agarosa.....	29
Secuenciación	29
Figura 8. Alineamiento de las secuencias de los genes amplificados con el programa SeqScape v2.5 para	29
Identificadores (ID) de las secuencias de la base de datos de GenBank de pacientes con y sin tratamiento.....	31
Tabla 5. ID de la base de datos GenBank de las secuencias de los genes accesorios y reguladores del provirus del VIH-1 proveniente de pacientes mexicanos sin tratamiento.	31
Tabla 6. ID de las secuencias de los genes accesorios y reguladores del VIH obtenidos de la base de datos del GenBank	32
Figura 9. Alineamiento de los aminoácidos de la proteína Tat del VIH obtenidos a partir de las secuencias consenso de nucleótidos	33
Vpu.....	34
Análisis filogenético de Vpu.....	34

Figura 10. Construcción circular del árbol consenso del gen <i>vpu</i> del VIH.	35
Figura 11. Construcción rectangular del árbol filogenético del gen <i>vpu</i> del VIH	36
Análisis genómico de <i>Vpu</i>	37
Figura 12. Análisis comparativo de las secuencias consenso del gen <i>vpu</i>	38
Figura 13. Análisis comparativo de las secuencias individuales del gen <i>vpu</i>	39
Análisis del polimorfismo de los dominios funcionales de <i>vpu</i>	40
Gráfica 4. Se grafican los puntajes obtenidos en cada posición del gen <i>vpu</i>	41
Análisis estadístico del polimorfismo de los dominios funcionales de <i>vpu</i>	42
Tabla 8. Resumen estadístico del polimorfismo de los dominios funcionales del gen <i>vpu</i> de secuencias de pacientes sin tratamiento y con tratamiento (GenBank). Análisis realizado con Statgraphics v.15.2.05.....	43
<i>Vpr</i>	44
Análisis filogenético de <i>vpr</i>	44
Figura 14. Construcción circular del árbol consenso del gene <i>vpr</i> del VIH	45
Figura 15. Construcción rectangular del árbol filogenético del gene <i>vpr</i> del VIH....	46
Análisis genómico de <i>Vpr</i>	47
Figura 26. Análisis comparativo de las secuencias consenso del gen <i>vpr</i>	48
Figura 37. Análisis comparativo de las secuencias individuales del gen <i>vpr</i>	49
Análisis del polimorfismo de los dominios funcionales de <i>vpr</i>	50
Gráfica 5. Se grafican los puntajes obtenidos en cada posición del gen <i>vpr</i>	51
Análisis estadístico del polimorfismo de los dominios funcionales de <i>vpr</i>	52
Tabla 7. Resumen estadístico del polimorfismo de los dominios funcionales del gen <i>vpr</i> de secuencias de pacientes sin tratamiento y con tratamiento	53
<i>Vif</i>	54
Análisis filogenético de <i>vif</i>	54
Figura 18. Construcción circular del árbol consenso del gen <i>vif</i> del VIH	55
Figura 19. Construcción radial del árbol filogenético del gen <i>vif</i> del VIH	56
Análisis genómico de <i>vif</i>	57
Figura 20. Análisis comparativo de las secuencias consenso del gen <i>vif</i> de los pacientes con tratamiento (línea roja) y sin tratamiento (línea negra)	58
Figura 21. Análisis comparativo de las secuencias individuales del gen <i>vif</i> de los pacientes con tratamiento	59
Análisis del polimorfismo de los dominios funcionales de <i>vif</i>	60
Gráfica 6. Puntajes obtenidos en cada posición del gen <i>vif</i> , de las secuencias de pacientes con y sin tratamiento	61
Análisis estadístico del polimorfismo de los dominios funcionales de <i>vif</i>	62
Tabla 8. Resumen estadístico del polimorfismo de los dominios funcionales del gen <i>vif</i> de secuencias de pacientes sin tratamiento y con tratamiento	63

Tat	64
Análisis filogenético de <i>tat</i>	64
Figura 22. Construcción circular del árbol consenso del gen <i>tat</i> del VIH.....	65
Figura 23. Construcción rectangular del árbol filogenético del gen <i>tat</i> del VIH.....	66
Análisis genómico de <i>tat</i>	67
Figura 24. Análisis comparativo de las secuencias consenso del gen <i>tat</i>	68
Figura 25. Análisis comparativo de las secuencias del gen <i>tat</i> de los pacientes sin tratamiento.....	69
Análisis del polimorfismo de los dominios funcionales de <i>tat</i>	70
Gráfica 7. Se grafican los puntajes obtenidos en cada posición del gen <i>tat</i> , de las secuencias de pacientes con y sin tratamiento.....	71
Análisis estadístico del polimorfismo de los dominios funcionales de <i>tat</i>	72
Tabla 9. Resumen estadístico del polimorfismo de los dominios funcionales del gen <i>tat</i> de secuencias de pacientes sin tratamiento y con tratamiento.....	73
Rev	74
Análisis filogenético de <i>rev</i>	74
Figura 26. Construcción circular del árbol filogenético del gen <i>rev</i> del VIH.....	75
Figura 27. Construcción radial del árbol del gen <i>rev</i> del VIH.....	76
Análisis genómico de <i>rev</i>	77
Figura 28. Análisis comparativo de las secuencias consenso del gen <i>rev</i>	78
Figura 29. Análisis comparativo de las secuencias individuales del gen <i>rev</i> de los pacientes sin tratamiento.....	79
Análisis del polimorfismo de los dominios funcionales de <i>rev</i>	80
Gráfica 8. Puntajes obtenidos en cada posición del gen <i>rev</i> , únicamente de los sitios funcionales del gen, de las secuencias de pacientes con y sin tratamiento.....	81
Tabla 10. Resumen estadístico del polimorfismo de los dominios activos del gen <i>rev</i> de secuencias de pacientes sin tratamiento y con tratamiento.....	82
Nef	83
Análisis filogenético de <i>nef</i>	83
Figura 30. Construcción circular del árbol consenso del gen <i>nef</i> del VIH.....	84
Figura 31. Construcción radial del árbol filogenético del gen <i>nef</i> del VIH.....	85
Análisis genómico de <i>nef</i>	86
Figura 32. Análisis comparativo de las secuencias consenso del gen <i>nef</i> de los pacientes con tratamiento.....	87
Figura 33. Análisis comparativo de las secuencias del gen <i>nef</i> de los pacientes sin tratamiento.....	88
Análisis del polimorfismo de los dominios funcionales de <i>nef</i>	89

Gráfica 9. Puntajes obtenidos en cada posición del gen nef, de las secuencias de pacientes con y sin tratamiento	90
Tabla 11. Resumen estadístico del polimorfismo de los dominios funcionales del gen nef de secuencias de pacientes sin y con tratamiento.....	91
Análisis general de los seis genes accesorios y reguladores del VIH	92
Tabla 12. Estimaciones del promedio de diversidad y distancia evolutiva sobre todos los pares de secuencias de pacientes con y sin tratamiento	93
Gráfica 10. Estimaciones del promedio de diversidad de los genes accesorios y reguladores del VIH sobre los pares de secuencias de pacientes con y sin tratamiento.....	94
Gráfica 11. Estimaciones del promedio de la distancia evolutiva de los genes accesorios y reguladores del VIH sobre todos los pares de secuencias de pacientes con y sin tratamiento.....	95
Tabla 13. Resumen de los promedios de los puntajes de polimorfismo para cada sitio funcional	96
Discusión	97
Conclusiones	100
Perspectivas.....	101
Glosario	102
Bibliografía:.....	104

INTRODUCCIÓN

Hasta el 2020 aproximadamente 37.6 millones de personas en el mundo vivían con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) y 690,000 personas habían fallecido por causa de enfermedades relacionadas con el Síndrome de Inmunodeficiencia Humana (SIDA) en ese mismo año. A nivel mundial, 27.4 millones tienen acceso a la terapia antirretroviral, lo que representa el 73% del total de la población infectada con el virus (ONUSIDA, 2021; Ritchie, 2018) . En nuestro país desde 1983 y hasta el primer trimestre del 2021 se han diagnosticado a 318,000 personas con VIH, de los cuales 110,489 (34.73%) han fallecido y 191,462 (60.19%) siguen vivos (Ceballos, 2021). De los pacientes vivos, hasta el primer trimestre del 2021, 112,497 pacientes (58.7%) reciben tratamiento antirretroviral (C. G. González, Ruiz, G.P., Martínez, T.L., Santana, M.P., Ortiz, R.O., Manuel, C.J., Alejandre, V.A., 2021)

El VIH es el agente causante del SIDA (**Fig. 1**) y pertenece a la familia de los *Retroviridae*, del género *Lentivirus* (ICTV, 2020). Existen dos tipos de VIH, el tipo 1 (VIH-1) que hace referencia a los virus genéticamente relacionados encontrados en varias regiones de África, Asia, Europa y del continente americano, y el tipo 2 (VIH-2) que prevalece en varios países del oeste de África. Se han descrito 4 grupos filogenéticos principales del VIH-1: Main (M), Outlier (O), No-M (N) y el más reciente: el grupo P y cada uno de estos grupos se originó a partir de una transmisión independiente entre especies de primates no humanos y humanos (Sharp PM, Hahn BH. (2011). Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 1(1):a006841. doi: 10.1101/cshperspect.a006841). Los virus del grupo M se subcategorizan en 9 subtipos distintos: A-D, F-H, J y K y en numerosas formas recombinantes (CRFs, por sus siglas en inglés Circular Recombinant Forms). La distancia genética en un mismo subtipo viral puede variar entre un 15 y 20%, mientras que las distancias genéticas entre los diferentes subtipos varían entre un 25 a 35% (Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S. (2006). Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in. *AIDS.* 20:W13-W23.). El VIH-1 subtipo C es el que prevalece a nivel mundial con más del 50% de los casos. En México el subtipo prevalente es el B (Bbosa y col. , 2019).

El VIH es un virus envuelto de aproximadamente 100 nm de diámetro (**Fig. 1**) que tiene dos formas genómicas diferentes. En la fase extracelular, el virus tiene un genoma compuesto por dos copias idénticas de cadenas sencillas de ARN de polaridad positiva, forma a la que se le llama virión; mientras que en la fase intracelular presenta una doble cadena de ADN integrada dentro del genoma celular con repeticiones terminales largas (Long Terminal Repeats [LTR]) que flanquean a los genes virales, a esta forma se le llama provirus. Las dos formas tienen un genoma de aproximadamente 9,700 pares de bases (**Fig. 2**).

El genoma del VIH contiene 9 genes que codifican para 15 proteínas virales distintas y se clasifican en genes estructurales, reguladores y accesorios. Los genes estructurales son: *gag*, que codifica para los precursores de las proteínas de la cápside, el gen *pol* que codifica para los precursores de las enzimas virales como proteasa (PR), la retrotranscriptasa (RT), RNasa H y la integrasa (IN) y el gen *env* que codifica para los precursores de las glicoproteínas de la envoltura. Los genes reguladores *tat* (transactivador transcripcional) y *rev* (regulador de la expresión viral), codifican para las proteínas esenciales para la replicación viral. Los genes accesorios *vif*, *vpr*, *vpu* y *nef* codifican para proteínas que no son esenciales para la replicación del virus en ciertos tejidos o células en cultivo, aunque tienen una función relevante en la patogenia de la enfermedad, como se describe más adelante.

El VIH inicia su ciclo de patogénesis a través de la interacción de la envoltura viral con su célula blanco mediante el receptor principal CD4+ (Chun y col. , 1997) y los correceptores CCR5/CXCR4, lo que permite fusionar su envoltura con la membrana celular como vía para la inserción de la nucleocápside viral al citosol, donde se lleva a cabo la reverso transcripción del ARN a ADN viral por medio de la enzima reverso-transcriptasa (RT) y se constituye el complejo de pre-integración (PIC) el cual será transportado al núcleo celular (Li y col. , 2021; Müller y col. , 2021). Una vez insertado en el núcleo, el material genético viral se integra al ADN celular para formar al provirus (ADN viral integrado) (Engelman y Cherepanov, 2012). Una vez que el virus se encuentra integrado en su célula blanco y dependiendo del ciclo en el que se encuentre la célula, el virus puede dirigirse a una de dos opciones: propagarse o mantenerse en un estado de latencia (**Fig. 3**).

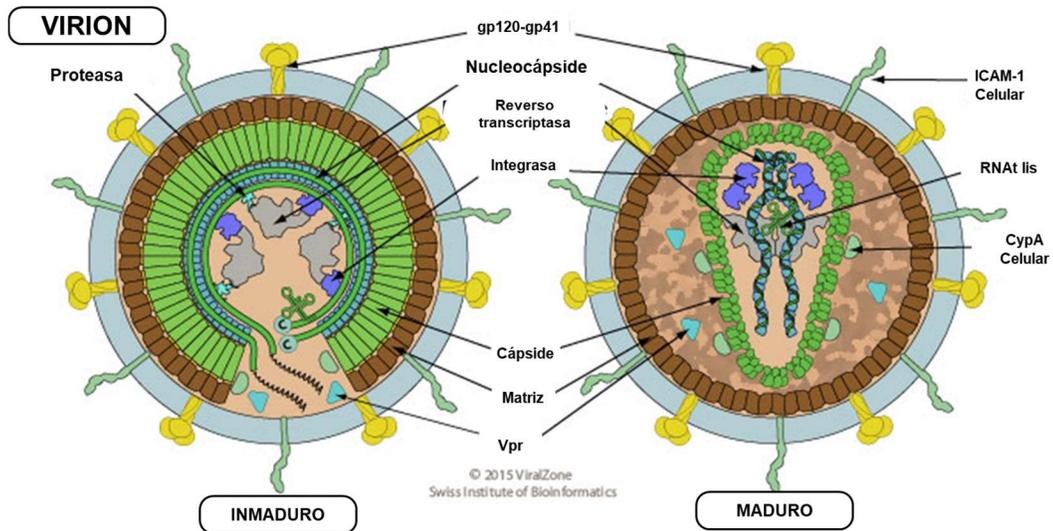


Figura 1. Modelo gráfico del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) donde se muestra una versión del **virus inmaduro** y maduro. Tomado y traducido de (Hulo y col. , 2011) .

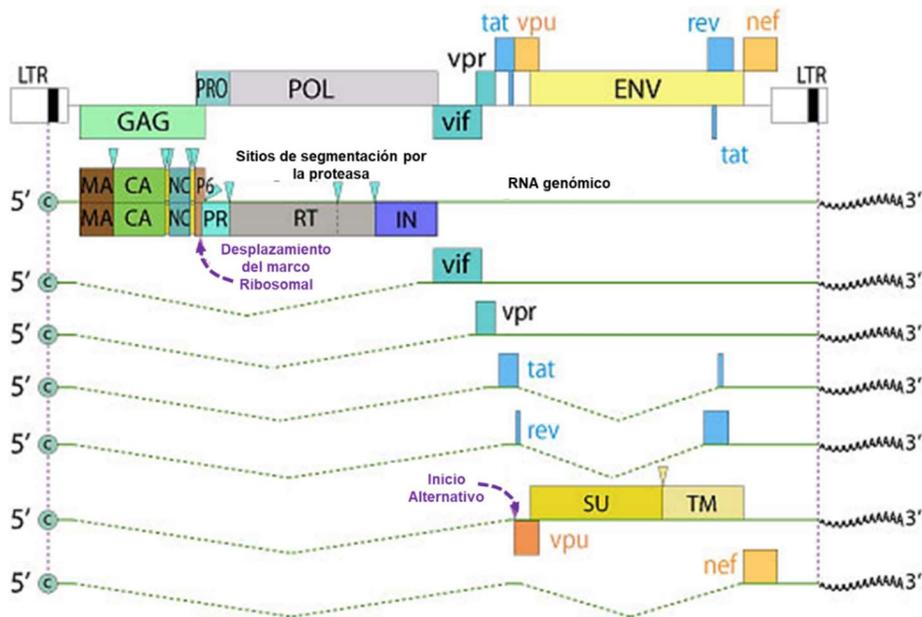


Figura 2. Modelo gráfico del genoma del VIH, donde se muestra la transcripción de los genes estructurales (*gag*, *pol* y *env*), de los genes accesorios (*vpr*, *vif*, *vpu* y *nef*) y de los genes reguladores (*tat* y *rev*). Se indican las sub-regiones de *gag* (MA –Anclaje de Membrana-, CA -Cápside- y NC –Nucleocápside-), de *pol* (PR-Proteasa-, RT-Reverso Transcriptasa- y IN-Integrasa-) y de *env* (SU-Superficie- y TM-Transmembranal-). Tomado y traducido de (Hulo y col. , 2011).

Latencia viral

La latencia viral se debe principalmente a la inhabilitación de las proteínas involucradas en la replicación viral NF- κ B y NFAT en el citoplasma y p-TEFb en el núcleo, impidiendo la propagación del virus y como consecuencia el establecimiento de la latencia viral (Karn, 2011; Melkova y col. , 2017; Perkins y col. , 1993; Wei y col. , 1998). De igual forma, se ha demostrado que la latencia viral puede producirse mediante vías que son intrínsecas al funcionamiento celular, como son la metilación y/o acetilación del ADN (Ruelas y Greene, 2013) y a la interferencia transcripcional (Coiras y col. , 2009; Richman y col. , 2009). Varios estudios indican la participación de factores virales y de la célula hospedera en el establecimiento y el mantenimiento de la latencia proviral.

Se ha descrito que la latencia viral es propia de todos los retrovirus (**Fig. 3**), se establece desde los primeros días de la infección como consecuencia de las diversas interacciones entre el virus y el hospedero y tiene un origen multifactorial.(Chun y col. , 1998). El fenómeno de latencia, tiene como consecuencia el establecimiento del reservorio viral (Eisele & Siliciano, 2012) que puede presentar una actividad transcripcional de baja a nula (“latencia profunda”), o alta (“reservorio activo”) (Cohn y col. , 2020). Una vez establecido el reservorio y sin la presencia de los antirretrovirales, el VIH se propaga mediante mecanismos y estrategias que facilitan la evasión del sistema inmune innato y adaptativo (Kirchhoff, 2010), esto es lo que se conoce como escape virológico (EV) (Klenerman y col. , 2000).

Proteínas reguladoras Tat y Rev en los procesos de propagación viral

El VIH proviral controla la expresión de sus genes a partir de dos proteínas Tat (transactivador de la transcripción viral) y Rev (regulador de la expresión de los genes virales) (**Fig. 2**) que funcionan como proteínas reguladoras, al ser las responsables de la activación de la transcripción y del transporte al retículo endoplásmico del material genético del virus, respectivamente (**Fig. 3**). Para la proteína trans-activadora o Tat, se conocen dos isoformas o confórmers: la forma menor Tat-1 de **72** aminoácidos y la forma mayor o Tat-2 de **86** aminoácidos que constituyen una proteína de 14kDa (UniProtKB, 2021). Esta

proteína se encuentra mayoritariamente en el núcleo de la célula hospedera, donde lleva a cabo su función, que inicia con la unión al elemento TAR, un oligonucleótido de RNA, para activar el inicio de la transcripción y la elongación del RNA viral a partir de la región promotora LTR del genoma proviral. También se le ha relacionado con la regulación de genes de la célula hospedera, teniendo un papel importante en la progresión a SIDA y del desarrollo de patologías intrínsecas a esta enfermedad, interfiriendo con los procesos celulares de proliferación, diferenciación y apoptosis (Ambrosino y col. , 2002; Foley y col. , 2018; Seelamgari y col. , 2004).

La proteína reguladora, Rev (Gallo y col. , 1988), es una fosfoproteína de 116 aminoácidos y aproximadamente 13 kDa, que tiene la capacidad de oligomerizarse y con ello, unirse a la región RRE (elemento de respuesta a Rev de ~350 nucleótidos) del RNAm viral, con el fin de transportar a éste afuera del núcleo (Rausch y Grice, 2015) y así iniciar el proceso de traducción (**Fig. 3**).

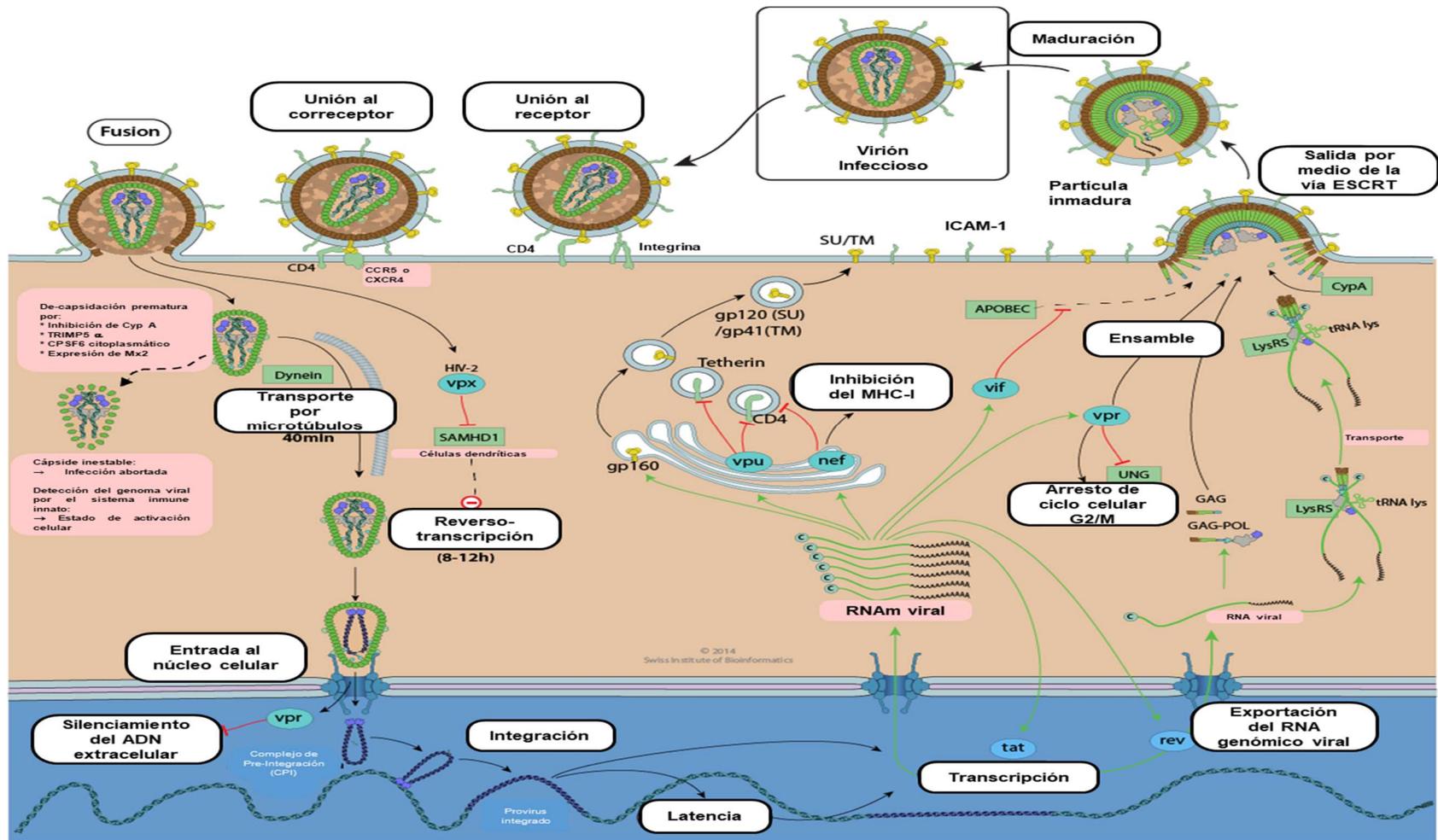


Figura 3 Ciclo de patogénesis del VIH. Al interior de la célula hospedera se ejemplifican las moléculas que participan en los procesos de restricción viral y las proteínas virales que inhiben la función de éstas. Tomado y traducido de (Hulo y col. , 2011).

Las proteínas accesorias del VIH-1 y su función en los procesos de evasión de la restricción celular.

Vif

Como parte de la respuesta inmune para contrarrestar al VIH, la célula hospedera posee proteínas que actúan como factores de restricción, aunque el virus es capaz de evadir el efecto de estas proteínas por diversos mecanismos (Simon y col. , 2015). Uno de estos factores de restricción celulares, son las proteínas APOBEC3G y 3F (A3F/G) que es una familia de proteínas que funcionan como deaminasa de citidina, la cual introduce un alto número de mutaciones transicionales del nucleótido citocina ($C_4H_5N_3O$, ) a uracilo ($C_4H_4N_2O_2$, ) a todo lo largo del genoma viral, haciéndolo inviable. Para contrarrestar este efecto, la proteína viral **Vif** o **factor de infectividad (Fig. 2)** es una fosfoproteína de 23 kDa (Fisher y col. , 1987) que inhibe a APOBEC (**Fig. 3**) por dos vías diferentes: i) degradación vía proteosoma por medio de la ubiquitinación y ii) inhibiendo la traducción del gen de A3F/G al interactuar con la región UTR 5' del RNAm (Hope y col. , 2018). Otra de las funciones en las cuales Vif tiene un papel importante, es en el reforzamiento de la estabilidad del core del virus, con lo cual previene una degradación prematura en el proceso de ingreso de la partícula viral a su célula hospedera (Jager, Cimermancic, y col. , 2011; Jager, Kim, y col. , 2011; Leitner, 2003; Seelamgari y col. , 2004; Sheehy y col. , 2002; Suspene y col. , 2006).

Vpr

Otro factor de restricción, es la proteína SAMHD1 que pertenece a la familia de las nucleasas y fosfohidrolasas, que degradan a los dNTP's celulares e inhiben la síntesis de la nueva cadena de ADN realizada por la RT viral. SAMHD1 es neutralizado por la **proteína viral R (Vpr)** del VIH (**Fig. 2**), induciendo su degradación por la vía del proteosoma (Aravind y Koonin, 1998; Laguette y col. , 2011; Lahouassa y col. , 2012). Vpr está conformada por 96 aminoácidos (14kDa), se encuentra incorporada al virión maduro (**Fig. 1**) y se localiza en el núcleo de la célula hospedera y se ha demostrado también que presenta otras funciones en la regulación de la célula hospedera como: i) en la reducción de la

ubiquitinación del total de las proteínas (Arora y col. , 2014), ii) la importación al núcleo del complejo de pre-integración viral desde el citosol, iii) con la unión a DCAF-1 (*DNA binding protein-1 and Cullin-4a-associated factor-1*) (Le Rouzic y col. , 2007), promueve el arresto en la etapa G2 del ciclo celular de la célula hospedera, iv) en la función de la mitocondria con la interacción de las especies reactivas de oxígeno, v) en el metabolismo de la glucosa, vi) en la transcripción celular y vii) en el metabolismo del ADN (Foley y col. , 2018; Gonzalez, 2017; Kogan y Rappaport, 2011) . La mayoría de estas funciones, las realiza en la etapa inicial del ciclo de infección, al integrarse al nuevo virión mediante su oligomerización (Venkatachari y col. , 2010).

Vpu

La Teterina (BST-2) es una proteína intracelular que funciona como un sensor de infección viral y de “captura” o anclaje molecular de la partícula viral en la región del citosol de la membrana celular, evitando la liberación del virión. Sin embargo, la BST-2 es contrarrestada por la **proteína viral U (Vpu) (Fig.2)** (S. J. Neil y col. , 2008; Van Damme y col. , 2008), que es específica para el VIH-1 y para el SIVcpz (Virus de Inmunodeficiencia Simia). Es una fosfoproteína de 16 Kd (81 aminoácidos) que posee un anclaje mitad hidrofóbico N-terminal y mitad hidrofílico, que le permite integrarse a las membranas celulares, principalmente en el retículo endoplásmico y en la membrana celular, en donde realiza sus dos funciones conocidas: i) en el retículo endoplásmico es fosforilada por la caseína cinasa II en la posición Ser52 y Ser56 con lo cual media la degradación de la proteína CD4 (**Fig. 3**) (Paul y Jabbar, 1997) y ii) en la membrana citoplasmática, se une a BST-2, para que ésta sea degradada por la vía del proteosoma (Leitner, 2003; S. J. D. Neil y col. , 2008; Venkatesh y Bieniasz, 2013). Vpu participa también en el proceso de liberación de los viriones de la célula infectada.

Nef

Simultáneamente con Tat y Rev, se lleva a cabo la transcripción de la proteína accesoria Nef (*Factor negativo*) (Basmaciogullari y Pizzato, 2014). Nef es una fosfoproteína constituida por aproximadamente 207 aminoácidos y con un peso de 27 kDa que se expresa como un transcrito temprano durante el ciclo de replicación viral (**Fig. 2**). Es una proteína que lleva incorporada, en el extremo amino (NH₃) terminal, un grupo miristilo

($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$ - ácido graso saturado) (Fackler y col. , 1997), que permite la interacción con lípidos y proteínas membranales involucradas en el tráfico de señales hacia el interior de la célula hospedera (endosomas) o hacia el exterior de ésta (exosomas). Este proceso lo realiza a partir del secuestro de la maquinaria vesicular celular, principalmente por la vía post-traducciona, interfiriendo con el transporte de la carga proteica en la vía endocítica, así como en vía secretora terminal (p. ej. red trans-Golgi, sistema endo-lisosomal y en la membrana plasmática) (Pereira y daSilva, 2016). Debido a su habilidad para interferir con la maquinaria del tráfico celular, se ha demostrado que Nef es capaz de perturbar a todo el sistema de señalamiento intracelular (Basmaciogullari & Pizzato, 2014; Foley et al., 2018). Se ha reportado que Nef interacciona con aproximadamente 80 proteínas diferentes de la célula hospedera (CD4^+) (Jager, Cimermancic, y col. , 2011), entre las más estudiadas son el MHC-I (*Major Histocompatibility Complex-I*) y CD4 , que son regulados a la baja por Nef (**Fig. 3**). Es probable que Nef tenga un papel relevante en la apoptosis celular y en el aumento de la infectividad del virus.

El receptor membranal CD4 es regulado a la baja por Nef con el propósito de prevenir la re-infección de la célula (R. E. Benson y col. , 1993) y así facilitar la salida de la progenie viral, evitando la interacción de la proteína de la envoltura viral gp120 con el CD4 de la membrana celular (Ross y col. , 1999). De igual forma el MHC-I se regula a la baja con el fin de evitar que las células T-citotóxicas provoquen la muerte de la célula infectada (Wonderlich y col. , 2011).

Nuevos factores de restricción celular

Más recientemente, se han descrito otros factores proteicos que se han relacionado con la restricción o la supresión viral intracelular: como la SERINC5 (Trautz y col. , 2017) , la ABIN1 (Chen y col. , 2017), el interferón epsilon (Garcia-Minambres y col. , 2017), la proteína TRIM5 α la cual induce la degradación de las poliproteínas de la nucleocápside viral, reduciendo con ello, la formación de nuevas partículas virales (Ozato y col. , 2008), la SUN2 (Donahue y col. , 2016) y el proceso de autofagia (Sagnier y col. , 2015). Hasta ahora se desconoce el mecanismo por el cual el VIH evade a estos factores de restricción celular recientemente descritos.

Antirretrovirales y reservorio viral

Como parte de las estrategias que se utilizan para evitar la progresión de la enfermedad que causa el VIH, se han desarrollado fármacos antirretrovirales que actúan en las diferentes etapas de la patogénesis viral. Esta terapia se compone actualmente de 24 diferentes fármacos que se agrupan en cinco principales categorías: i) análogos nucleósidos, los cuales carecen del grupo hidroxilo-3', por lo que se bloquea la incorporación de nuevos dNTPs y se inhibe la síntesis del ADN viral; ii) análogos no nucleósidos, los cuales inducen en la reverso-transcriptasa (RT) una región hendida hidrofóbica cercana al sitio activo, que reduce en gran medida su actividad; iii) inhibidores de proteasa que bloquean el sitio activo de la proteasa viral; iv) inhibidores de integración, que inhiben la transferencia del ADN viral a la cromatina del hospedero y v) inhibidores de entrada, con dos principales blancos moleculares para evitar la fusión de las membranas viral y celular: a) la glicoproteína transmembranal de la envoltura gp41 y b) el epítipo hipervariable V3 de la glicoproteína de la envoltura gp120 que se une al receptor de quimiocinas CCR5 de la célula hospedera (Arts & Hazuda, 2012) (**Fig. 4**).

El uso de los fármacos cambió radicalmente la historia natural de la infección por el VIH al generar una reducción significativa de la viremia o carga viral (CV) en el plasma a niveles indetectables y como consecuencia, la restauración parcial del sistema inmune (Palmisano y Vella, 2011), dando como resultado la disminución de la morbilidad, mortalidad y la transmisión de la infección a individuos susceptibles o expuestos a la infección (Castilla y col. , 2005; Murphy y col. , 2001).

Cuando se consideraba que la TARGA (Tratamiento Antirretroviral de Gran Actividad) (Cáncer, 2021) era capaz de “curar” la infección por el VIH (Perelson et al., 1997), se descubrió que al interrumpir el tratamiento, la CV se volvía detectable debido a la existencia de lo que hoy definimos como reservorios virales (Finzi y col. , 1997).

Este reservorio es precedido por una fuerte respuesta inmunológica, conocida como infección aguda (Chun y col. , 1997; Finzi y col. , 1997). El reservorio viral se caracteriza por tener una vida media larga, un recambio celular bajo, por no ser susceptible a la acción de las drogas antirretrovirales (ART) y por no ser detectado por el sistema inmune (Pierson

y col. , 2000). La mayor parte del reservorio viral se localiza en las subpoblaciones de las células T CD4+ de memoria central (T_{CM}) y de memoria transitoria (T_{TM}) (Chomont y col. , 2009; Chun y col. , 1997). Estas subpoblaciones linfocitarias se han relacionado con la detectabilidad transitoria del virus (*blips*), que son viremias persistentes con un número de copias bajo, que repueblan al reservorio y en su conjunto son el origen de la detectabilidad o “rebote” virológico una vez suspendido el TARGA (Chomont y col. , 2009; Mzingwane y Tiemessen, 2017; Pace y col. , 2011). Por lo tanto, es indispensable mantener un apego estricto y de por vida al TARGA para controlar la infección por VIH.

La determinación del reservorio viral se mide como Carga Proviral (CPV) por diferentes técnicas moleculares, que valoran cuantitativamente la cantidad en copias de una parte del genoma del VIH integrado en la célula hospedera (Graf y O'Doherty, 2013). El TARGA tiene dos grandes limitaciones: i) no impide el establecimiento del reservorio viral aunque los antirretrovirales se administren de forma temprana (Chun et al., 1998) y ii) no alcanza la concentración suficiente para inhibir completamente la replicación del virus en los sitios “santuarios”, como los nódulos linfáticos y el cerebro y en consecuencia, la probable producción de cepas resistentes al tratamiento administrado (Lorenzo-Redondo y col. , 2016; McGee y col. , 2006).

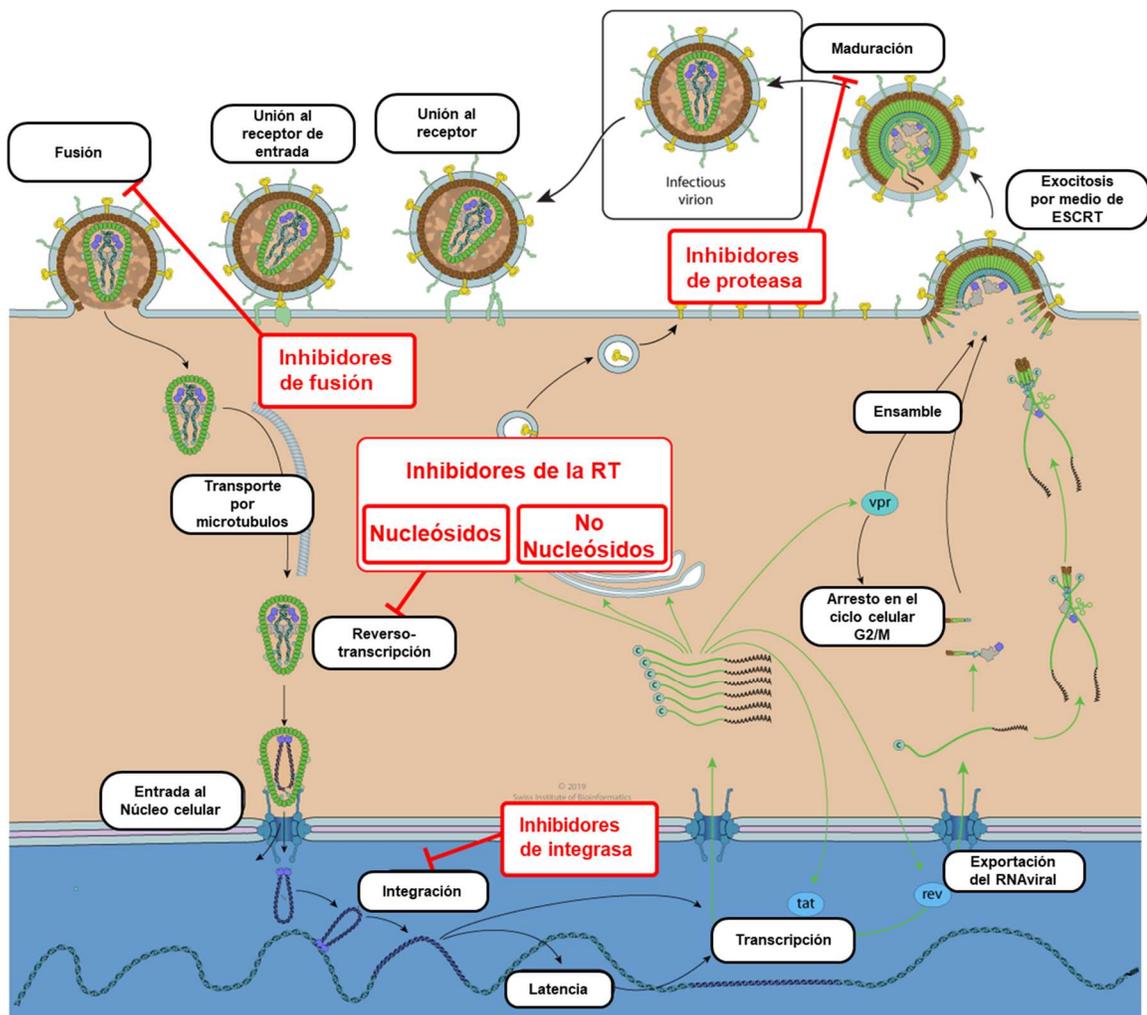


Figura 4 Grupos de fármacos antirretrovirales para el VIH y sus principales blancos de acción en el ciclo de patogénesis del virus. Tomado y traducido de (Hulo y col. , 2011).

Las mutaciones como el principal motor de la diversificación y la adaptación viral

La principal vía que utiliza el virus para evadir la acción de los fármacos, son las mutaciones que surgen por la enzima RT al generar una alta tasa de mutaciones debido a que carece de la función de corrección de error (*proofreading*). Esta enzima tiene un rango de error de aproximadamente 3×10^{-5} por cada nucleótido que incorpora a la nueva hebra que se está elongando dando origen a la existencia de una mutación por cada 1,000-10,000 nucleótidos incorporados (Arts y Hazuda, 2012; Bailey y col. , 2004).

Otro factor importante que incide en la variabilidad del virus proviene del mismo hospedero, a través de la proteína APOBEC3G que genera mutaciones a lo largo del genoma viral, como una estrategia de restricción viral. Paradójicamente, contribuye a la diversidad del virus de tal forma que se generan variantes resistentes que pueden inducir el escape virológico (Fourati y col. , 2014; Russell y col. , 2009; Sadler y col. , 2010). Más recientemente, se ha demostrado que APOBEC3G, más que la RT del virus, es la proteína que tiene el papel principal en la generación de la diversidad viral, al ser la responsable del 98% de la mutaciones que se producen *in vivo* en comparación con el 2% de la RT (Cuevas y col. , 2015).

Una de las consecuencias del surgimiento de las mutaciones en el genoma viral es el incremento de la CV y por consecuencia, del escape virológico. Este incremento está asociado con la falta de apego al tratamiento por parte del paciente, la toxicidad del fármaco, la dosificación sub-óptima de los antirretrovirales, las mutaciones asociadas con resistencia a los antirretrovirales, la respuesta inmunológica limitada del hospedero y de manera importante, con la diversidad genómica que tiene el virus. Estos factores hacen que la falla al tratamiento antirretroviral sea un fenómeno muy complejo (Gulick, 2004) que contribuye a la diversificación del genoma viral, favoreciendo a las subpoblaciones virales con capacidad de evadir al sistema inmune y al tratamiento (Kepler y Perelson, 1998; Tang y Shafer, 2012), dándole al virus una ventaja adaptativa.

El surgimiento de nuevas variantes o subpoblaciones virales tiene un papel preponderante en la tasa de replicación viral, acompañada de un intercambio muy rápido de nuevos viriones, dando lugar a procesos de recombinación, inserción y delección (*indels*) en el genoma viral que son relativamente grandes y en su conjunto, son una fuente de adaptabilidad del virus al hospedero y constituyen un repositorio dinámico de variantes genotípicas y fenotípicas. Esta gran diversidad también es el resultado de factores como la compartimentalización, el establecimiento de la latencia y por ende el de los reservorios, que producen subpoblaciones virales radicalmente divergentes (Domingo y col. , 2012; Korber y col. , 2001).

Diversidad y evolución viral

Desde el punto de vista evolutivo, la respuesta inmunológica (intrínseca, innata y adquirida) y la acción que los fármacos ejercen sobre el virus, inducen una presión selectiva positiva donde el número de las variantes virales aumenta con el tiempo y tienden a fijarse en la mayoría de la población (Price y col. , 1997; Wagner, 2002).

En 1999 se identificaron regiones en el genoma del VIH que están bajo una fuerte presión selectiva que favorece la diversificación y evolución del virus que causan el escape de éste a las restricciones inmunológicas que enfrenta en el hospedero, incluso en los pacientes con TARGA (Gunthard y col. , 1999; Martinez y col. , 1999).

La falla al tratamiento antirretroviral tiene un origen multifactorial, por lo que se ha estudiado desde diferentes enfoques y uno de éstos es el de la evolución viral. En 2009 Hong y col. estudiaron de forma retrospectiva a siete pacientes que fallaron al TARGA, durante 96 semanas en donde clonaron y secuenciaron de forma parcial el gen *pol* del VIH, realizando un análisis filogenético con el que concluyeron que la población viral de estos pacientes tenía un cambio dinámico y se agrupaba de una manera dependiente del tiempo, mientras que la diversidad disminuía de forma consistente (S. Hong y col. , 2009).

En 2010 Fourati y col. evaluaron a 96 pacientes sin falla y a 65 con falla al tratamiento. En esta investigación, se analizó al gen de la proteasa, la reversotranscriptasa y *vif*, y se concluyó que los pacientes que fallaban a tratamiento, presentaban mutaciones en *vif* (K22H) que impedían inactivar eficientemente a la proteína APOBEC3. Se observó que al aumentar el número de mutaciones en *vif*, aumentaba el número de mutaciones asociadas con la resistencia al TARGA (Fourati y col. , 2010). En 2017 Ouyang y col. compararon a 25 pacientes sin falla contra 20 con falla al TARGA, estudiando el gen *env* y la acción de los anticuerpos neutralizantes del hospedero. En este trabajo concluyeron que el escape del VIH a la acción de los anticuerpos anti-*env*, puede tener un papel importante en la falla al TARGA en los pacientes con tratamiento de largo plazo (Ouyang y col. , 2017).

Diversidad y tratamiento antiretroviral

Aunque los mecanismos de diversificación del VIH han sido ampliamente estudiados en los modelos celulares *in vitro*, los datos *in vivo* son muy escasos. Recientemente más grupos

se han dedicado a estudiar los mecanismos que influyen en la diversidad viral *in vivo* (Redmond P. Smyth y Negroni, 2016).

En los estudios sobre la diversificación viral en pacientes con un abatimiento eficiente de la CV debido a la TARGA, se ha comprobado que en los reservorios existen viriones que son considerados inviables, debido a múltiples mutaciones a lo largo del genoma proviral (Ho y col. , 2013). Sin embargo, existen virus intactos en los reservorios que presentan cambios mínimos en su genoma, en comparación con los provirus provenientes de pacientes sin tratamiento (Dampier y col. , 2016; Lee y col. , 2019; van Zyl y col. , 2018). Esta reducida diversidad observada en los provirus de pacientes con tratamiento se debe principalmente: i) al control de la infección viral por acción de los antirretrovirales, ii) a la falta de exposición a los factores de restricción celular, iii) a los mecanismos de mutagénesis de la RT, iv) a la acción de APOBEC y v) a los procesos de recombinación que se llevan a cabo exclusivamente en las etapas de su ciclo de replicación (Redmond P Smyth y col. , 2012), Además el único medio de propagación de las variantes virales es por medio de la expansión clonal (Simonetti y col. , 2016), en diferentes órganos y tejidos, conocidos como compartimentos (R. L. Miller y col. , 2019). En contraste, las secuencias de los provirus provenientes de pacientes sin tratamiento, presentan una gran diversidad genómica, debido a que están sometidas a todos los factores celulares y virales anteriormente descritos (de Azevedo y col. , 2017; Jung y col. , 2002; Meyerhans y col. , 2003).

Justificación

Actualmente la gran mayoría de los estudios sobre la diversidad genómica del VIH se han enfocado en tres proteínas virales codificadas por el gen *pol*: proteasa, reversotranscriptasa e integrasa que están involucradas directamente con la resistencia al TARGA (Fig. 2 y 4) (A. Kumar y Jadhav, 2011; Rojas Sanchez y Holguin, 2014). Existen pocos estudios que correlacionen la variabilidad de los genes accesorios y reguladores del VIH con el tratamiento (S. Saurya y col. , 2002; Shreesh Saurya y col. , 2005), fenómeno conocido también como epistasia que se define como la desviación estadísticamente significativa a partir de una combinación aditiva de mutaciones en dos genes diferentes y sus efectos en el fenotipo (Phillips, 2008).

El estudio de la diversidad de los genes accesorios y reguladores del VIH y su relación con el TARGA, tiene una gran relevancia debido al papel que tienen en el establecimiento del reservorio, en su capacidad de controlar la maquinaria celular de restricción viral y en la propagación no clonal de este virus. La descripción y análisis genómico de estos genes en pacientes con y sin tratamiento nos da información acerca del impacto que puede tener el TARGA en el control de la infección así como en la inhibición, el establecimiento y el tamaño del reservorio viral (Gonzalez, 2017; Macpherson y col. , 2005; Michienzi y col. , 2003; R. H. Miller y Sarver, 1997).

Este trabajo pretende averiguar la diversidad en los genes accesorios y regulatorios a partir de muestras de pacientes con tratamiento y sin tratamiento, con el objetivo de aportar información sobre el papel que tiene el TARGA en la diversidad genómica del VIH en genes que no son su principal blanco de acción inhibitoria.

Hipótesis

Bajo la presión selectiva de los fármacos antirretrovirales, la diversidad de los genes accesorios y reguladores del VIH en pacientes con TARGA será menor en comparación con los pacientes sin tratamiento o con falla a éste.

Objetivo General

Determinar la diversidad de los genes accesorios (*vif*, *nef*, *vpr* y *vpu*) y reguladores (*tat* y *rev*) del provirus del VIH, bajo la presión selectiva de los fármacos antirretrovirales, en pacientes con y sin falla al TARGA, así como en pacientes sin tratamiento.

Objetivos específicos

1. Determinar cuantitativamente el reservorio viral (carga proviral) y de las partículas virales circulantes (carga viral), en pacientes con y sin falla al TARGA, así como en pacientes sin tratamiento.
2. Amplificar, secuenciar y analizar los genes accesorios y reguladores del provirus del VIH en pacientes con y sin falla al TARGA, así como en pacientes sin tratamiento.
3. Analizar la diversidad de los genes accesorios (*vif*, *nef*, *vpr* y *vpu*) y reguladores (*tat* y *rev*) del provirus del VIH en presencia o ausencia del TARGA, mediante análisis bioinformático.

Materiales y Métodos:

En este estudio se incluyeron a 38 pacientes con VIH bajo los siguientes criterios de inclusión: i) que estén con tratamiento antirretroviral, y ii) que no hayan tenido una determinación de carga viral detectable en plasma en los últimos 5 años; así mismo se incluyeron 7 pacientes con falla, bajo los siguientes criterios de inclusión: i) que estén con tratamiento antirretroviral y ii) que en su última determinación de CV hayan tenido detectabilidad. Los criterios de exclusión son los que no cumplan los anteriores criterios para ambos grupos. .

Se tomaron 32 ml de sangre periférica en tubos con anticoagulante EDTA (K₂). Se separó el plasma de la fracción celular y se almacenó a -70°C. Se procedió a la separación de las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) por medio de la técnica de gradiente de densidad con una solución de diatrizoato de sodio-polisacarosa (*Lymphoprep*, Axis-Shiel, Norway). Las CMSP se contaron de forma automática con el equipo *Countess* (Invitrogen, USA) y se congelaron 10x10⁶ células en un mililitro de medio de congelación (10% DMSO + 90% SFB) a -70°C para su uso posterior.

Para realizar el análisis comparativo se utilizaron muestras almacenadas de CMSP de pacientes que no habían recibido tratamiento antirretroviral. Estas muestras fueron recolectadas y almacenadas a -70°C entre los años de 1999 y 2005.

Se realizó la separación del ADN genómico total de las CMSP por medio del estuche comercial *QIAamp DNA Blood Mini Kit* (QIAGEN, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se cuantificó la pureza y la concentración del ADN por espectrofotometría con el equipo *NanoDrop ONE* (Invitrogen, USA).

Como un control de amplificación, secuenciación y determinación cuantitativa de la carga proviral, se utilizó a la línea celular 8E5, que es derivada de linfoblastos humanos y que contiene una copia única del genoma del VIH-1 defectuosa y que no es infecciosa.

Carga proviral y viral

Para la determinación cuantitativa del VIH integrado al genoma celular (provirus) se utilizó la técnica de Alu-PCR (Brussel y col. , 2005). Se realizó un primer PCR de punto final, con

los oligonucleótidos (5' → 3') *Alu1* TCCCAGCTACTGGGGAGGCTGAGG y *Alu2* GCCTCCCAAAGTGCTGGG ATTACAG, con las siguientes condiciones: 95°C durante 2 min, 15 ciclos de 95°C por 15 s, 60°C por 15 s y 68°C por 3:30 s terminando con 68°C por 7 min y 4°C desde 10 min. Posteriormente se realizó un PCR en tiempo real (qPCR) con los oligonucleótidos *F8* 5'-GGCTAACTAGGGAACCCACTG-3', *R8* 5'-GCTAGAGATTTTCCCACTGACTAA-3' y la Sonda 5'/56-FAM/CCACAGTCACACAACAGACGGGACA/36TMASp/3', con las siguientes condiciones: en una primera etapa de 95°C por 10 min, 50 ciclos de 95°C por 15 s y 60°C por 1 min. Una alícuota del plasma almacenado se utilizó para la determinación de la carga viral del VIH mediante RT-PCR en tiempo real en el sistema automático *ABBOTT* que tiene un rango de detección de la carga viral de 40 a 10, 000,000 de copias/ml.

Amplificación

Se diseñaron 8 oligonucleótidos a partir del genoma de referencia HXB2 del VIH (K03455-1) (**Fig. 5**) como se describe en la **tabla 1**.

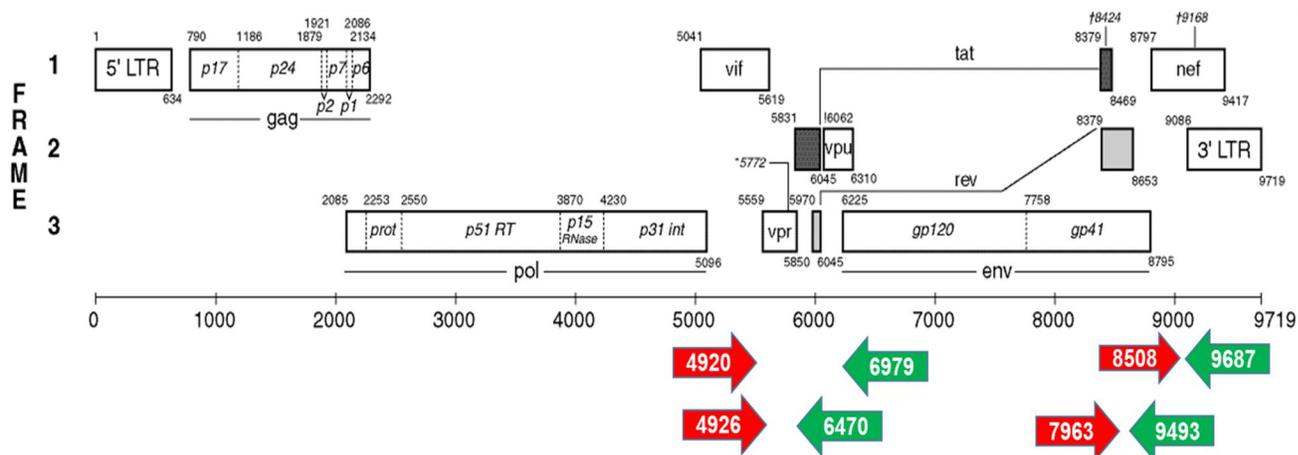


Figura 5. Esquema del genoma del VIH donde se muestra la posición de los oligonucleótidos usados para la amplificación de los genes accesorios y reguladores del VIH.

Tabla 1. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación y la secuenciación de los genes accesorios y reguladores del VIH.

ID	Dirección 5' → 3'	Longitud del amplicón	Genes
4920 Forward	CAGAAATCCACTTTGGAAAGGAC	Primera amplificación de 2058 pb	<i>vif</i>
6979 Reverse	ATTCCATGTGTACATTGTACTGT		<i>vpr</i>
4926 Forward	ACCCTTTGGAAAGGACCAGC	Segunda amplificación 1544 pb	<i>vpu</i>
6470 Reverse	TTGTGGGTTGGGGTCTGTGG		y el primer exón de <i>tat</i>
7963 Forward	TCCTGGCTGTGGAAAGATACC	Amplificación de 1724 pb	<i>rev</i>
9687 Reverse	GCTAGAGATTTTCCACACTGACTAA		Segundo exón de <i>tat</i>
8508 Forward	TTCAGCTACCACCGCTTGAGAG	Amplificación de 985 pb	<i>rev</i>
9493 Reverse	TATGCAGGATCTGAGGGCTCG		<i>nef</i>

Para la amplificación y posterior secuenciación de los genes accesorios y reguladores del genoma proviral del VIH, se realizó un primer PCR de punto final con los oligonucleótidos 4920 [10 pmol/μl] y 6979 [10 pmol/μl] para amplificar un fragmento de 2058 pb; con una mezcla de 2.5 μl de Buffer [10X], 0.5 μl de dNTP's [10 mM], 1 μl de MgSO₄ [50mM], 1.25 μl de Dimetilsulfóxido (DMSO) y 0.2 μl de la enzima Taq HI-FI [5U/μl], en un volumen total de reacción de 25 μl. Para este PCR se utilizó un termociclador modelo 9700 de *Applied Biosystem* con las siguientes condiciones: 94°C durante 2 minutos, seguidos de 35 ciclos con los siguientes 3 pasos: i) 94°C por 30 s, ii) 55°C durante 15 s y iii) 68°C durante 1 min, después de estos ciclos, una elongación final de 68°C durante 10 min. El producto de PCR se purificó con el estuche comercial *MiniElute Reaction Cleanup Kit (QIAGEN)*, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para el PCR anidado se utilizaron 3 μl del producto purificado del primer PCR, para amplificar un fragmento de 1544 pb con los oligonucleótidos 4926 [10 pmol/μl] y 6470 [10 pmol/μl], con la siguiente mezcla de reacción: 2.5 μl de Buffer [10X], 0.5 μl de dNTP's [10 mM], 1 μl de MgSO₄ [50 mM], 1.25 μl de DMSO y 0.2 μl de la enzima Taq HI-FI [5U/μl], en un volumen total de reacción de 25 μl. Las condiciones del PCR fueron las siguientes: 94°C durante 2 min, 35 ciclos con tres pasos: i) 94°C por 30 s, ii) 61°C por 15 s y iii) 68°C por 1

min con una temperatura final de elongación de 68°C durante 10 min. Una vez terminada la reacción de PCR, se realizó la técnica de electroforesis con geles de agarosa al 1%, teñidos con *SYBR Green*® (*Nucleic Acid Gel Stain, Thermo Fisher*). Las muestras que amplificaron fueron purificadas con el estuche comercial marca *MiniElute*.

Secuenciación

Del producto de amplificación del PCR anidado se utilizaron 40 ng para realizar la reacción de secuenciación por la técnica de Sanger (Sanger y Coulson, 1975). Se preparó una mezcla de reacción con 2 µl de Buffer [5X], 4 µl de *Big Dye (v3.1 de Applied Biosystem)*, 0.5 µl [10pmol/ µl] del oligonucleótido (sólo uno para cada reacción), 1 µl de agua ultra-pura; en un volumen total de 13.5 µl. Se colocó la placa en el termociclador con las siguientes condiciones: 96°C por 1 min, 25 ciclos con tres temperaturas 96°C por 10s, 56°C por 5s y 60°C por 4 min. Una vez terminada la etapa del termociclador, se procedió a purificar la reacción, añadiéndole 80 µl de isopropanol, grado biología molecular al 80%, se centrifugó (Microcentrífuga *Eppendorff* modelo 5804) a una velocidad de 2250 xg durante una hora. Se desechó el sobrenadante de la placa, invirtiéndola en papel absorbente para eliminar el exceso de líquido. Se agregaron 80 µl de etanol al 70% y se centrifugó a una velocidad de 2250 xg durante 20 min. Para asegurarse de no dejar restos de alcohol en las muestras, se secó completamente la placa, centrifugando de forma invertida en papel absorbente por aproximadamente 15 segundos. Se agregaron 14 µl de formamida de alta pureza y se centrifugó para retirar burbujas de aire que pudieron haberse formado. La placa de reacción se colocó en el detector automático *ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystem)* de 16 capilares. Los resultados de las secuencias analizadas se obtuvieron en forma de electroferogramas, a partir de los cuales se obtuvo la secuencia consenso.

Análisis de datos.

Para el análisis inicial de los electroferogramas y para obtener una secuencia consenso de cada uno de los genes, se utilizó el programa *SeqScape v2.1.1 (Applied Biosystem)*. A partir de la secuencia consenso (archivo FASTA), se realizaron los árboles filogenéticos de cada uno de los genes accesorios y reguladores del VIH. Se alinearon las secuencias con

el método MUSCLE (*Multiple Sequence Comparison by Long-Expectation*) (Edgar, 2004) y la reconstrucción de cada árbol filogenético se realizó en función del menor puntaje del análisis BIC (*Bayesian Information Criterion*) como lo recomienda el análisis *Best Fit Substitution*. Estos algoritmos informáticos se encuentran en el programa MEGA-X (S. Kumar, Stecher, Li, Knyaz, & Tamura, 2018). Para determinar la diversidad de cada gen analizado se utilizó el programa SlimPlot v.3.5.1 (Lole y col. , 1999). Se obtuvo el polimorfismo de los sitios funcionales de cada gen por medio del programa *Analyze Sequence Variation (SNP)* hospedado en la página *Virus Pathogen Database and Analysis Resource (ViPR)* (Pickett y col. , 2012) a través del sitio electrónico <http://www.viprbrc.org> y para el análisis estadístico se utilizó el programa Statgraphics Centurion XV v15.2.05. Las secuencias consenso de cada uno de los genes se tradujeron en la página electrónica <https://web.expasy.org/translate/>. Para localizar las regiones o dominios funcionales de cada una de proteínas se consultó en la base de datos <https://www.uniprot.org/> de cada uno de los genes del VIH (HXB2), para su análisis con el programa SimPlot v3.5.1 y de polimorfismo (SNP).

Se decidió utilizar la secuencia HXB2 (*GenBank: K03455.1*) como referencia en este estudio por las siguientes razones: i) fue la primera cepa viral en ser secuenciada totalmente en su genoma (Ratner y col. , 1985), ii) la traducción proteica, también es considerada como referencia (UniProtKB-UP000002241), iii) es una secuencia obtenida de pacientes que no tuvieron contacto con los fármacos antirretrovirales (Arts y Hazuda, 2012), iv) esta secuencia se utiliza en las principales base de datos existentes a nivel mundial, para su uso en diferentes tipos de análisis: resistencia al TARGA, recombinación, tropismo y filogenia (Beerenwinkel y col. , 2003; Davey y col. , 2014; Liu y Shafer, 2006; Myers G, 1987; Pineda-Pena y col. , 2013), v) los oligonucleótidos utilizados para la realización de este trabajo, se diseñaron tomando como referencia esta secuencia y vi) hasta el momento de la realización de este trabajo, no existía una secuencia completa y representativa del virus circulante en nuestro país.

Análisis Estadístico

Se utilizó el software *Statgraphic Centurion XV v.15.2.05*. En el análisis del conteo de CD4+, CV y CPV, en los diferentes grupos analizados se utilizó la prueba ANOVA para comparar la media y la prueba de Kruskal-Wallis para comparar las medianas. En los datos obtenidos de la variación de las secuencias, se utilizó la prueba W para probar normalidad de los datos para posteriormente realizar pruebas no-paramétricas: la prueba F para comparar desviaciones estándar, y la prueba de Wilcoxon para comparar medianas entre los grupos analizados. En todos los casos se tomó en cuenta una $p > 0.05$ como significancia estadística.

Resultados

Determinación cuantitativa de la carga viral en pacientes con y sin falla al TARGA.

Se analizaron muestras de sangre periférica de 69 pacientes, de los cuales 7 presentaron falla al TARGA, 38 sin falla al TARGA y 24 pacientes sin tratamiento (sin TARGA).

En la **tabla 2** se describen las características de los pacientes con falla al TARGA que presentaron una carga viral (CV) detectable, a diferencia del grupo que tuvo éxito al TARGA, donde la CV fue indetectable (**Tabla 3**).

Tabla 2. Resumen de datos clínicos de los pacientes con TARGA y que presentan falla

	Pacientes con falla al tratamiento		
	Masculino	Femenino	Total
N	5	2	7
Edad (años)	39.2 (29-60)	29.5	34.6 (29-60)
CV (copias/ml)	34764	91591	24525 (40-79192)
CD4 + (células/ml)	368	129	333 (119-666)
CPV (copias/76,000genomas)	80.2 (21-135)	244	127 (21-368)

Tabla 3. Resumen de datos clínicos de los pacientes con TARGA y que no presentan falla

N	38 (Masculino)
Edad (años)	40 (30-53)
CV (copias/ml)	Indetectables
CD4+ (células/ml)	613 (366-914)
CPV (copias/76,000genomas)	66.7 (1-475)

Se reclutó a un grupo de pacientes que hasta la fecha de su inclusión, no habían recibido TARGA y sus características se describen en la **Tabla 4**. Como se puede observar, la carga viral promedio fue de 78,952 copias/ml, mientras que el grupo que tuvo falla al TARGA, tuvo una carga viral promedio de 24,525 copias/ml (**Tabla 2**).

Tabla 4. Resumen de datos clínicos de los pacientes que no tienen TARGA.

ND=No Determinada.

	Pacientes sin tratamiento		
	Masculino	Femenino	Total
N	19	5	24
Edad (años)	ND	ND	ND
CV (copias/ml)	96900 (1970-75000)	10752 (6960-12600)	78952(1970-75000)
CD4+ (células/ml)	342 (38-928)	324 (124-441)	338 (38-928)
CPV (copias/76000genomas)	919 (92-1786)	5309	1650.92
	N = 10	N = 2	N = 12

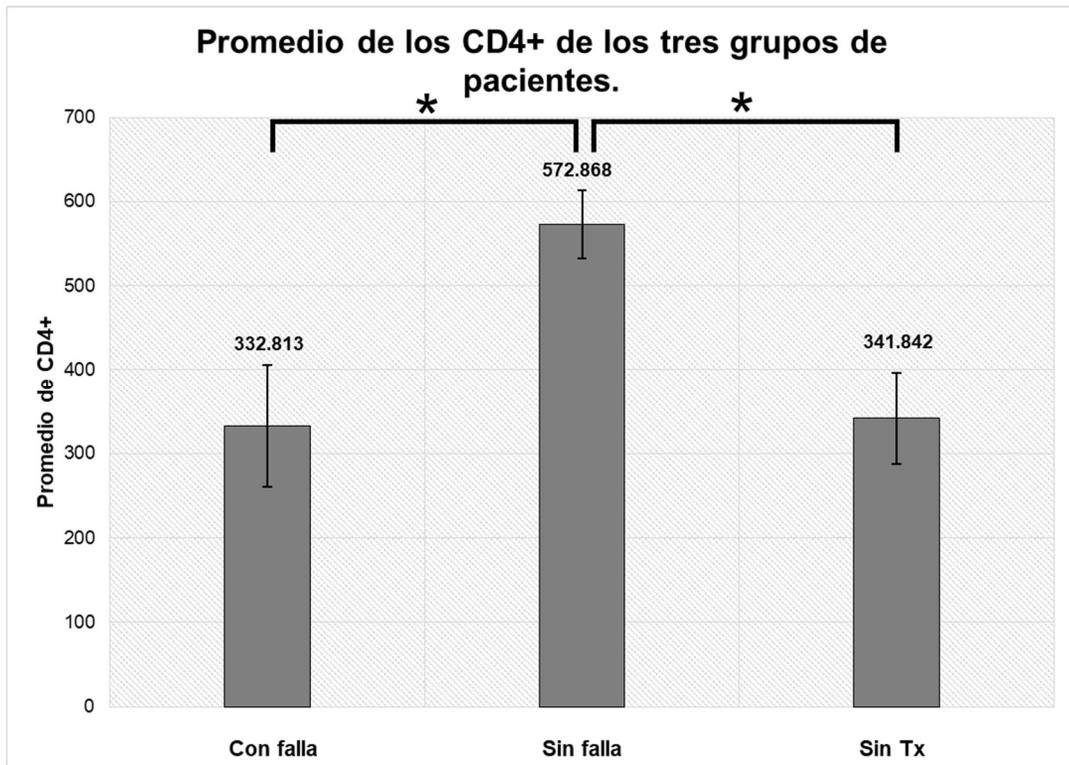
Tomando en cuenta estos resultados, se realizó el análisis estadístico comparativo entre los 3 grupos de estudio (**Tabla 5**), en donde el grupo que no tuvo falla al TARGA presentó un mayor número de células CD4+, en comparación con el grupo con falla al TARGA que presentó el menor número de células CD4+. Un valor intermedio entre estos grupos, se encontró en el grupo que no tenía TARGA (**Gráfica 1**).

De igual forma, se observó que la carga proviral (proporción de células mononucleares de sangre periférica que tienen inserto ADN del VIH-1), era significativamente mayor en el grupo sin tratamiento, en comparación con los que cuentan con TARGA (**Gráfica 2**).

La carga viral de los pacientes con TARGA y sin falla, como se esperaba, fue indetectable, a diferencia del grupo que presentó falla, su CV fue detectable con un promedio de 20371 copias/ml. El grupo sin tratamiento presentó una elevación de CV 4.7 veces mayor con respecto al grupo que presentó falla al TARGA (**Gráfica 3**). De este análisis estadístico, se puede determinar que se encuentran dentro de los rangos esperados, ya que los pacientes sin tratamiento son los que se observan las más altas determinaciones de CV y CPV (**Gráfica 2 y 3**), debido a que no tienen la presión selectiva de los antirretrovirales que impidan la propagación del virus y por consecuencia, una disminución en el conteo de las células CD4+.

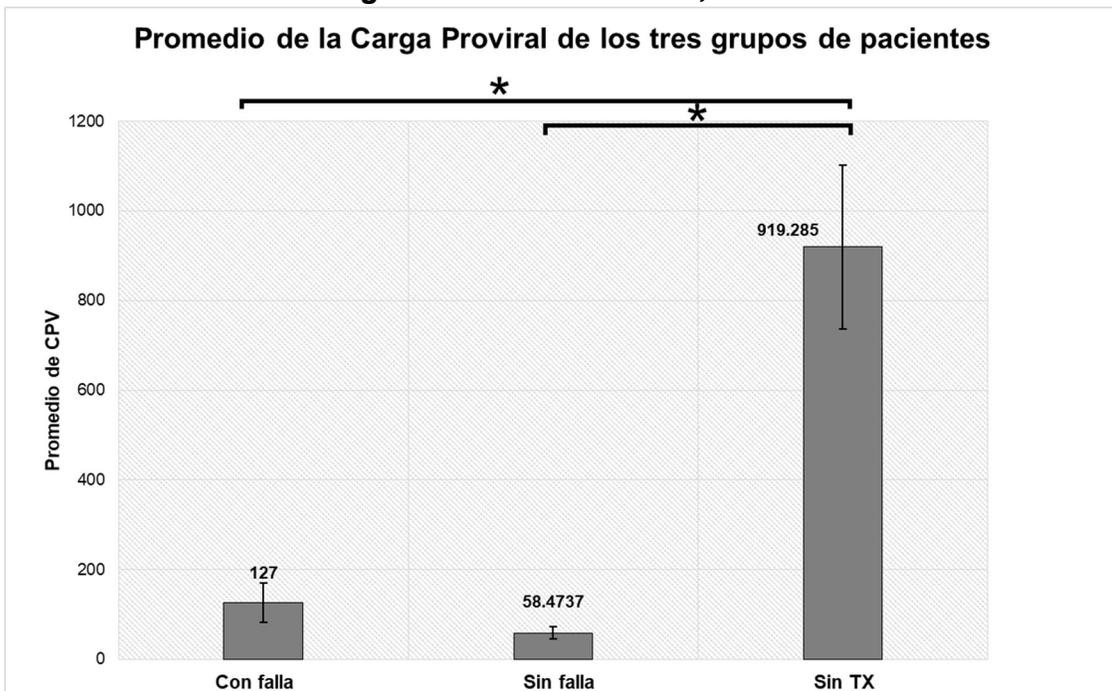
Tabla 4. Análisis estadístico de la carga viral (CV), carga proviral (CPV) y conteo de células CD4+ de los pacientes con falla al tratamiento (TX) , de los pacientes sin falla al TX y de los pacientes sin tratamiento (sin TX).

	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Mínimo	Máximo	Rango	ANOVA	Varianza	Kruskal-Wallis
CD4 + con falla	7	332.813	192.12	119.33	666.35	547.02	P= 0.0016 Existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 3 variables	P= 0.810596 No existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estandar de las 3 variables	P= 0.000831276 Existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas de las 3 variables
CD4+ sin falla	38	572.868	251.34	171	1380	1209			
CD4+ sin Tx	19	341.842	239.329	38	928	890			
Total	64	478.026	265.223	38	1380	1342			
CV con falla	7	20371	33255.6	0	79192	79192	P= 0.002 Existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 3 variables	P= 0.00120673 Existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estandar de las 3 variables	P= 1.21858E-12 Existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas de las 3 variables
CV sin falla	38	0	0	0	0	0			
CV sin Tx	19	96899.6	142800	1970	597000	595030			
Total	64	30995.2	88506.9	0	597000	597000			
CPV con falla	7	127	115.18	21	368	347	P= 0.000 Existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 3 variables	P= 0.12613E-9 Existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estandar de las 3 variables	P= 0.00000453654 Existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas de las 3 variables
CPV sin falla	38	58.4737	83.1709	1	475	474			
CPV sin Tx	10	919.285	577.28	92.405	1786.08	1693.68			
Total	55	223.706	414.462	1	1786.08	1785.08			



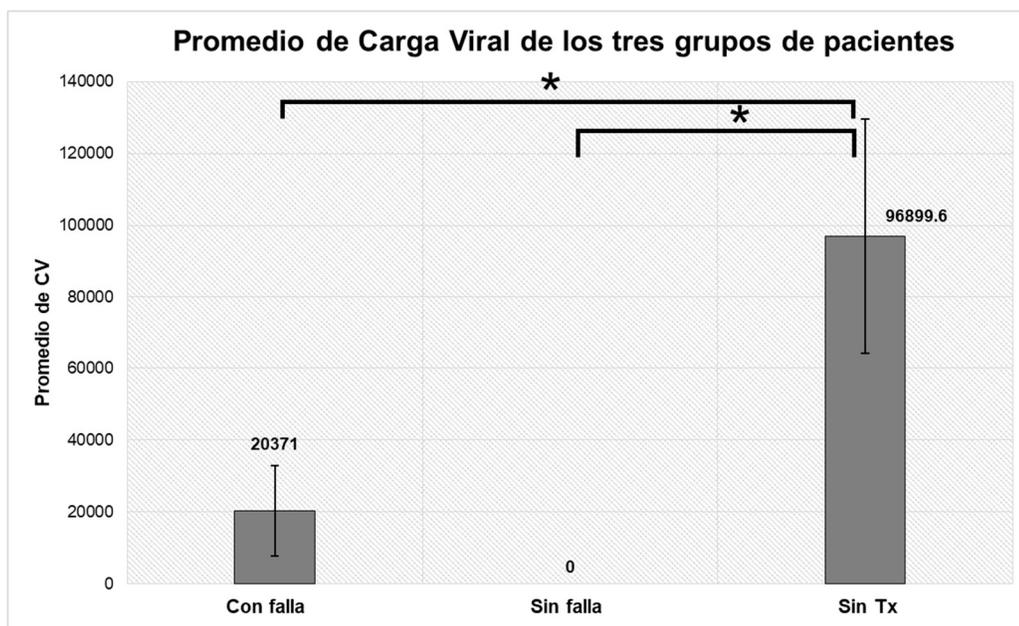
Gráfica 1 Promedio del conteo de las células CD4+ de los tres grupos estudiados.

***Significancia estadística, $\alpha=0.05$**



Gráfica 2. Promedio de la carga proviral (CPV) de los tres grupos estudiados.

*** Significancia estadística, $\alpha=0.05$**



Gráfica 3. Promedio de la cuantificación de la carga viral de los tres grupos estudiados.

*** Significancia estadística, $\alpha=0.05$**

Amplificación y secuenciación de los genes accesorios y reguladores.

Para cumplir con el segundo objetivo de este trabajo, se procedió a aislar y cuantificar el ADN genómico total de las CMSP de los tres grupos de pacientes, para amplificar y secuenciar las regiones genómicas de los genes accesorios (*vpr*, *vpu*, *vif* y *nef*) y reguladores (*tat* y *rev*) del VIH que están integradas al genoma de la célula hospedera. (Figuras 6-9). Del grupo de pacientes sin tratamiento, se lograron secuenciar los seis genes virales en veinte pacientes, en dos pacientes se secuenciaron *vpr*, *vpu*, *vif* y *nef* y en otros dos pacientes los genes *tat*, *rev*, *vpr*, *vpu* y *vif*. Por lo que se obtuvieron 184 secuencias, que fueron analizadas y verificadas de acuerdo con el formato de la base de datos de los Institutos Nacionales de Salud de los E.E.U.U. *GenBank* (D. A. Benson y col., 2013), para que puedan ser consultadas y utilizadas en diversos estudios a nivel mundial (Tabla 6).

Cabe mencionar que no se logró la amplificación de ninguno de los genes de interés a partir de muestras provenientes de los grupos de pacientes con tratamiento con falla y sin falla, a pesar de múltiples intentos (aproximadamente 60 diferentes experimentos) de amplificación. Se realizaron cambios en los oligonucleótidos utilizados, curvas de concentración de magnesio (Mg^{2+}), curvas de temperaturas de alineamiento para las diferentes TM 's (*Temperature Melting*) o hibridación de los oligonucleótidos, se usaron dos diferentes enzimas para la amplificación: Taq HI-FI (Cat. 11304-011, Invitrogen) y la Taq Gold (Cat. N8080241, Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del fabricante y con las condiciones antes mencionadas. También se realizaron diferentes curvas de concentración de ADN genómico total y se usaron diferentes pares de oligonucleótidos para diferentes tamaños de amplicones. Debido a que el objetivo era la determinación de la diversidad del provirus, no se utilizó el RNA viral de los pacientes con falla a tratamiento, para su amplificación, secuenciación y posterior comparación, ya que el análisis de variabilidad viral, es diferente en los virus circulantes y en los provirus (Becquart y col. , 2007; Pinzone y col. , 2018; Redmond P Smyth y col. , 2012)

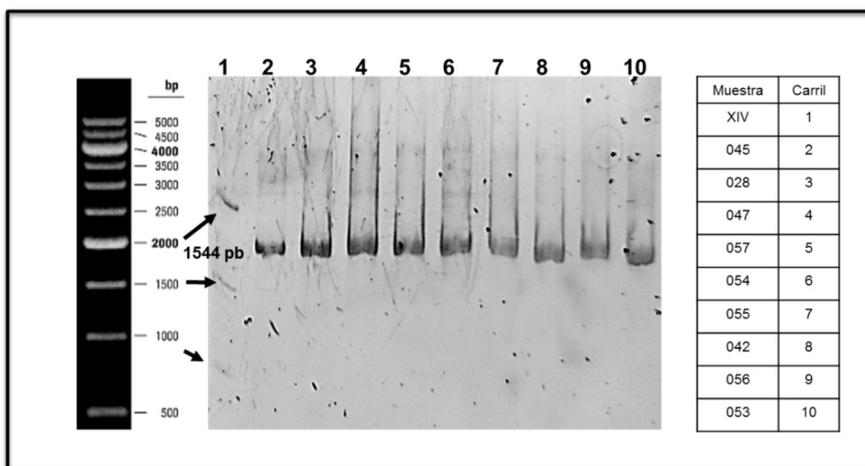


Figura 6. Amplificación de los genes *tat* y *rev* a partir de las CMSP de 9 pacientes sin TARGA (gel de agarosa al 2% teñido con SYBR Green).

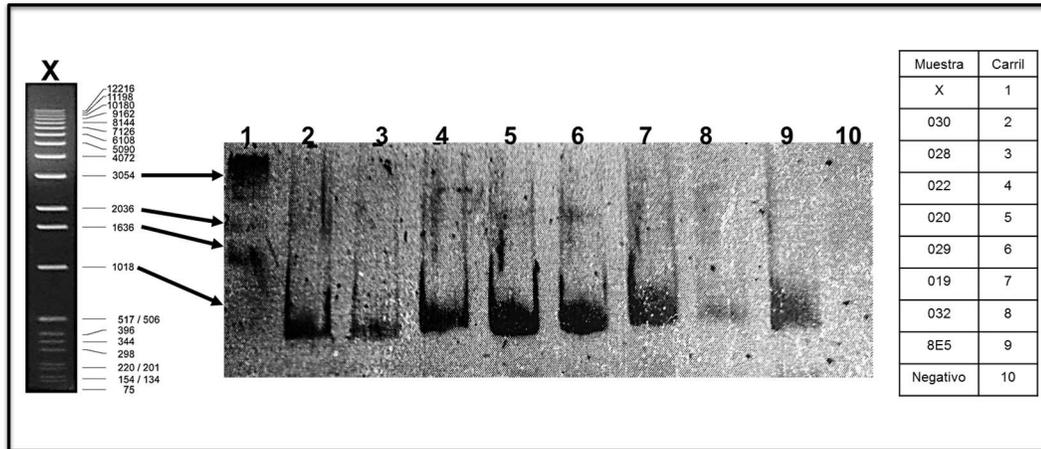


Figura 7. Amplificación del gen *nef* de 985 pb a partir de CMSP de 9 pacientes sin TARGA (gel de agarosa al 2% teñido con SYBR Green).

Secuenciación



Figura 8. Alineamiento de las secuencias de los genes amplificados con el programa SeqScape v2.5 para obtener la secuencia consenso (FASTA).

Debido a que no se tuvo éxito en la amplificación y secuenciación de los genes de interés del provirus, en pacientes con tratamiento con y sin falla, se decidió utilizar las secuencias reportadas en la base de datos GenBank de los Institutos Nacionales de Salud de los E.E.U.U. (NIH, 2019), provenientes de pacientes con tratamiento (Tabla 7).

Con respecto a los tres grupos de pacientes estudiados, los pacientes con tratamiento que no están en falla tuvieron menor CV y CPV, y la mayor cuantificación de CD4+. Los resultados de los pacientes que tienen tratamiento y están en falla farmacológica, concuerdan con los reportados en la literatura (F. Hong y col. , 2018; Vitone y col. , 2005).

Identificadores (ID) de las secuencias de la base de datos de GenBank de pacientes con y sin tratamiento.

Tabla 5. ID de la base de datos GenBank de las secuencias de los genes accesorios y reguladores del provirus del VIH-1 proveniente de pacientes mexicanos sin tratamiento.

Tat n=29	Vpr n=32	Vpu n=32	Vif n=32	Rev n=29	Nef n=30
MG729208	MG729237	MG729269	MG729301	MG729333	MG729362
MG729209	MG729238	MG729270	MG729302	MG729334	MG729363
MG729210	MG729239	MG729271	MG729303	MG729335	MG729364
MG729211	MG729240	MG729272	MG729304	MG729336	MG729365
MG729212	MG729241	MG729273	MG729305	MG729337	MG729366
MG729213	MG729242	MG729274	MG729306	MG729338	MG729367
MG729214	MG729243	MG729275	MG729307	MG729339	MG729368
MG729215	MG729244	MG729276	MG729308	MG729340	MG729369
MG729216	MG729245	MG729277	MG729309	MG729341	MG729370
MG729217	MG729246	MG729278	MG729310	MG729342	MG729371
MG729218	MG729247	MG729279	MG729311	MG729343	MG729372
MG729219	MG729248	MG729280	MG729312	MG729344	MG729373
MG729220	MG729249	MG729281	MG729313	MG729345	MG729374
MG729221	MG729250	MG729282	MG729314	MG729346	MG729375
MG729222	MG729251	MG729283	MG729315	MG729347	MG729376
MG729223	MG729252	MG729284	MG729316	MG729348	MG729377
MG729224	MG729253	MG729285	MG729317	MG729349	MG729378
MG729225	MG729254	MG729286	MG729318	MG729350	MG729379
MG729226	MG729255	MG729287	MG729319	MG729351	MG729380
MG729227	MG729256	MG729288	MG729320	MG729352	MG729381
MG729228	MG729257	MG729289	MG729321	MG729353	MG729382
MG729229	MG729258	MG729290	MG729322	MG729354	MG729383
MG729230	MG729259	MG729291	MG729323	MG729355	MG729384
MG729231	MG729260	MG729292	MG729324	MG729356	MG729385
MG729232	MG729261	MG729293	MG729325	MG729357	MG729386
MG729233	MG729262	MG729294	MG729326	MG729358	MG729387
MG729234	MG729263	MG729295	MG729327	MG729359	MG729388
MG729235	MG729264	MG729296	MG729328	MG729360	MG729389
MG729236	MG729265	MG729297	MG729329	MG729361	MG729390
	MG729266	MG729298	MG729330		MG729391
	MG729267	MG729299	MG729331		
	MG729268	MG729300	MG729332		

Tabla 6. ID de las secuencias de los genes accesorios y reguladores del VIH obtenidos de la base de datos del GenBank. Todas las secuencias corresponden a pacientes que reciben tratamiento, con excepción de *vif* que reporta pacientes con y sin tratamiento.

<i>Vpu</i> (n=16)	<i>Vpr</i> (n=13)	<i>Tat</i> (n=19)	<i>Rev</i> (n=12)	<i>Nef</i> (n=12)
AJ437519.1	AJ437491.1	AY620835.1	AJ496725.1	AJ430464.1
AJ437518.1	AJ437492.1	AY620839.1	AJ496724.1	AJ430667.1
AJ437523.1	AJ437505.1	AY620829.1	AJ496726.1	AY905388.1
AJ437525.1	KF270440.1	AJ496659.1	MG571993.1	AJ430661.1
AJ437524.1	KF270442.1	AJ496660.1	MG571980.1	AJ430652.1
MG571990.1	KX591312.1	AJ496654.1	MG571998.1	AJ430658.1
AJ437539.1	AJ437493.1	AJ496651.1	MG572008.1	AJ430646.1
AJ437516.1	AJ437495.1	AJ496647.1	KX591256.1	AY905401.1
AJ437515.1	AJ437498.1	AY620842.1	KX591257.1	AJ430655.1
MG571998.1	AJ437502.1	AY620865.1	KX591280.1	MG571993.1
AJ437527.1	AJ437504.1	AY620862.1	KF270442.1	MG572004.1
AJ437526.1	AJ437499.1	AY620841.1	KF270439.1	AJ430643.1
AJ437530.1	AJ437501.1	AY620867.1		
AJ437531.1		AY620866.1		
AJ437522.1		AJ496663.1		
MG572008.1		AJ496662.1		
		AJ496655.1		
		AJ496657.1		
		MG572008.1		
<i>Vif</i> (n=95)				
KF270459.1	KP874171.1	KP874169.1	KP874148.1	KP874123.1
KF270458.1	KP874172.1	KP874170.1	KP874149.1	KP874124.1
KF270452.1	KP874173.1	KP874151.1	KP874150.1	KP874125.1
KF270557.1	KP874174.1	KP874152.1	KP874131.1	KP874126.1
KF270453.1	KP874175.1	KP874153.1	KP874132.1	KP874127.1
KF270451.1	KP874176.1	KP874154.1	KP874133.1	KP874128.1
KF270427.1	KP874177.1	KP874155.1	KP874134.1	KP874129.1
KF270426.1	KP874178.1	KP874156.1	KP874135.1	KP874130.1
AJ437657.1	KP874179.1	KP874157.1	KP874136.1	KP874105.1
AJ437555.1	KP874180.1	KP874158.1	KP874137.1	KP874106.1
AJ437556.1	KP874181.1	KP874159.1	KP874138.1	KP874107.1
AJ437554.1	KP874161.1	KP874160.1	KP874139.1	KP874108.1
AJ437547.1	KP874163.1	KP874141.1	KP874140.1	KP874109.1
AJ437550.1	KP874162.1	KP874142.1	KP874117.1	KP874110.1
AJ437549.1	KP874164.1	KP874143.1	KP874118.1	KP874111.1
AJ437552.1	KP874165.1	KP874144.1	KP874119.1	KP874112.1
AJ437543.1	KP874166.1	KP874145.1	KP874120.1	KP874113.1
AJ437542.1	KP874167.1	KP874146.1	KP874121.1	KP874114.1
AJ437544.1	KP874168.1	KP874147.1	KP874122.1	KP874115.1
				KP874116.1

Vpu

Análisis filogenético de *Vpu*

Para observar la relación entre las secuencias obtenidas (n=41) del gen *vpu* (248pb), se construyó un árbol filogenético, en donde 24 secuencias corresponden a pacientes sin tratamiento y 16 con tratamiento obtenidas del *GenBank* (n=16, **Fig. 10 y 11**). Se puede observar en el árbol de la **figura 10** una distribución gráfica distribuida a lo largo de todo el árbol, en donde la mayoría de las secuencias de los pacientes sin TX se agrupan, compartiendo un mismo nodo de origen (en su última bifurcación), al igual que las muestras obtenidas del GenBank. Se indica el valor de repetición (*Bootstrap*) Esta relación se observa de igual manera en el árbol rectangular de la **figura 11**, con distancias mínimas (Kimura 2-parámetros) y en algunas ramas el valor es cero, que indica una mínima divergencia o una cantidad mínima de cambios acumulados.



Figura 11. Construcción rectangular del árbol filogenético del gen *vpu* del VIH. Los cuadros rojos indican los pacientes mexicanos sin tratamiento. Se muestran las distancias el número de sustituciones por sitio en cada rama. El árbol fue realizado por el método de Maximum Likelihood y el modelo de Hasegawa-Kishino-Yano (Masami Hasegawa y col. , 1985) en el programa MEGAX.

Análisis genómico de *Vpu*

El siguiente paso fue analizar la similitud de las secuencias del gen *vpu* de los pacientes con y sin tratamiento con respecto a la secuencia de referencia HXB2. Para este fin, se utilizó el programa *SimPlot v3.5.1*. En la **figura 12** se observan las secuencias consenso de ambos grupos de pacientes, donde la linealidad se acerca o aleja del grado máximo de similitud con valor de 1. En esta gráfica se indican las regiones o dominios de la proteína que son importantes para su función (M. E. González, 2015). De igual manera, se graficaron las secuencias de forma individual de los pacientes sin tratamiento y con tratamiento (**Figura 13**).

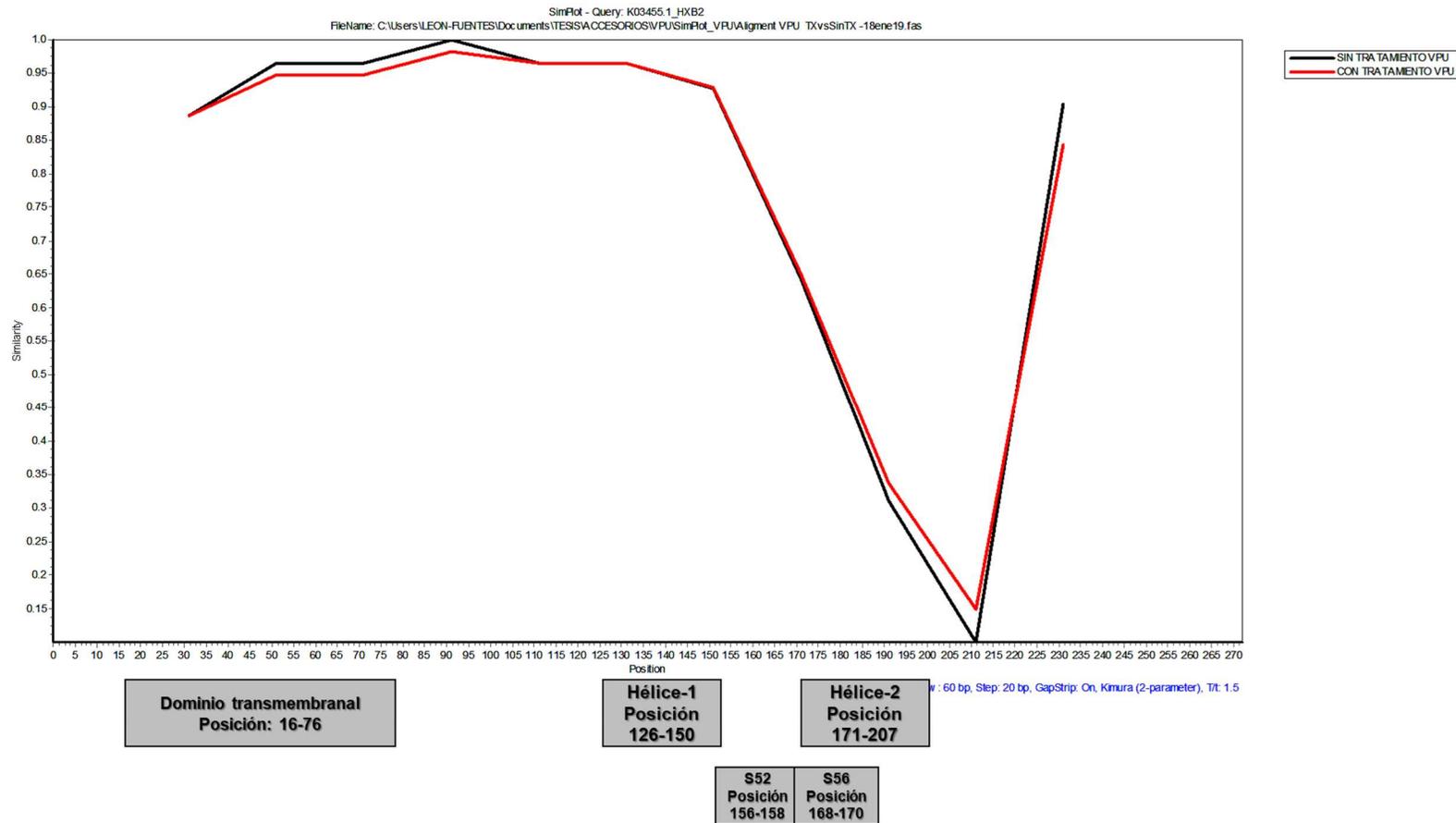


Figura 12. Análisis comparativo de las secuencias consenso del gen *vpu* de los pacientes sin y con tratamiento (GenBank). En el eje de las abscisas se grafica la región del gen, en pares de bases y en el eje de las ordenadas el grado de similitud (de 0 a 1) calculados con la técnica de Kimura (2-parámetros), tomando como secuencia de referencia a HXB2 (K.03455.1).

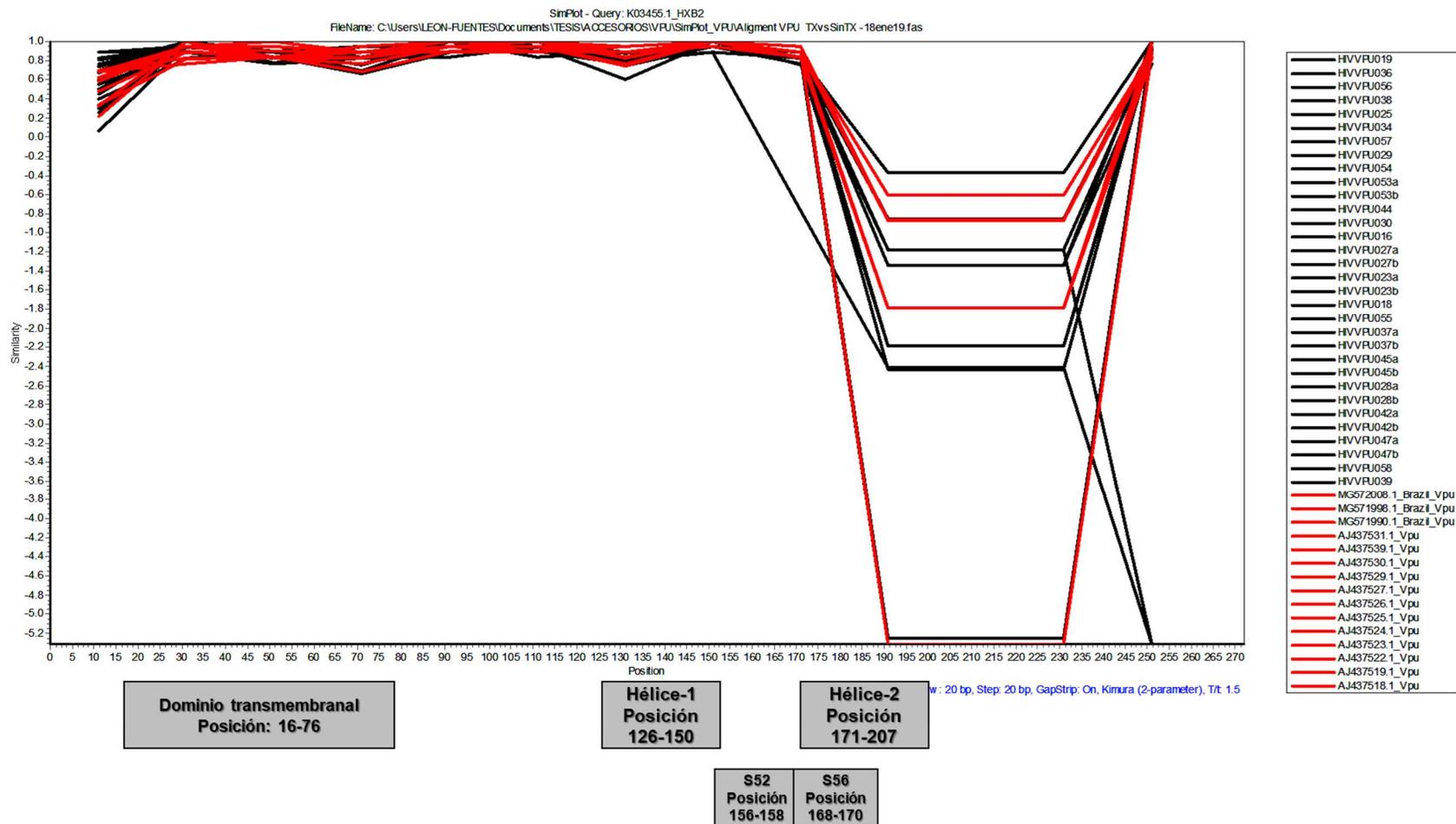
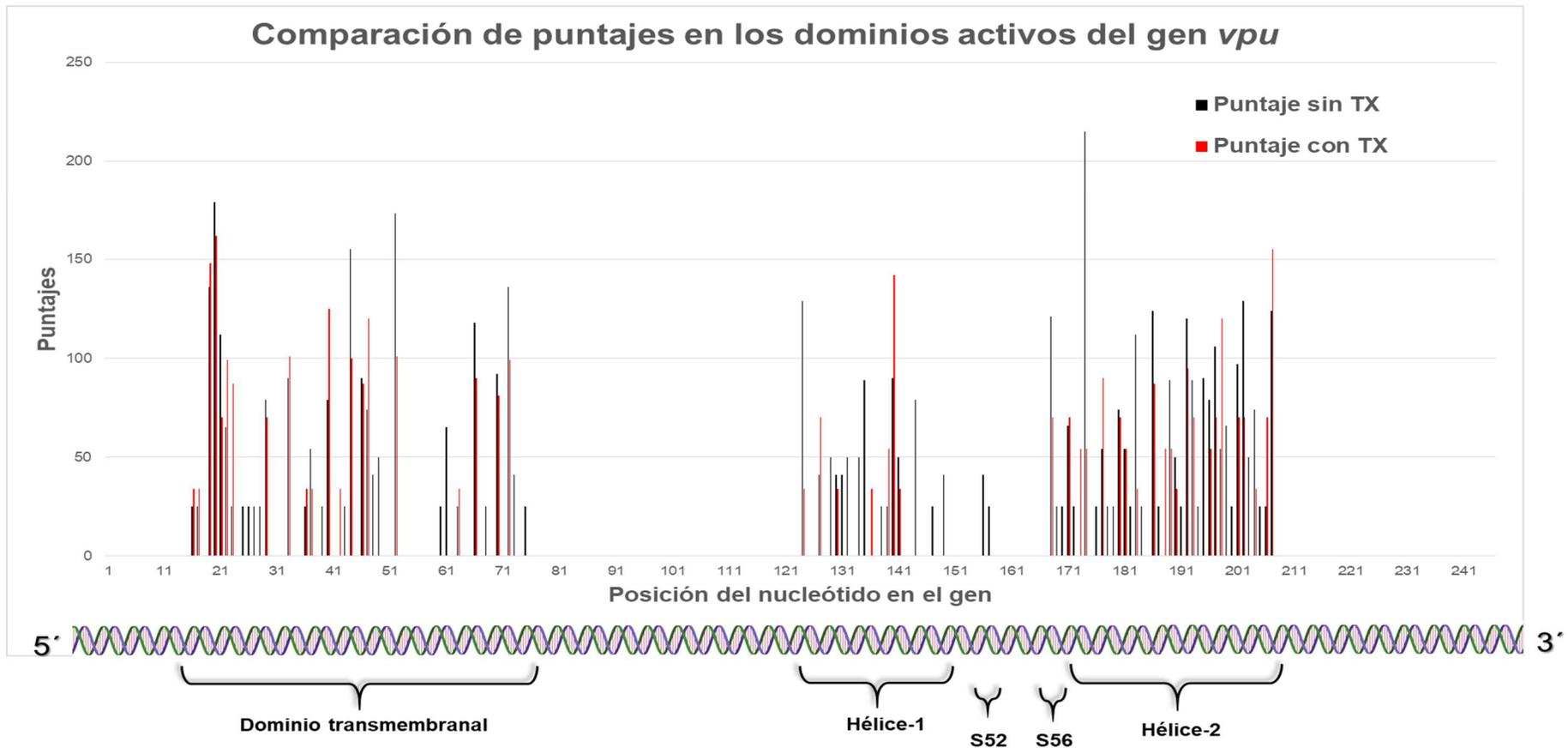


Figura 13. Análisis comparativo de las secuencias individuales del gen *vpu* de los pacientes sin tratamiento en líneas negras y con tratamiento en líneas rojas. En el eje de las abscisas se grafica la región del gen, en pares de bases y en el eje de las ordenadas el grado de similitud (de 0 a 1) calculados con la técnica de Kimura (2-parámetros), tomando como secuencia de referencia a HXB2 (K.03455.1)

Análisis del polimorfismo de los dominios funcionales de *vpu*

Para darle mayor profundidad al análisis, se examinaron las secuencias del gen *vpu* con el programa *Analyze Sequence Variation (SNP)* hospedado en la página electrónica: *Virus Pathogen Database and Analysis Resource (ViPR)* (Pickett et al., 2012). Se obtuvo información del cambio en cada uno de los nucleótidos a lo largo del gen. El puntaje o score indica la carencia (0) o un máximo (232) de polimorfismo según la ecuación establecida en el algoritmo (ver glosario) (**Gráfica 4**).



Gráfica 4. Se grafican los puntajes obtenidos en cada posición del gen *vpu* de las secuencias de pacientes con y sin tratamiento y analizadas con el programa Analyze Sequence Variation (SNP) hospedado en la página electrónica Virus Pathogen Database and Analysis Resource (ViPR) (Pickett et al., 2012) en la dirección <http://www.viprbrc.org>. Se grafican únicamente los dominios funcionales del gen.

Análisis estadístico del polimorfismo de los dominios funcionales de *vpu*

Los datos de polimorfismo se analizaron de forma estadística para evaluar si existía una diferencia significativa entre los grupos de pacientes con y sin tratamiento en los dominios funcionales del gen. En esta **tabla 8** se muestran el resumen del análisis que incluyó una prueba de normalidad (estadístico W o de Shapiro-Wilk).

Para todas las comparaciones de los valores de polimorfismo de los pacientes con y sin tratamiento, se realizó un análisis no paramétrico, ya que la prueba W determinó la no-normalidad y en aquellos casos donde un grupo de datos es normal y el otro no, se decidió a utilizar el sesgo (g_1) y la curtosis (β_2), cuyo valores en distribuciones normales son -2 y +2 (George y Mallery, 2010). En este caso se realizó una prueba F para determinar si son o no diferentes las dispersiones de los datos o desviación estándar (S) y un prueba W de Mann Whitney para determinar si las medias de las muestras son o no diferentes. Como se observa en este análisis, con excepción del sitio Hélice-1, no existe una diferencia estadísticamente significativa en los dominios funcionales del gen *vpu* de las secuencias de los pacientes con y sin tratamiento.

Todos los parámetros y consideraciones anteriormente descritos para este gen, se utilizaron de igual forma para los siguientes cinco genes.

Tabla 8. Resumen estadístico del polimorfismo de los dominios funcionales del gen vpu de secuencias de pacientes sin tratamiento y con tratamiento (GenBank). Análisis realizado con Statgraphics v.15.2.05

Puntaje de los dominios funcionales de la secuencia del gen vpu del VIH-1										
	Dominio transmembranal		Sitio Hélice-1		Fosforilación de S52		Fosforilación de S56		Sitio Hélice-2	
	Con Tx	Sin Tx	Con Tx	Sin Tx	Con Tx	Sin Tx	Con Tx	Sin Tx	Con Tx	Sin Tx
Recuento	61	61	27	27	3	3	3	3	37	37
Promedio	28.5902	35.7213	14.8889	30.5926	0	22	23.3333	57	39.5405	59.8919
Desviación Estándar	45.6163	48.3422	31.9968	35.2095	0	20.664	40.4145	55.4256	41.0065	47.017
Mínimo	0	0	0	0	0	0	0	25	0	0
Máximo	162	179	142	129	0	41	70	121	155	215
Sesgo Estandarizado	4.36493	4.72977	6.03315	2.35174	ND	-0.452224	1.22474	1.22474	1.78972	2.67626
Curtosis Estandarizada	0.964545	2.19989	9.85857	0.913088	ND	ND	ND	ND	0.0656393	2.06403
Distribución (Estadístico W)	No-Normal	No-Normal	No-Normal	No-Normal	No-Normal	Normal	No-Normal	No-Normal	No-Normal	No-Normal
Prueba-F para comparar Desviaciones Estándar	P = 0.654452 No existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar		P = 0.629202 No existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar		P = 0.0 Existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar		P = 0.694248 No existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar		P = 0.415795 No existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar	
Prueba W de Mann-Whitney (Wilcoxon) para comparar medianas	P = 0.16214 No existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas		P = 0.0308115 Existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas		P = 0.196705 No existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas		P = 0.368687 No existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas		P = 0.056558 No existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas	
	ND = No Determinado									

Vpr

Análisis filogenético de *vpr*

El análisis filogenético del gen *vpr* correspondiente a los pacientes con tratamiento presentó una distribución homogénea (**Fig. 14**) y en el árbol de la **Fig. 15**, las distancias genéticas o número de sustituciones por sitio (Kimura 2-parámetros) es mínima con respecto al nodo de origen.

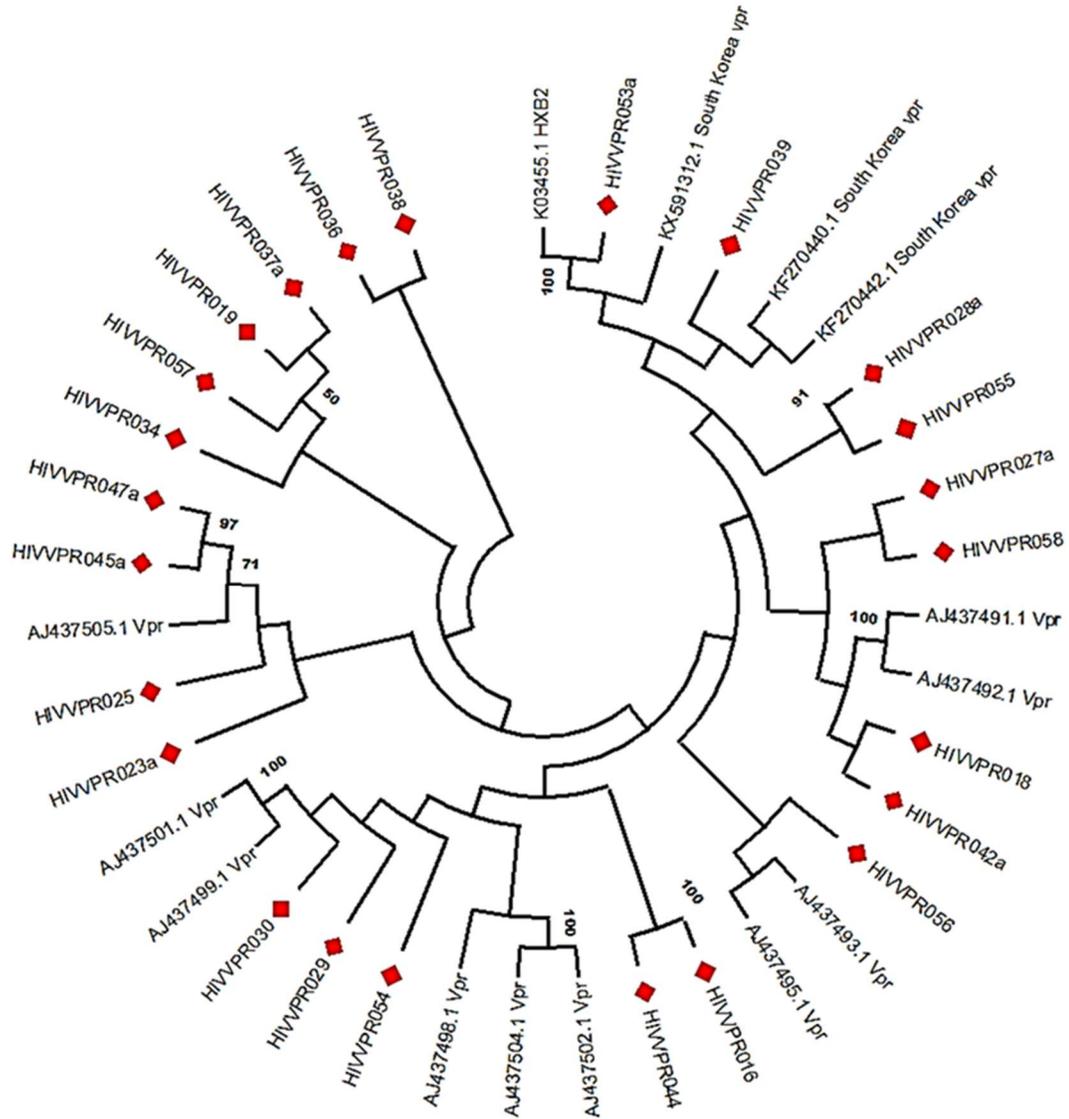


Figura 14. Construcción circular del árbol consenso del gene *vpr* del VIH. Los puntos rojos, indican los pacientes mexicanos sin tratamiento. El árbol fue realizado por el método de Maximum Likelihood y el modelo de Kimura 2-parámetros (Kimura, 1980), con un Bootstrap de 100 réplicas en el programa MEGAX.

Análisis genómico de *Vpr*

El análisis genómico a lo largo del gen *vpr* de los pacientes con y sin tratamiento, mostró que hay una similitud mayor al 0.6, hasta la posición 200 pb, donde comienza un divergencia evidente hasta la posición 290 pb del gen (Kimura 2-parámetros). En ambos grupos de la gráfica de las secuencias consenso, en la región de homo-oligomerización, se observa una aparente diferencia con respecto a la secuencia consenso. Al realizar la comparación con la gráfica de las secuencias individuales, no se observa una diferencia, ya que ambas figuras tienen el mismo rango de similitud de aproximadamente de 1 a 0.84. En este análisis se incluye a la región que codifica para el aminoácido glutamina (Q65) en la posición 195 del gen y que está involucrado en el arresto celular en la fase G2 por parte de *vpr* del VIH (Le Rouzic y col. , 2007). Esta región mostró una similitud con la secuencia consenso de 1.0 (**Fig.16 y 17**).

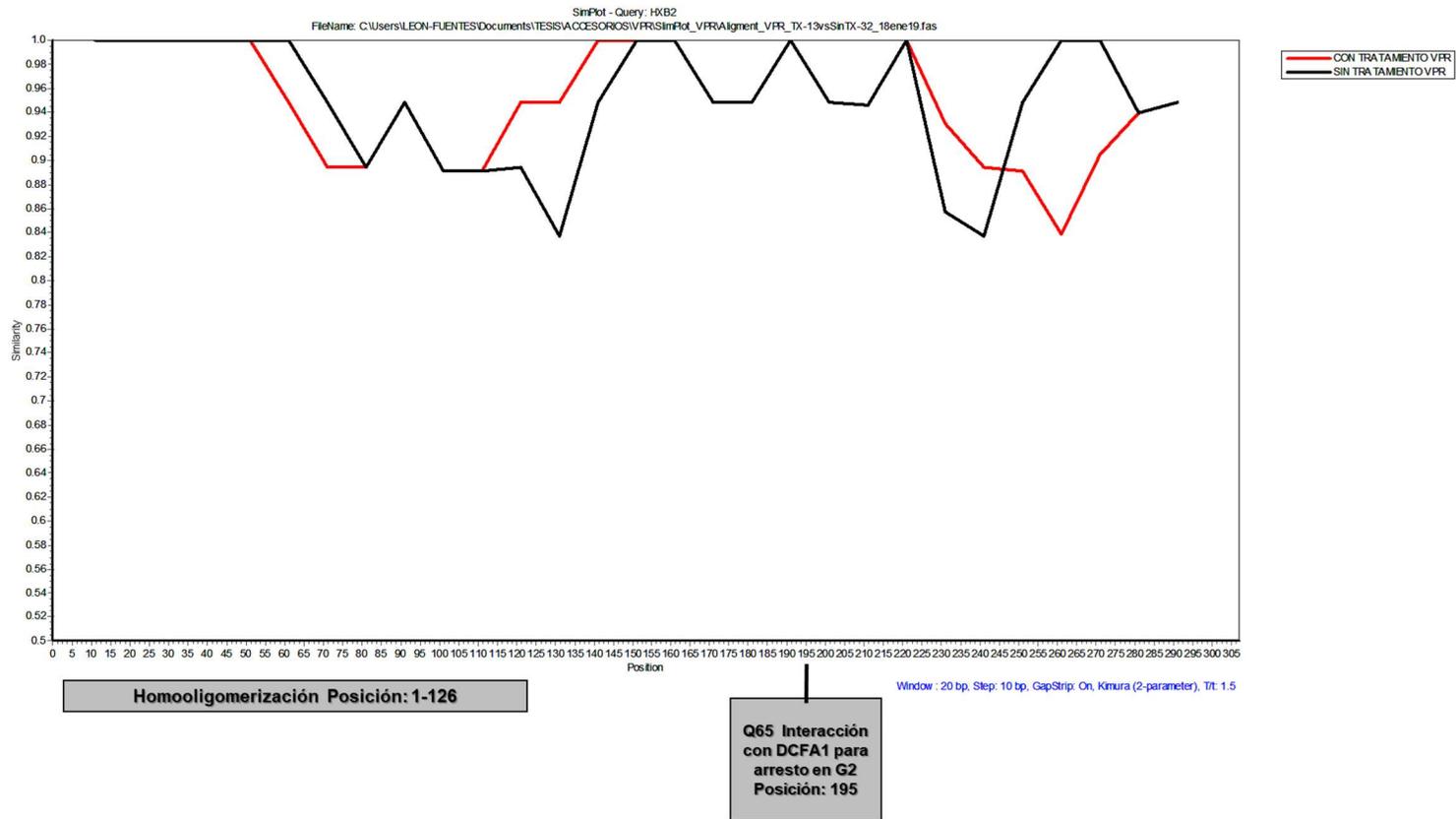


Figura 26. Análisis comparativo de las secuencias consenso del gen *vpr* de los pacientes con tratamiento (GenBank) y sin tratamiento. En el eje de las abscisas se grafica la región del gen, en pares de bases y en el eje de las ordenadas el grado de similitud (de 0 a 1), calculados con la técnica de Kimura (2-parámetros), tomando como secuencia de referencia a HXB2 (K.03455.1).

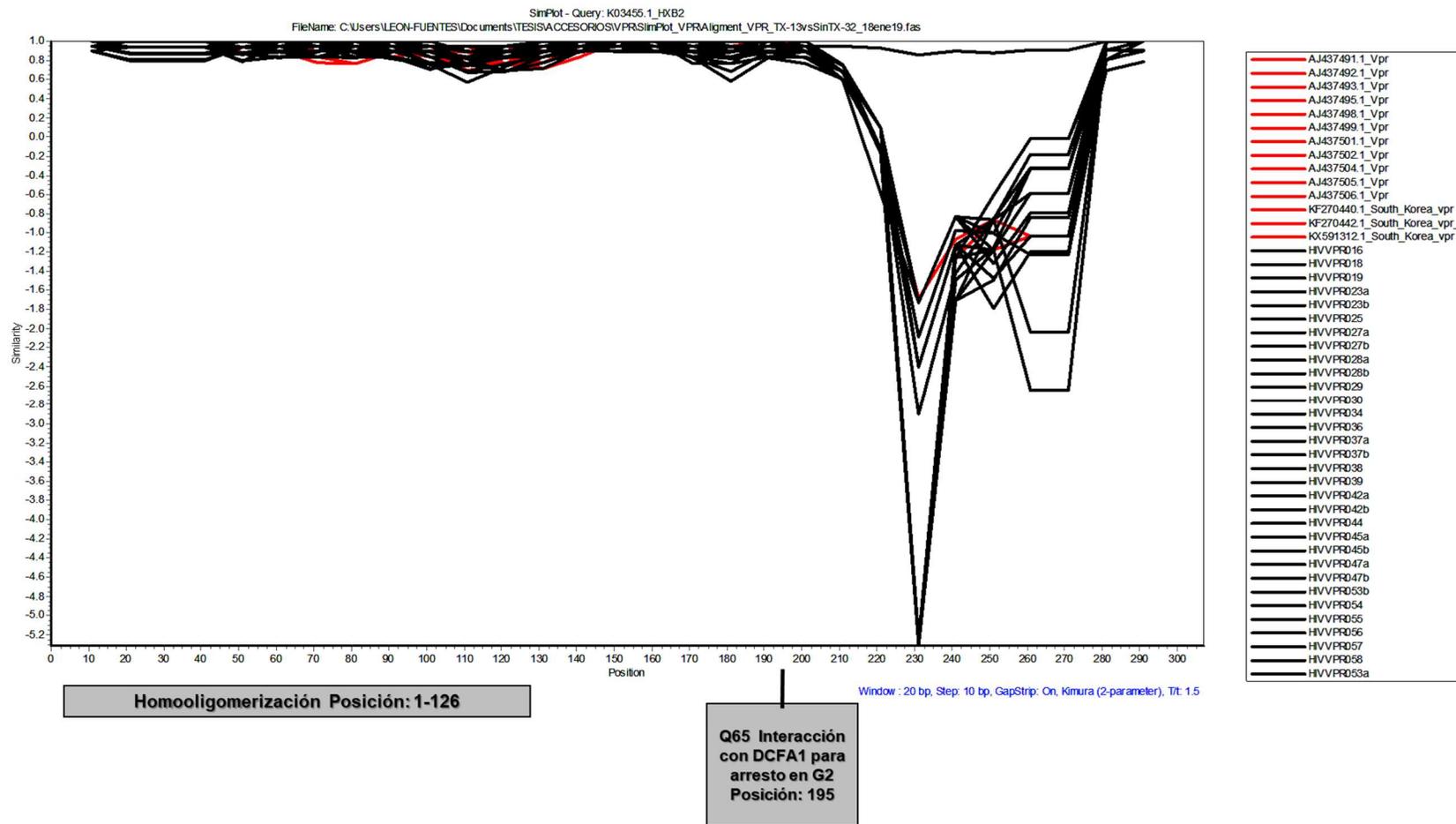
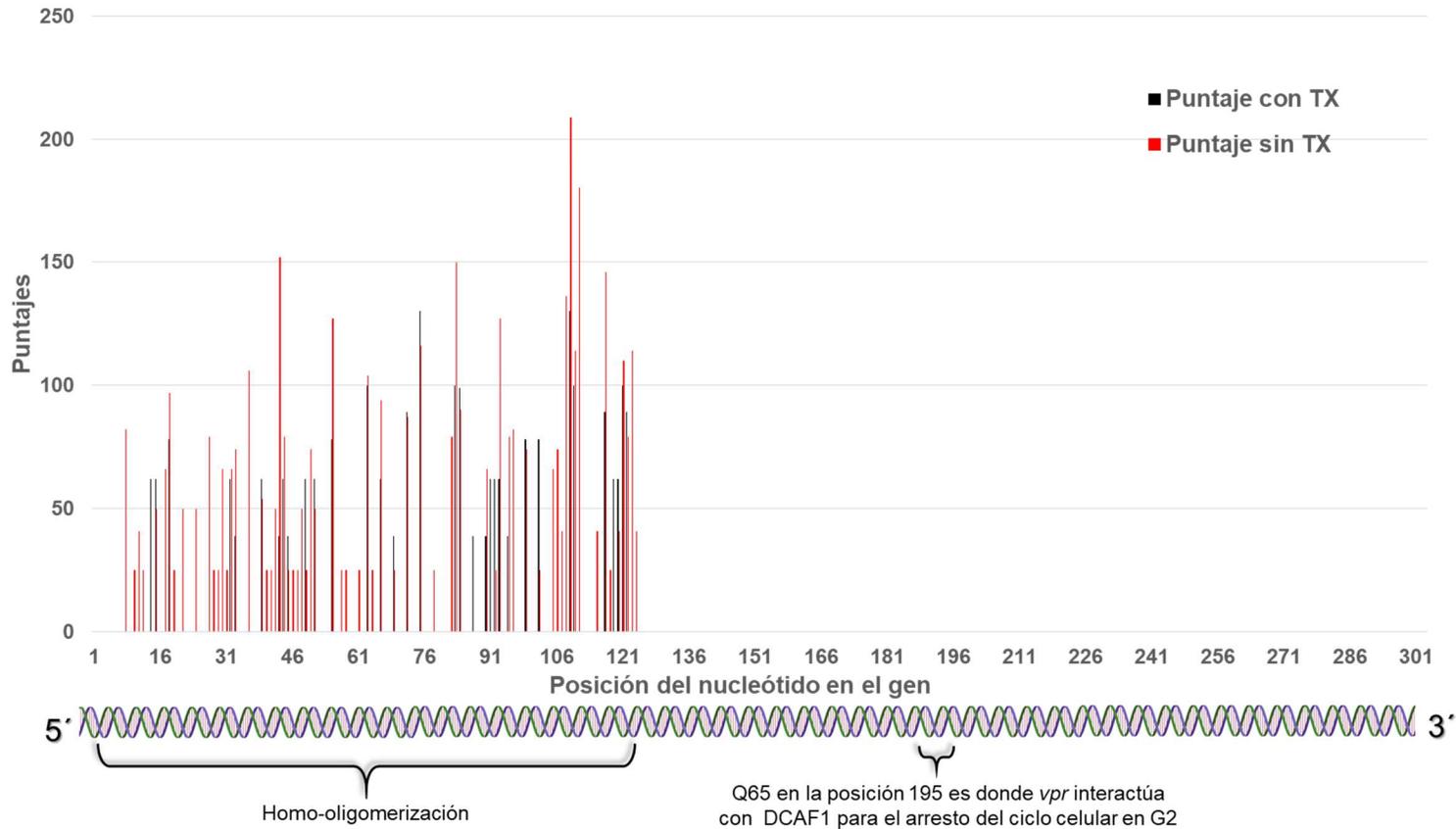


Figura 37. Análisis comparativo de las secuencias individuales del gen *vpr* de los pacientes sin tratamiento (líneas negras) y con tratamiento (líneas rojas). En el eje de las abscisas se grafica la región del gen, en pares de bases y en el eje de las ordenadas el grado de similitud (de 0 a 1) calculados con la técnica de Kimura (2-parámetros), tomando como secuencia de referencia a HXB2 (K.03455.1).

Análisis del polimorfismo de los dominios funcionales de *vpr*

Para evaluar si existía diferencia entre la secuencia de referencia y las muestras problema, se realizó el análisis de polimorfismo en la región que está relacionada con la homooligomerización (Zhao y col. , 1994) de la proteína y de la posición 195 (Q65) que está relacionada con el arresto del ciclo celular (Le Rouzic y col. , 2007) (**Gráfica 5**). No se encontró ningún polimorfismo en ningún grupo de secuencias, por lo que se puede deducir que este sitio es muy conservado.

Comparación de puntajes en dominios funcionales de gen *vpr*



Gráfica 5. Se grafican los puntajes obtenidos en cada posición del gen *vpr*, de las secuencias de pacientes con y sin tratamiento. Las secuencias se analizaron con el programa Analyze Sequence Variation (SNP) hospedado en la página Virus Pathogen Database and Analysis Resource (ViPR) (Pickett et al., 2012) a través de la página electrónica <http://www.viprbrc.org>. Se grafican únicamente los dominios funcionales del gen.

Análisis estadístico del polimorfismo de los dominios funcionales de *vpr*

El análisis estadístico (prueba F y Wilcoxon) de los puntajes correspondiente al sitio de homo-oligomerización muestra una diferencia estadísticamente significativa de las medianas y desviación estándar entre las muestras de pacientes con y sin tratamiento (Gráfica 5).

Tabla 7. Resumen estadístico del polimorfismo de los dominios funcionales del gen *vpr* de secuencias de pacientes sin tratamiento y con tratamiento (*GenBank*). Análisis realizado con *Statgraphics v.15.2.05*

Puntaje del dominio funcional del gen <i>vpr</i> del VIH-1				
	Homo-oligomerización		Q65 arresto en G2	
	<i>Con Tx</i>	<i>Sin Tx</i>	<i>Con Tx</i>	<i>Sin Tx</i>
Recuento	126	126	0	0
Promedio	19.1825	35.9365	0	0
Desviación Estándar	34.1707	46.159	0	0
Mínimo	0	0	0	0
Máximo	130	209	0	0
Sesgo Estandarizado	7.0978	6.25732	0	0
Curtosis Estandarizada	2.68029	3.26261	0	0
Distribución (Estadístico W)	No-Normal	No-Normal	ND	ND
Prueba-F para comparar Desviaciones Estándar	P = 0.000866201 Existe una diferencia significativa entre las desviaciones estándar		ND	
Prueba W de Mann-Whitney (Wilcoxon) para comparar medianas	P = 0.000156846 Existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas		ND	
	ND = No Determinado			

Vif

Análisis filogenético de *vif*

De los genes analizados, *vif* fue el único que se logró comparar con secuencias de pacientes del norte de México las cuales fueron obtenidas del GenBank a partir del trabajo realizado por Guerra-Palomares y col. (**Tabla 7**) de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí (Guerra-Palomares y col. , 2016).

En el árbol circular del gen *vif* (**Fig.18**) se muestra una clara separación entre la mayoría de las secuencias con tratamiento y las secuencias sin tratamiento (puntos grises y cuadros negros, respectivamente). Cabe destacar que se observa un agrupamiento entre secuencias del INCMNSZ y UASLP (**Fig. 21**).

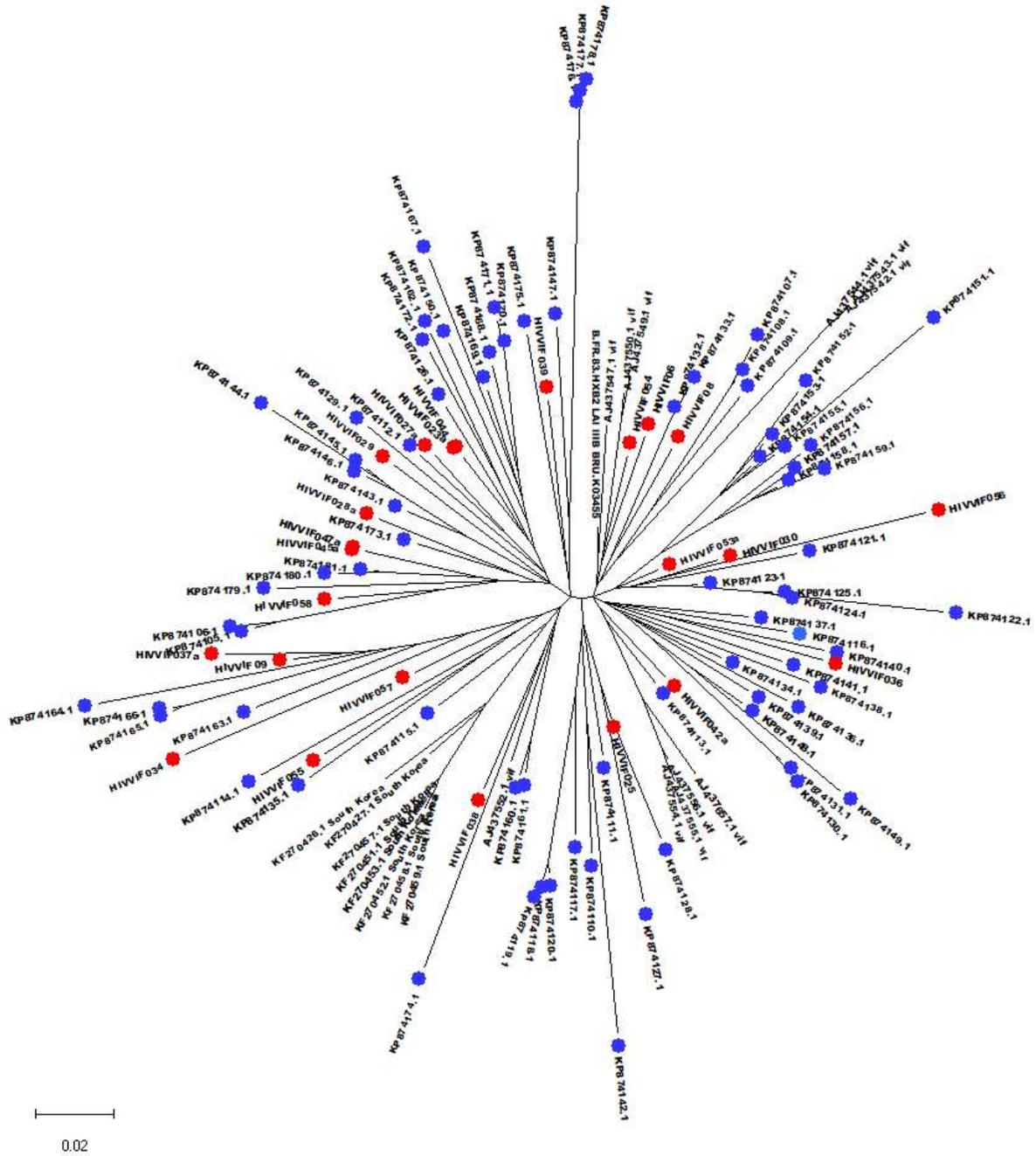


Figura 19. Construcción radial del árbol filogenético del gen *vif* del VIH. Puntos azules (UASLP) y rojos (INCMNSZ), indican a los pacientes mexicanos. La escala muestra el número de sustituciones por sitio. El árbol fue realizado por el método de Maximum Composite Likelihood (MCL) en el programa MEGAX.

Análisis genómico de *vif*

El análisis realizado del gen *vif* indica una región de mayor discrepancia en las posiciones 90-110 pb, 180-210 pb y 450-490 pb, que corresponden a los dominios que interactúan con APOBEC3G/3F, al sitio de unión al RNA y al sitio de multimerización, respectivamente (**Fig. 20**). Por otra parte se observa una diferencia entre ambos grupos en la posición 550 a 590 pb.

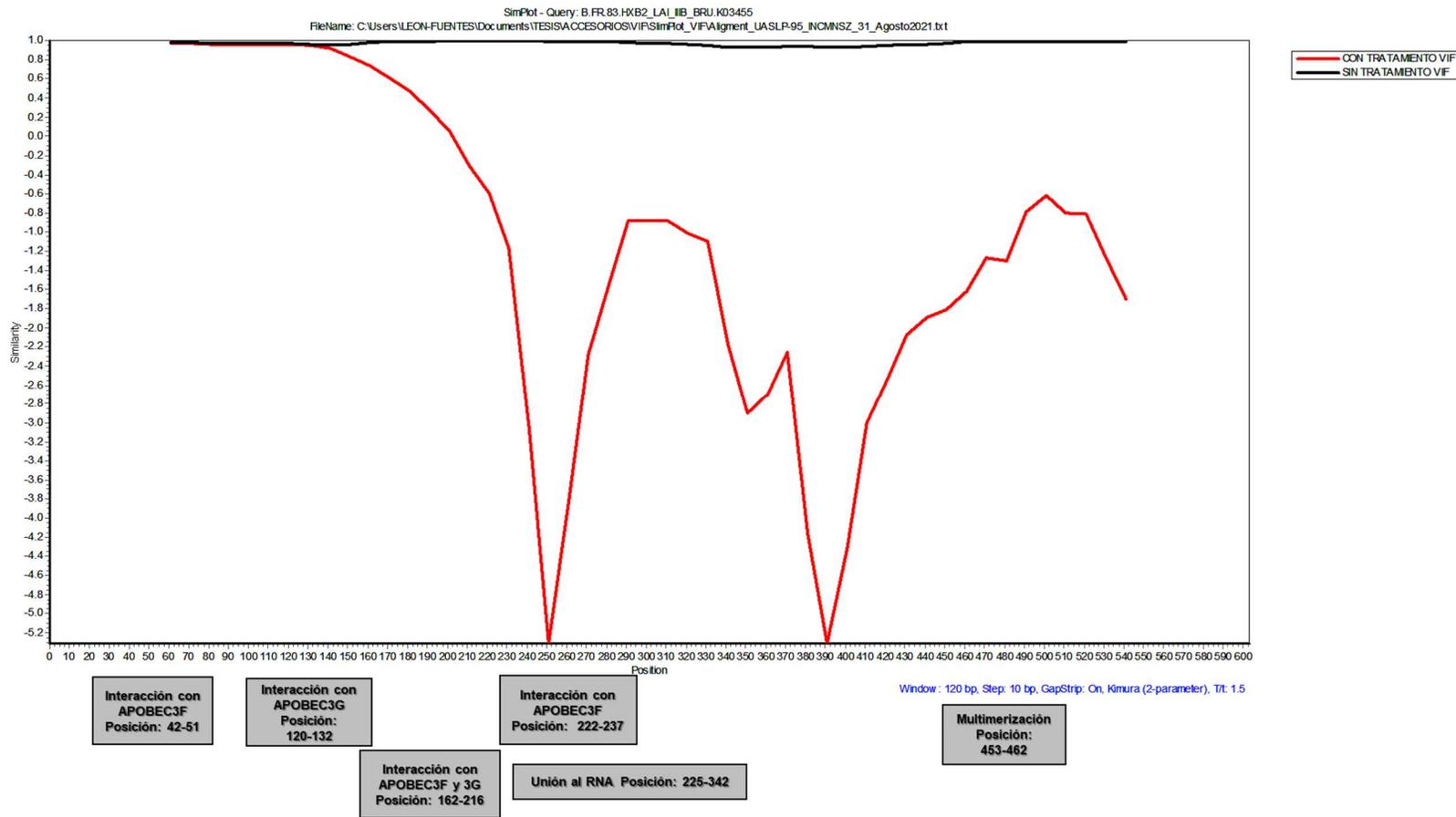


Figura 20. Análisis comparativo de las secuencias consenso del gen *vif* de los pacientes con tratamiento (línea roja) y sin tratamiento (línea negra). En el eje de las abscisas se grafica la región del gen, en pares de bases y en el eje de las ordenadas el grado de similitud (de 0 a 1), calculados con la técnica de Kimura (2-parámetros), tomando como secuencia de referencia a HXB2 (K.03455.1).

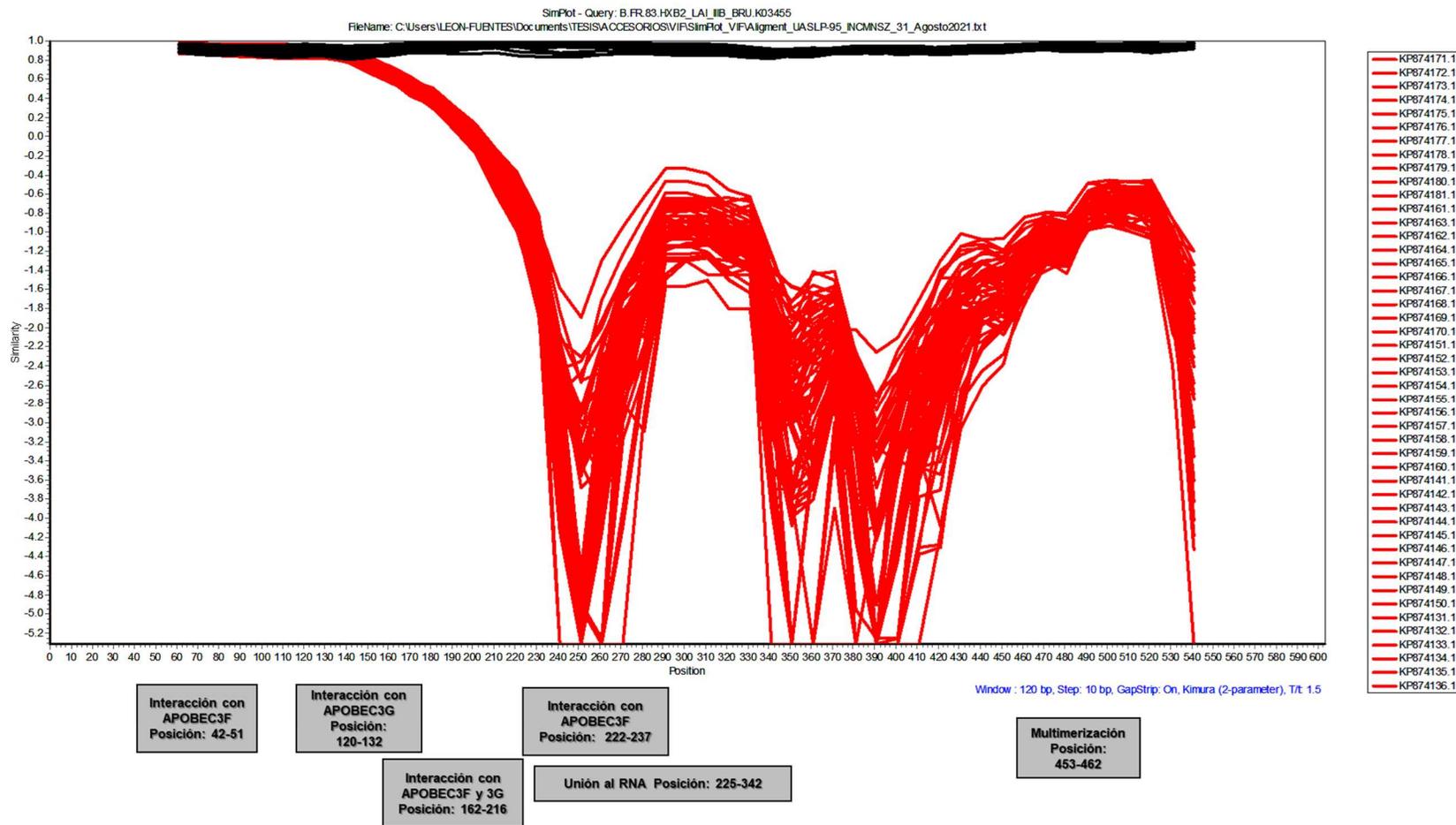
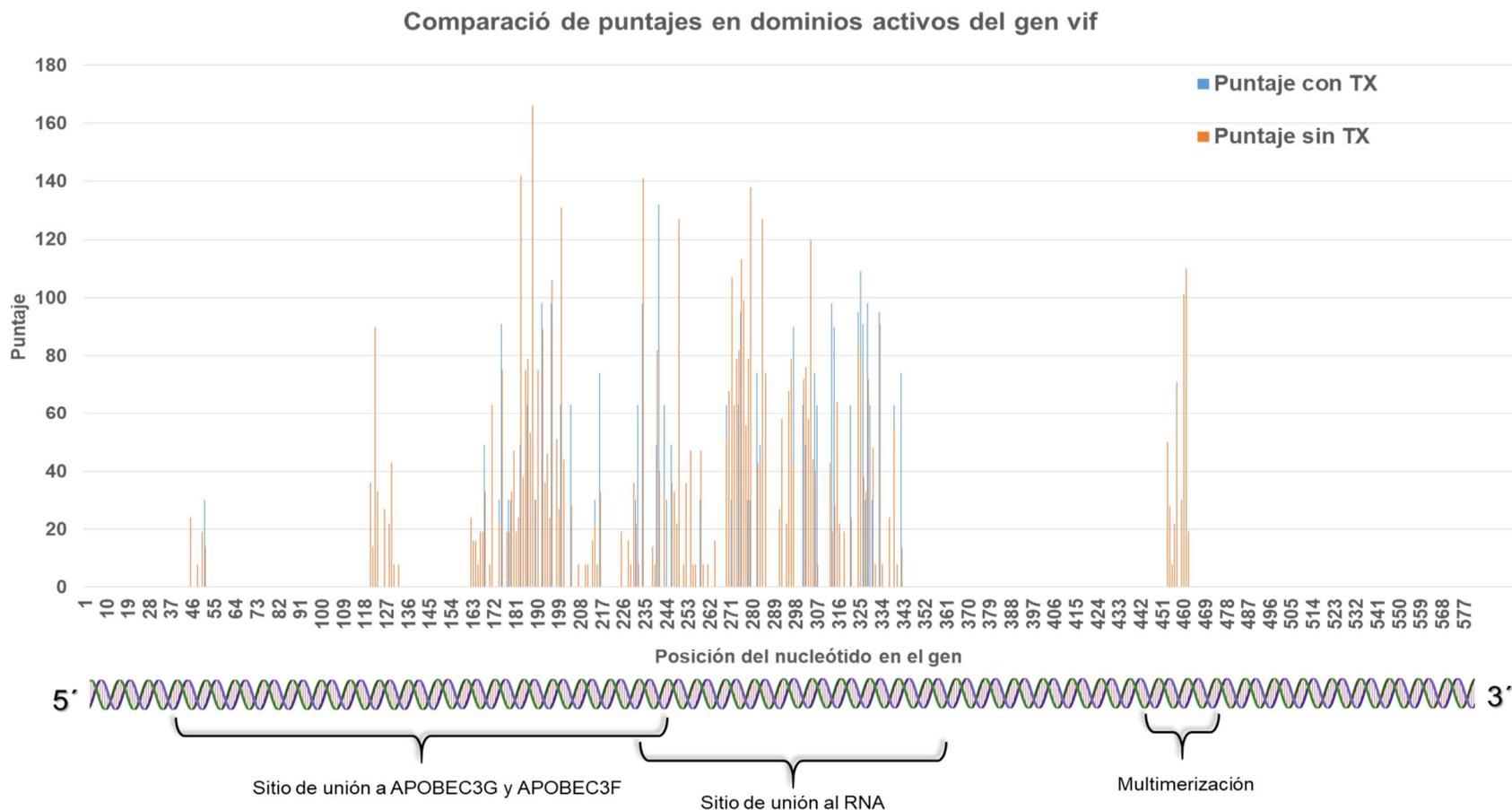


Figura 21. Análisis comparativo de las secuencias individuales del gen *vif* de los pacientes con tratamiento (líneas rojas) y sin tratamiento (líneas negras). En el eje de las abscisas se grafica la región del gen, en pares de bases y en el eje de las ordenadas el grado de similitud (de 0 a 1), calculados con la técnica de Kimura (2-parámetros), tomando como secuencia de referencia a HXB2 (K.03455.1).

Análisis del polimorfismo de los dominios funcionales de vif

La diferencia identificada entre grupos se corroboró con el análisis de polimorfismo (**Gráfica 6**), en la posición 160 a 163 pb, donde se muestra una mayor densidad de polimorfismos, principalmente en los pacientes sin tratamiento (líneas rojas). Se observó que las regiones donde existe una mayor diversidad, corresponden a los dominios de interacción con APOBEC3G/3F, el sitio de unión al RNA, así como a la región de multimerización, en concordancia con el análisis anterior.



Gráfica 6. Puntajes obtenidos en cada posición del gen *vif*, de las secuencias de pacientes con y sin tratamiento y analizados con el programa Analyze Sequence Variation (SNP) hospedado en la página Virus Pathogen Database and Analysis Resource (ViPR) (Pickett et al., 2012) a través de la página electrónica <http://www.viprbrc.org>. Se grafican únicamente los dominios funcionales del gen.

Análisis estadístico del polimorfismo de los dominios funcionales de *vif*

El análisis estadístico (Tabla 10) muestra que existe una diferencia significativa en tres regiones de *vif*, el sitio de unión a APOBEC3G/3F, el sitio de unión al RNA y en el sitio de multimerización. No se observó polimorfismo en el sitio de unión a 3G ni en el sitio de multimerización en las secuencias de los pacientes con tratamiento.

Tabla 8. Resumen estadístico del polimorfismo de los dominios funcionales del gen *vif* de secuencias de pacientes sin tratamiento y con tratamiento (*GenBank*). Análisis realizado con Statgraphics v.15.2.05

Puntaje de los dominio funcional de la secuencia del gen <i>vif</i> del VIH-1												
	Sitio de unión a APOBEC3F		Sitio de unión a APOBEC3G		Sitio de unión a APOBEC3G y 3F		Sitio de inibicion de APOBEC3F		Unión al RNA		Multimerización	
	Con Tx	Sin Tx	Con Tx	Sin Tx	Con Tx	Sin Tx	Con Tx	Sin Tx	Con Tx	Sin Tx	Con Tx	Sin Tx
Recuento	10	10	13	13	55	55	16	16	118	118	10	10
Promedio	3	6.5	0	21.615	15.4	32.85	11.93	15.62	20.33	30.05	0	43.9
Desviación Estándar	9.4868	9.27661	0	25.49	28.39	37.88	28.51	35.11	34.18	36.53	0	38.24
Mínimo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Máximo	30	24	0	90	98	166	98	141	132	141	0	110
Sesgo Estandarizado	4.08	1.36	ND	2.52	5.25	5.3	4.04	5.58	6.36	5.47	ND	110
Curtosis Estandarizada	6.45	-0.288	ND	2.65	2.87	4.63	4.6	10.22	1.62	1.65	ND	-0.46
Distribución (Estadístico W)	No Normal	No Normal	ND	No Normal	No Normal	No Normal	No Normal	No Normal	No Normal	No Normal	ND	Normal
Prueba-F para comparar Desviaciones Estándar	P = 0.947868 No existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar		P = 0.0 Existe diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar		P = 0.361559 Existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar		P = 0.428832 No hay diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar		P = 0.473443 No hay diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar		P = 0.0 Existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar	
Prueba W de Mann-Whitney (Wilcoxon) para comparar medianas	P = 0.214289 No hay diferencia estadísticamente significativa entre las medianas		P = 0.000459011 Existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas		P = 0.000095301 Existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas		P = 0.251525 No hay diferencia estadísticamente significativa entre las medianas		P = 0.000388862 Existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas		P = 0.000231308 Existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas	
ND = No Determinado												

Tat

Análisis filogenético de *tat*

Con respecto al análisis de las secuencias del gen *tat* de los pacientes sin tratamiento, se observa una agrupación específica, en donde las secuencias se dividen en dos grandes nodos, con un Bootstrap de 100 (Fig. 22). Además se observa que la mayoría de los nodos que se bifurcan en secuencias relacionadas, con un Bootstrap menor a 50. Considerando la definición de Bootstrap como “una técnica efectiva para probar la relativa estabilidad de los grupos dentro de una filogenia” (Lemey, 2009), la mayoría de las agrupaciones en este modelo, muestran menos del 50% de estabilidad en su relación y únicamente en aquellos nodos que tienen más del 75%, se pueden considerar estables (Zharkikh y Li, 1992), reflejando la “verdadera” relación entre taxás (secuencias). Este mismo criterio se aplica a los árboles de los 6 genes analizados en este trabajo.

Se observa que las distancias entre taxás del gen *tat* (Kimura 2-parámetros), son reducidas con ramas de hasta cero en distancia, por lo que podemos deducir que la relación existente entre los taxás es muy cercana o poco diversa (**Fig. 23**)

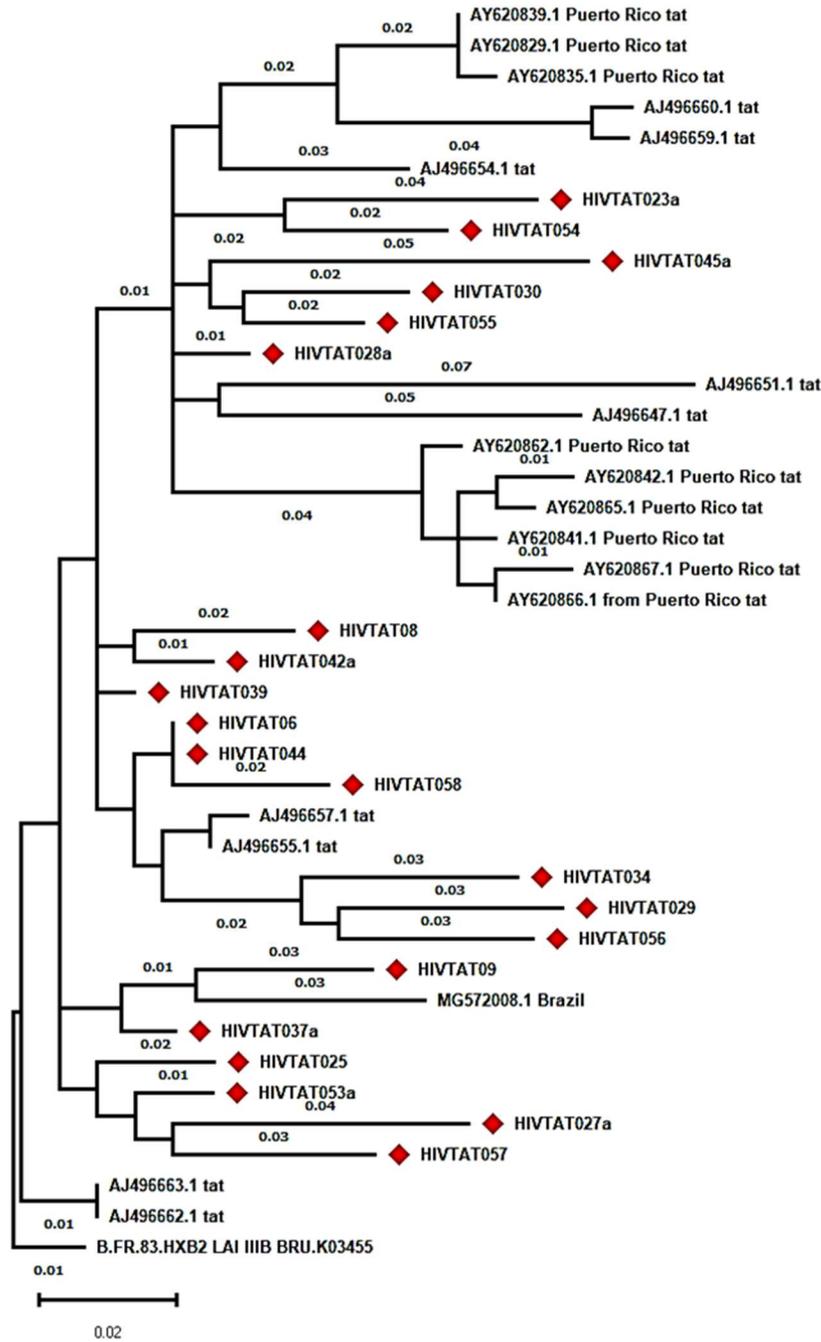


Figura 23. Construcción rectangular del árbol filogenético del gen *tat* del VIH. Los cuadros rojos indican los pacientes mexicanos sin tratamiento. La escala muestra el número de sustituciones por sitio. Árbol realizado por el método de Maximum Likelihood y el modelo de Tamura-Nei (Tamura y Nei, 1993) en el programa MEGAX

Análisis genómico de *tat*

Las similitudes o cercanías filogenéticas se observan con mayor precisión en el análisis genómico a lo largo del gen, específicamente en los sitios o dominios funcionales. En la **gráfica 24** se observa que en las secuencias consenso de ambos grupos de pacientes, no hay una diferencia de más de 0.1 (escala adimensional) a lo largo del gen, con valores de un 0.973 y 0.988 para los pacientes de sin tratamiento y con tratamiento, respectivamente

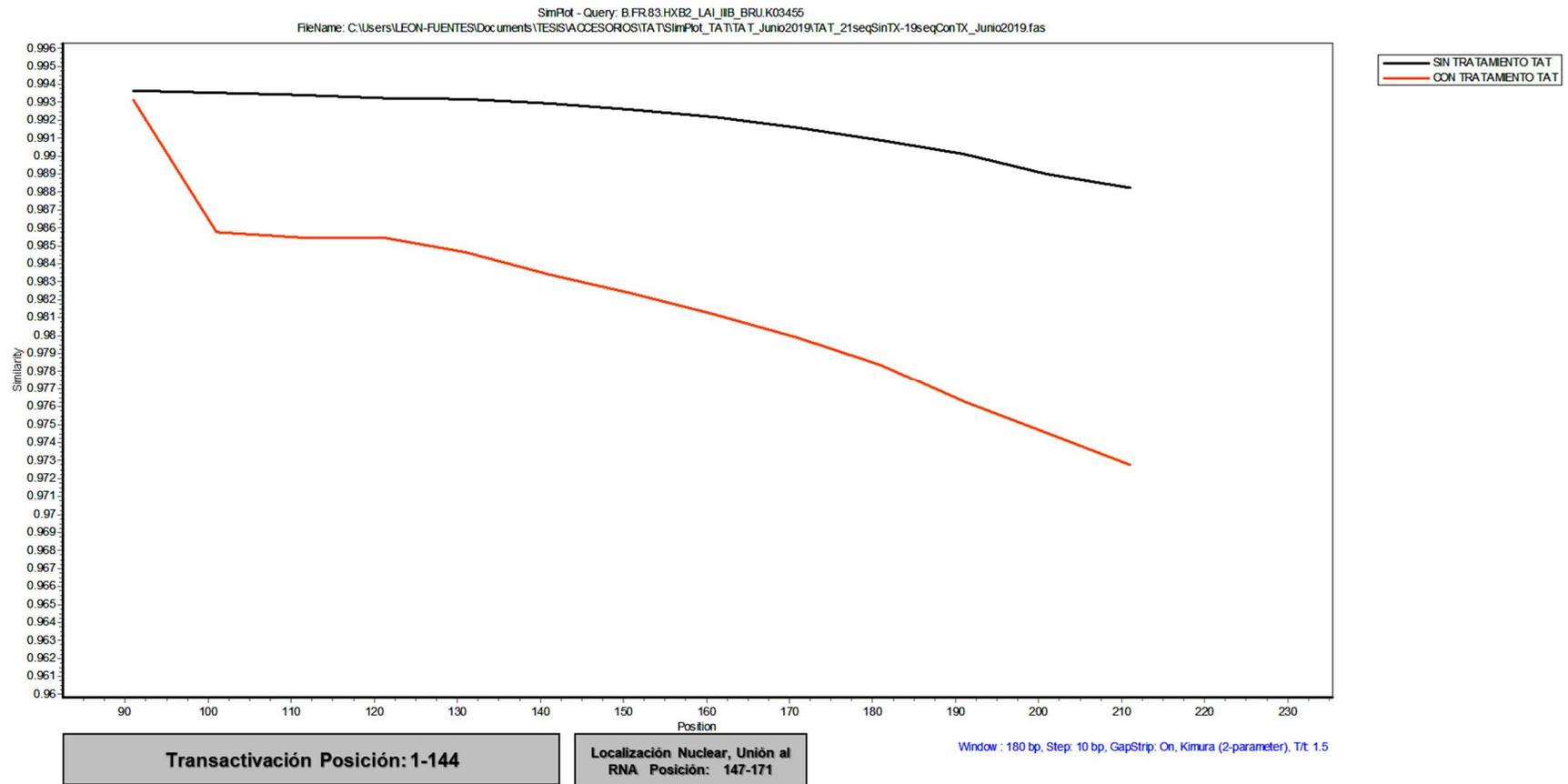


Figura 24. Análisis comparativo de las secuencias consenso del gen *tat* de los pacientes con tratamiento (línea roja) y sin tratamiento (línea negra). En el eje de las abscisas se grafica la región del gen, en pares de bases y en el eje de las ordenadas el grado de similitud (de 0 a 1), calculados con la técnica de Kimura (2-parámetros), tomando como secuencia de referencia a HXB2 (K.03455.1).

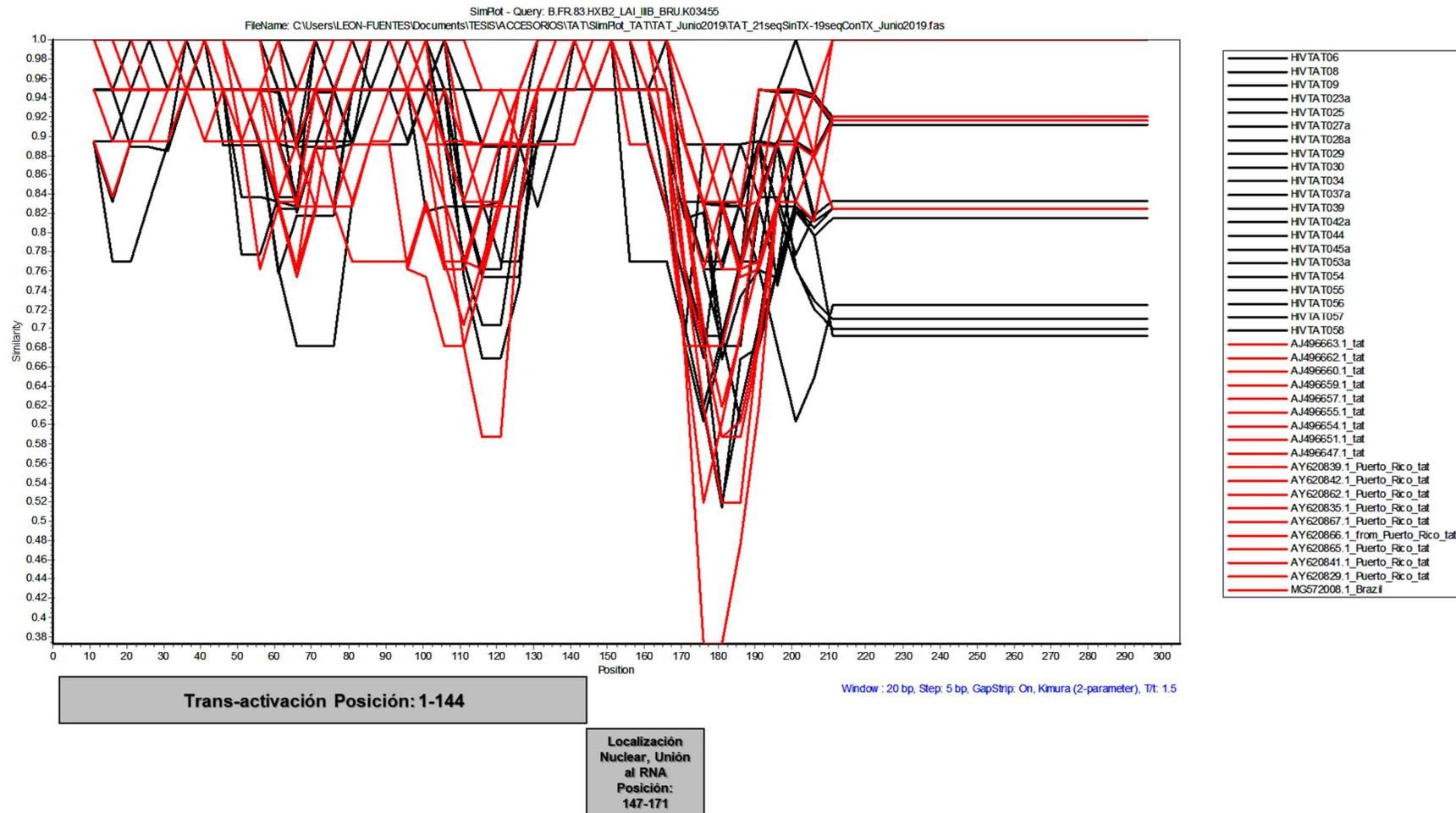
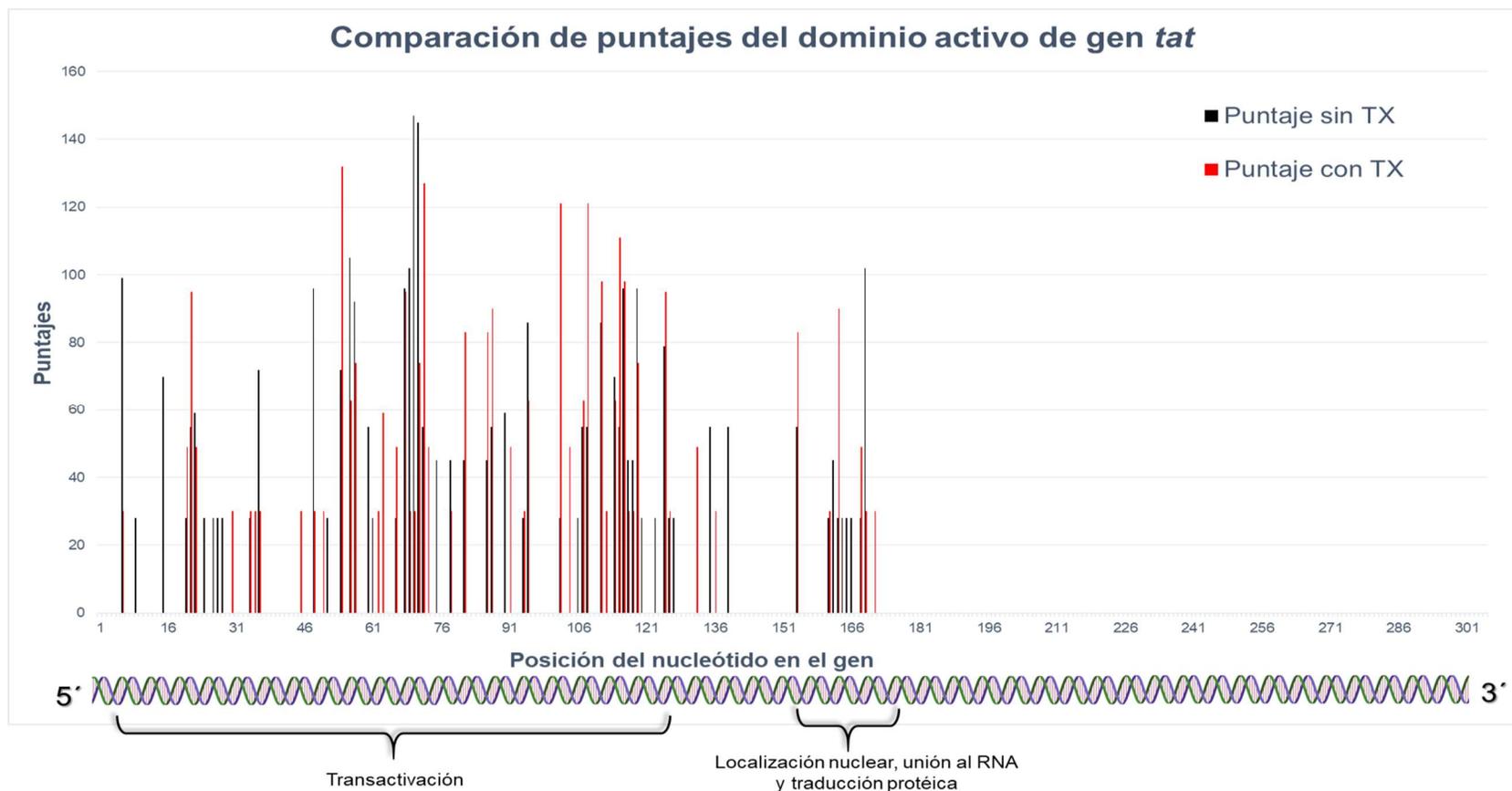


Figura 25. Análisis comparativo de las secuencias del gen *tat* de los pacientes sin tratamiento. En el eje de las abscisas se grafica la región del gen, en pares de bases y en el eje de las ordenadas el grado de similitud (de 0 a 1), calculados con la técnica de Kimura (2-parámetros), tomando como secuencia de referencia a HXB2 (K.03455.1).

Análisis del polimorfismo de los dominios funcionales de *tat*

En el análisis del polimorfismo se graficaron los puntajes que arroja el programa SNP, en ambos grupos de pacientes. Se muestran las dos regiones o dominios funcionales del gen *tat*. Cada barra nos indica el valor calculado (score) que presenta cambios y diferencias entre los grupos de pacientes, con un pico máximo en la región comprendida entre la posición 61 y 76 del dominio de transactivación, lo que indica probablemente, una presión selectiva en esa región genómica (**Gráfica 7**).



Gráfica 7. Se grafican los puntajes obtenidos en cada posición del gen *tat*, de las secuencias de pacientes con y sin tratamiento y analizados con el programa Analyze Sequence Variation (SNP) hospedado en la página Virus Pathogen Database and Analysis Resource (ViPR) (Pickett et al., 2012) a través de la página electrónica <http://www.viprbrc.org>. Se grafican únicamente los dominios funcionales del gen.

Análisis estadístico del polimorfismo de los dominios funcionales de *tat*

Considerando los puntajes obtenidos en cada posición del gen *tat* en ambos grupos de pacientes, se realizó el análisis estadístico *W* para ver la normalidad de los datos y en conjunto con la curtosis y el sesgo, el análisis no-paramétrico. Los resultados muestran que no existe una diferencia estadísticamente significativa en los polimorfismos de los dominios del gen *tat* entre ambos grupos (**Tabla 11**).

Tabla 9. Resumen estadístico del polimorfismo de los dominios funcionales del gen *tat* de secuencias de pacientes sin tratamiento y con tratamiento (*GenBank*). Análisis realizado con *Statgraphics v.15.2.05*

Puntaje de los dominios funcionales de la secuencia del gen <i>tat</i> del VIH-1				
	Transactivación		Localización nuclear, unión al RNA	
	<i>Con Tx</i>	<i>Sin Tx</i>	<i>Con Tx</i>	<i>Sin Tx</i>
Recuento	144	144	25	25
Promedio	19.2014	20.6111	12.48	14.8
Desviación Estándar	33.3468	33.3328	25.9777	24.7336
Mínimo	0	0	0	0
Máximo	132	147	90	102
Sesgo Estandarizado	8.56068	8.13518	4.45315	4.38382
Curtois Estandarizada	5.21427	5.40264	4.11549	5.59568
Distribución (Estadístico W)	No-Normal	No-Normal	No-Normal	No-Normal
Prueba-F para comparar Desviaciones Estándar	P = 0.996017 No existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar		P = 0.811962 No existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar	
Prueba W de Mann-Whitney (Wilcoxon) para comparar medianas	P = 0.735933 No existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas		P = 0.581429 No existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas	

Rev

Análisis filogenético de *rev*

En el análisis filogenético de *rev*, se observa un árbol bifurcado entre las secuencias de pacientes con y sin tratamiento (**Fig. 26**). Una de las ramas principales del árbol agrupa a la gran mayoría de las secuencias de los pacientes sin tratamiento (puntos rojos) junto con la secuencia de referencia HXB2 y el paciente 29. La otra rama principal agrupa a las secuencias de los grupos de pacientes tratados con y sin falla al tratamiento. El agrupamiento es más evidente en el árbol radial que se muestra en la **figura 27**. Como se puede apreciar, las distancias y los agrupamientos del gen *rev*, son mayores que los genes *tat*, *vpr*, *vpu* y *vif*, lo que indica que la diversidad de este gen es mayor para el grupo de los pacientes sin tratamiento realizado en MEGAX (S. Kumar y col. , 2018).

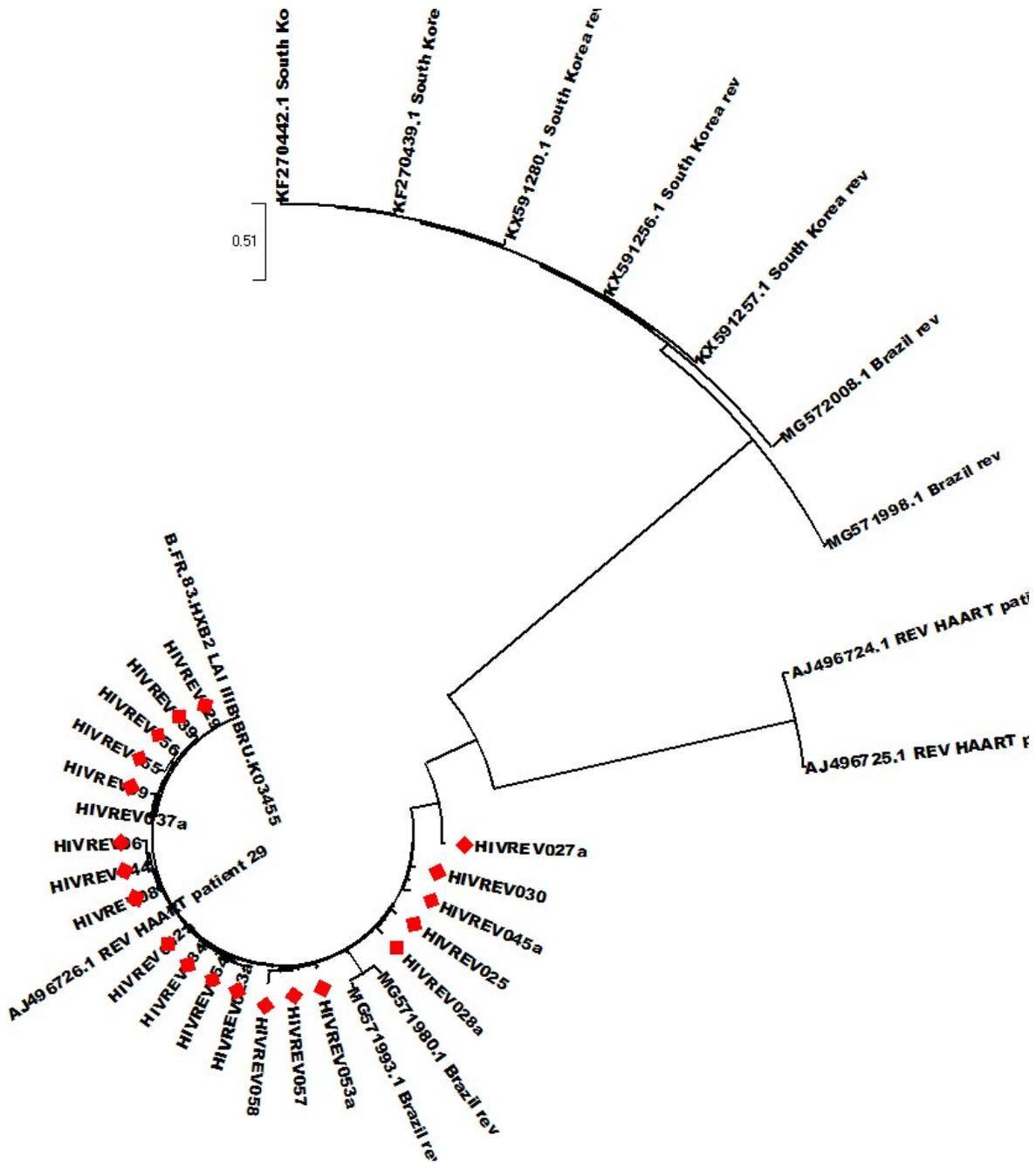


Figura 26. Construcción circular del árbol filogenético del gen *rev* del VIH. Los cuadros rojos, indican los pacientes mexicanos sin tratamiento. La escala representa el número de sustituciones por sitio. Árbol realizado por el método de Maximum Likelihood y el modelo de Kimura 2-parámetros (Kimura, 1980) en el programa MEGAX.

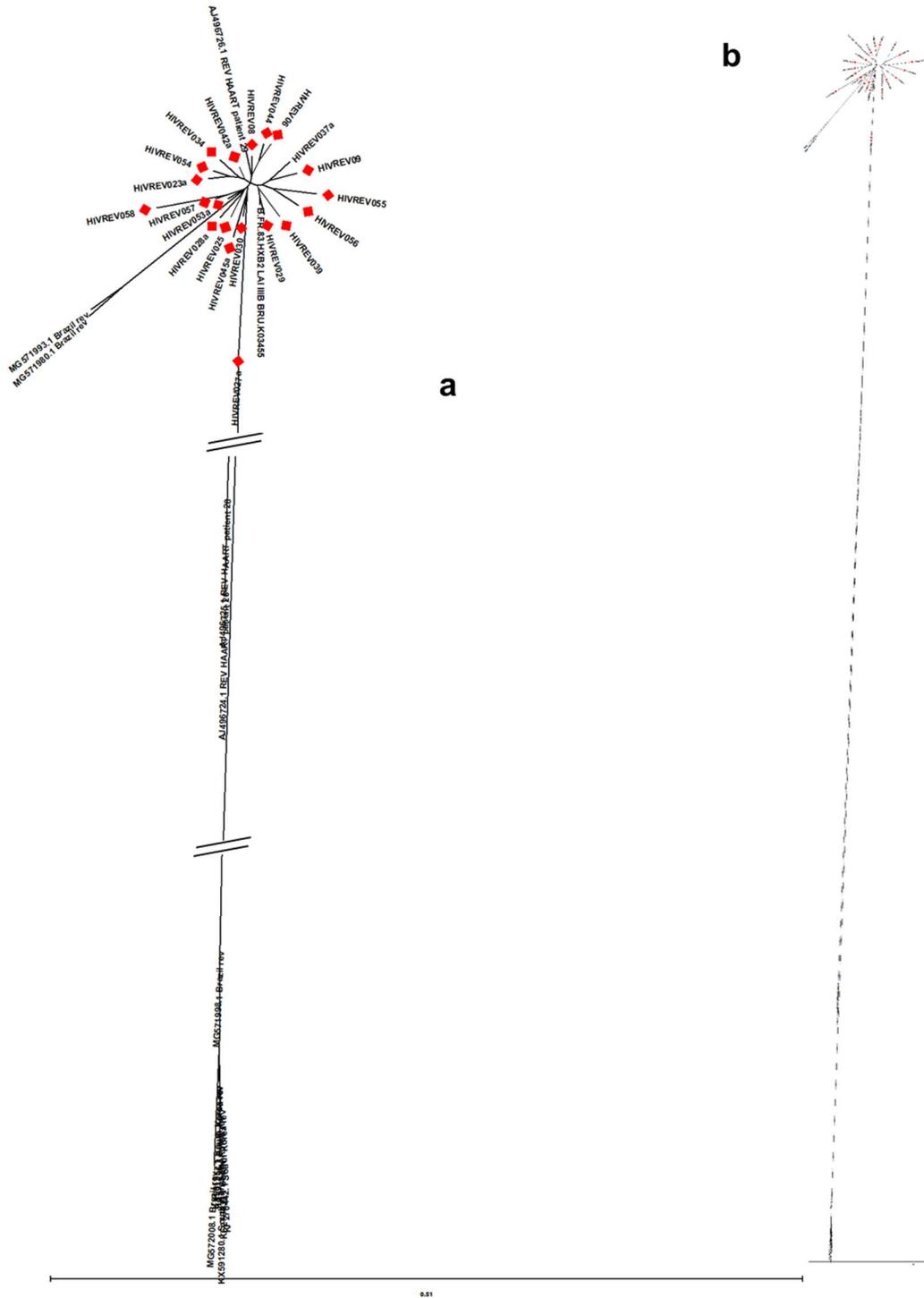


Figura 27. Construcción radial del árbol del gen *rev* del VIH. a) Corte y acercamiento del árbol completo (b). Los cuadros rojos, indican los pacientes mexicanos sin tratamiento. Árbol realizado por el método de Maximun Likelihood Method y modelo de Kimura 2-parámetros (Kimura, 1980), con un Bootstrap de 100 réplicas en el programa MEGAX.

Análisis genómico de *rev*

De forma análoga al análisis anteriormente expuesto y por el grado de similitud (Kimura 2-parámetros) se observan dos grupos claramente diferenciados (**Fig. 28**). Basándose en el grado de similitud entre las secuencias (Kimura 2-parámetros), se observó que las secuencias de los pacientes sin tratamiento, presentaron una mayor similitud con la secuencia de referencia, con un puntaje mayor al 0.96, en los tres dominios funcionales de la secuencia.

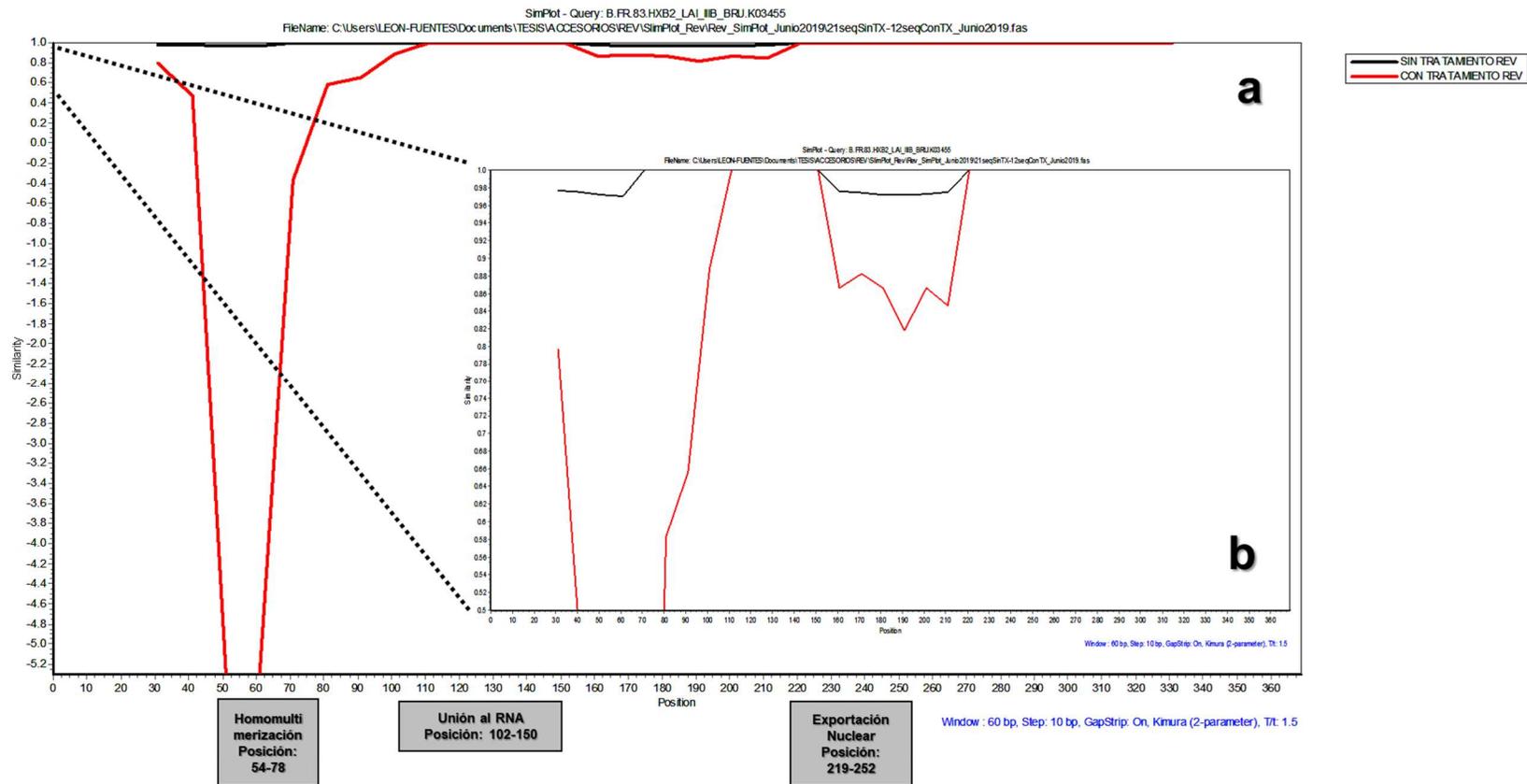


Figura 28. Análisis comparativo de las secuencias consenso del gen rev. En el eje de las abscisas se grafica la región del gen en pares de bases y en el eje de las ordenadas el grado de similitud (de 0 a 1). a) Pacientes con tratamiento (GenBank) y sin tratamiento y b) acercamiento del intervalo de similitud 0.5 a 1.0. calculados con la técnica de Kimura (2-parámetros), tomando como secuencia de referencia a HXB2 (K.03455.1).

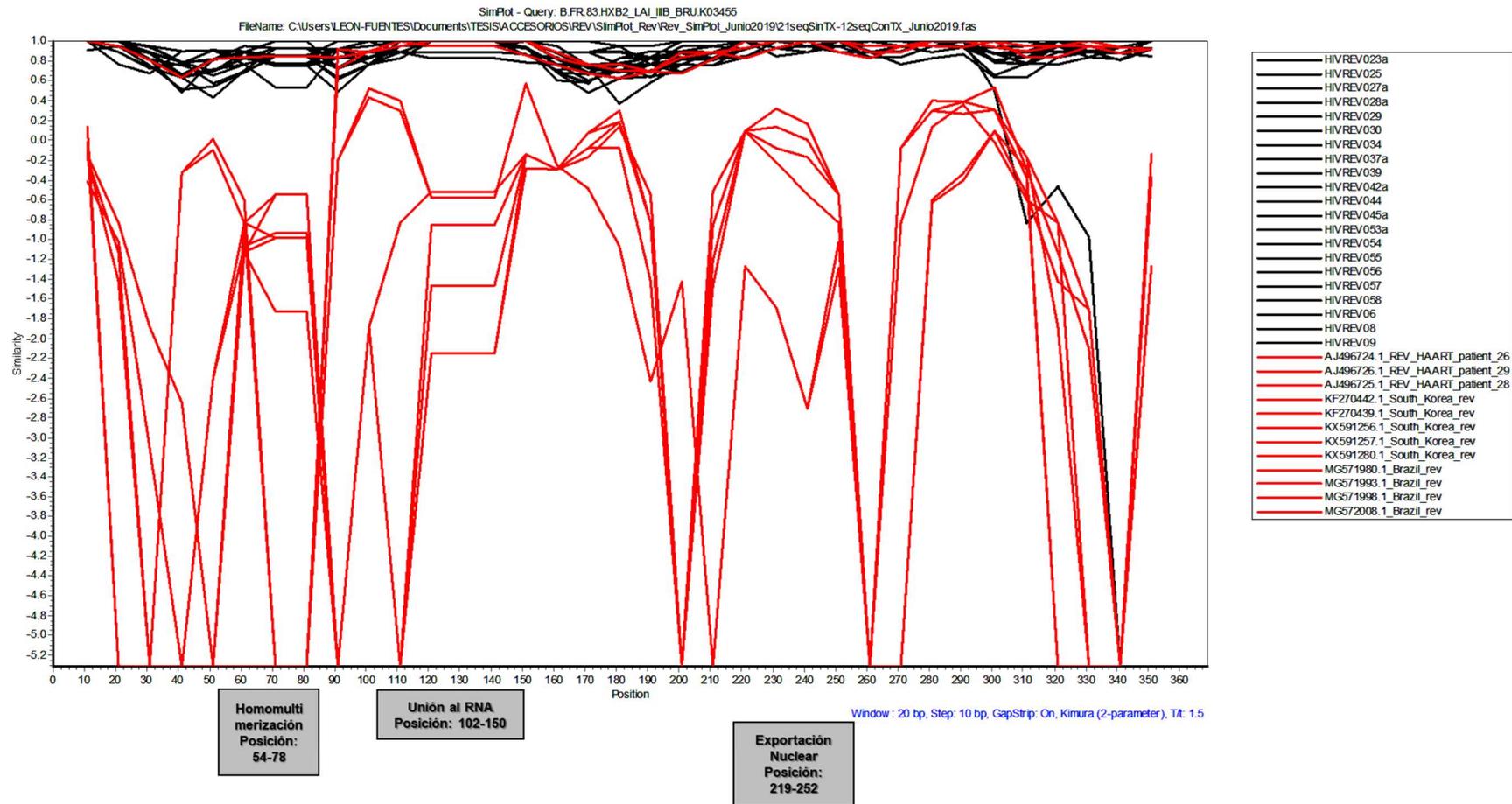
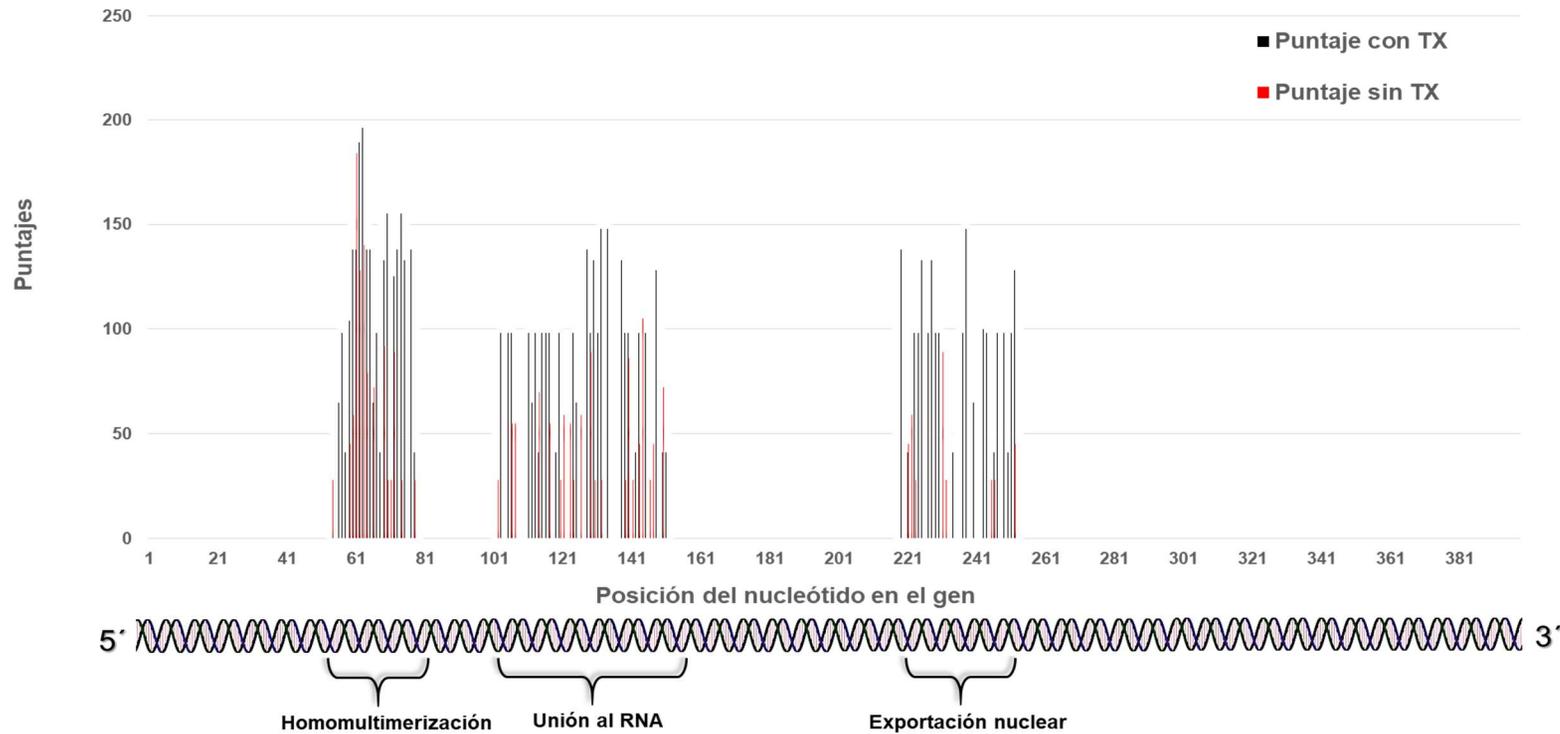


Figura 29. Análisis comparativo de las secuencias individuales del gen rev de los pacientes sin tratamiento. En el eje de las abscisas se grafica la región del gen en pares de bases y en el eje de las ordenadas el grado de similitud (de 0 a 1), calculados con la técnica de Kimura (2-parámetros), tomando como secuencia de referencia a HXB2 (K.03455.1).

Análisis del polimorfismo de los dominios funcionales de *rev*

De forma contrastante con los demás genes accesorios y reguladores del VIH que se analizaron, las secuencias de los pacientes con tratamiento presentan picos de disimilitud a lo largo del gen *rev* (**Fig. 29**), incluyendo a los tres sitios funcionales. El rango de disimilitud varía de 0.9 al -5.2. Para corroborar estas observaciones, se realizó el análisis del polimorfismo en los tres dominios funcionales del gen (**Gráfica 8**), en el cual se aprecia que las secuencias de los pacientes con tratamiento tienen una mayor diversidad en los tres sitios funcionales. Los resultados se confirmaron con el análisis estadístico, donde el análisis comparativo mostró que las medianas (Wilcoxon) de cada grupo son diferentes, con una significancia estadística ($P < 0.05$, $\alpha = 0.5$) (**Tabla 12**).

Comparación de puntajes en dominios activos del gen *rev*



Gráfica 8. Puntajes obtenidos en cada posición del gen *rev*, únicamente de los sitios funcionales del gen, de las secuencias de pacientes con y sin tratamiento y analizados con el programa Analyze Sequence Variation (SNP) hospedado en la página Virus Pathogen Database and Analysis Resource (ViPR) (Pickett et al., 2012) a través de la página electrónica <http://www.viprbrc.org>. Se grafican únicamente los dominios funcionales del gen.

Tabla 10. Resumen estadístico del polimorfismo de los dominios activos del gen *rev* de secuencias de pacientes sin tratamiento y con tratamiento (GenBank). Análisis realizado con Statgraphics v.15.2.05

Puntaje de los dominios funcionales de la secuencia del gen <i>rev</i> del VIH-1						
	Homo-multimerización		Sitio de unión al RNA		Exportación Nuclear	
	<i>Con Tx</i>	<i>Sin Tx</i>	<i>Con Tx</i>	<i>Sin Tx</i>	<i>Con Tx</i>	<i>Sin Tx</i>
Recuento	25	25	50	50	34	34
Promedio	98.68	41.12	54.62	21.48	58.5	10.2941
Desviación Estándar	60.3902	51.9634	52.6765	29.534	53.1842	21.3095
Mínimo	0	0	0	0	0	0
Máximo	196	184	148	105	148	89
Sesgo Estandarizado	-0.84622	2.69767	0.604641	3.33339	0.227258	5.39036
Curtosis Estandarizada	-0.983944	1.12959	-2.23593	0.408521	-1.92442	6.06541
Distribución (Estadístico W)	No-Normal	No-Normal	No-Normal	No-Normal	No-Normal	No-Normal
Prueba-F para comparar Desviaciones Estándar	P = 0.467055 No hay diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar		P = 0.0000864 Existe diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar		P = 9.1547E-7 Existe diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar	
Prueba W de Mann-Whitney (Wilcoxon) para comparar medianas	P = 0.00132259 Existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas		P = 0.00227308 Existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas		P = 0.0000873 Existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas	

Nef

Análisis filogenético de *nef*

Las secuencias correspondientes al gen *nef* nos producen un árbol el cual muestra una mayor dispersión de las secuencias de los pacientes con y sin tratamiento, comparadas con los cinco genes anteriormente analizados. Las secuencias de los pacientes sin tratamiento muestran que existen pares de taxones que se agrupan con un valor de más de 75 de Bootstrap (**Fig. 30**), indicando que estos taxones tienen un grado de homología muy cercano. Esta cercanía se confirma con el árbol radial (**Fig. 31**).

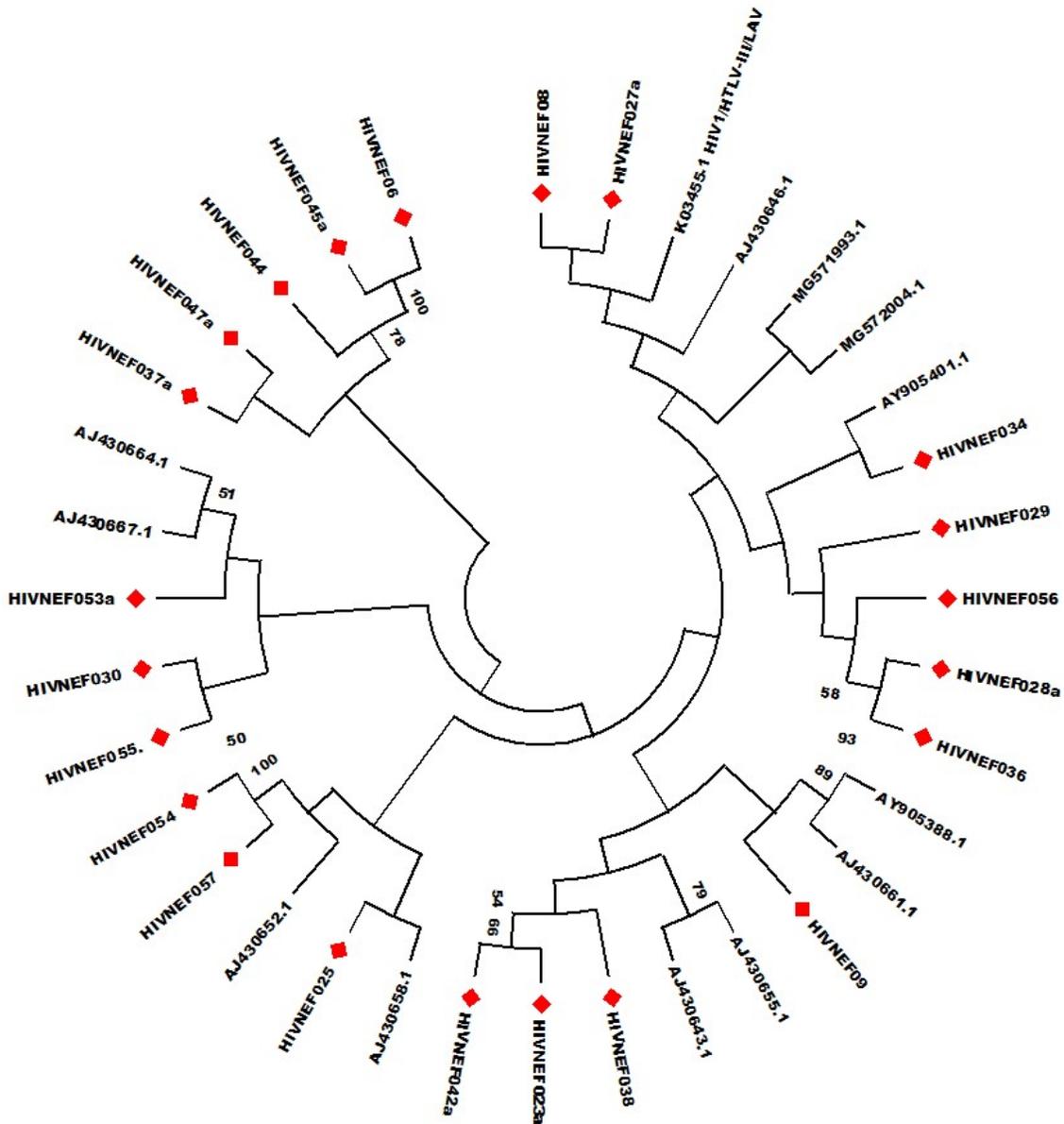


Figura 30. Construcción circular del árbol consenso del gen *nef* del VIH. Los puntos rojos indican los pacientes mexicanos sin tratamiento. Árbol realizado por el método de Maximum Likelihood y el modelo de Tamura-Nei (Tamura y Nei, 1993) con un Bootstrap de 100 réplicas en el programa MEGAX.

Análisis genómico de *nef*

Para cuantificar el polimorfismo de *nef* se analizó la secuencia completa del gen y se comparó con la secuencia de referencia (K03455). Para el análisis se incluyeron a tres dominios de la proteína viral, i) el sitio de miristilación, ii) sitio de estabilización nef/MHCI y iii) el sitio de internalización del CD4 (**Fig. 32 y 33**). Se observaron dos grupos de curvas, la primera, con una gran similitud en distancia (Kimura 2-parámetros) y la segunda con grandes disimilitudes en algunas posiciones del gen.

Se observaron diferencias en las regiones funcionales (internalización de MHC y CD4), aunque son menores de 0.1 en la escala de similitud (**Fig. 32**). Sin embargo, al realizar el análisis de cada secuencia en forma individual, se observó una tendencia de las secuencias sin tratamiento (línea negra), a separarse de la secuencia de referencia (HXB2) a una escala aún mayor (hasta 0.05) en la región de internalización de CD4. En ambas figuras, las secuencias sin tratamiento (línea negras) se separan más (diversifican) que las secuencias de los pacientes con tratamiento (líneas rojas).

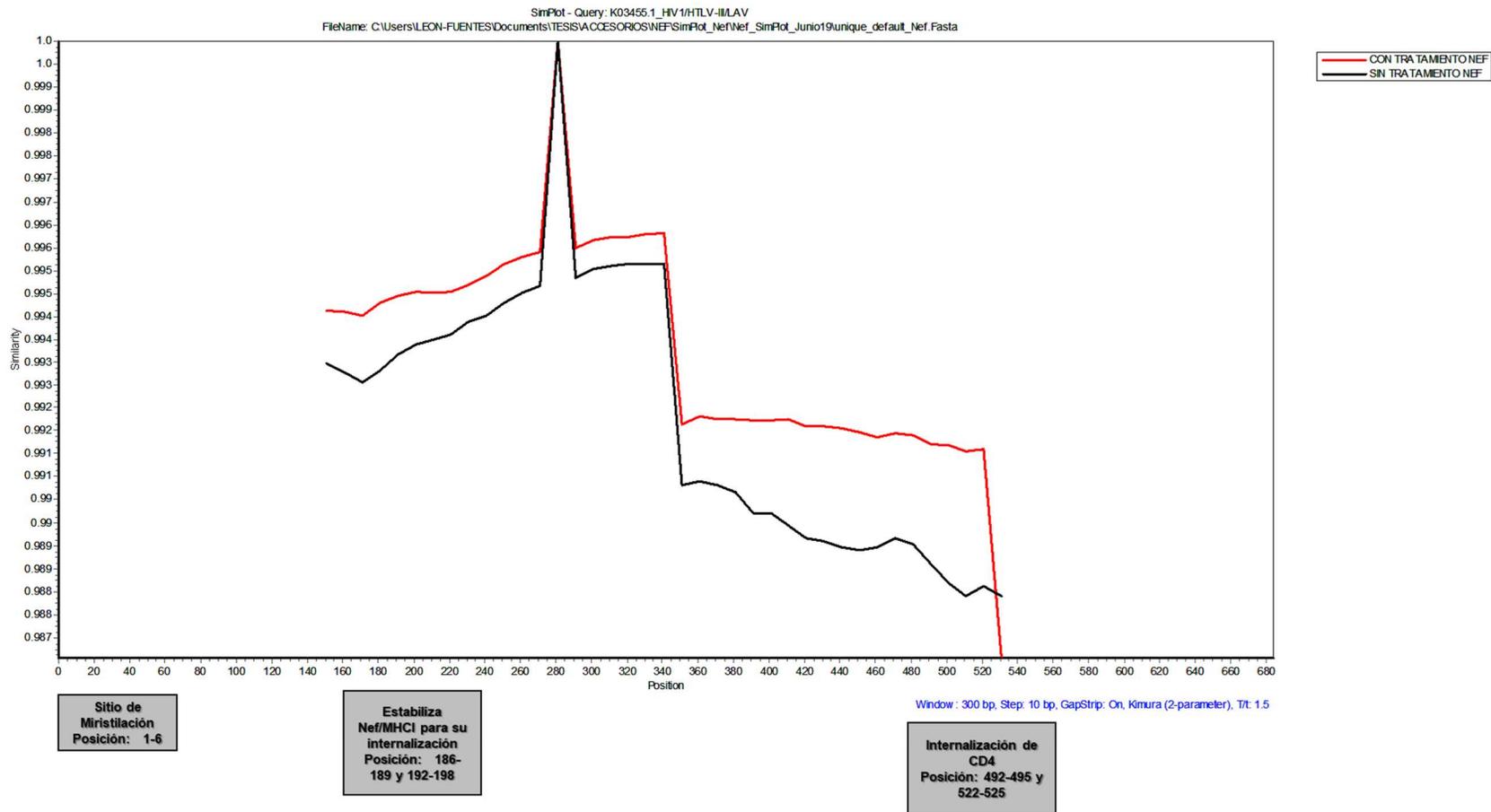


Figura 32. Análisis comparativo de las secuencias consenso del gen *nef* de los pacientes con tratamiento (línea roja) y sin tratamiento (línea negra). En el eje de las abscisas se grafica la región del gen en pares de bases y en el eje de las ordenadas el grado de similitud (de 0 a 1), calculados con la técnica de Kimura (2-parámetros), tomando como secuencia de referencia a HXB2 (K.03455.1).

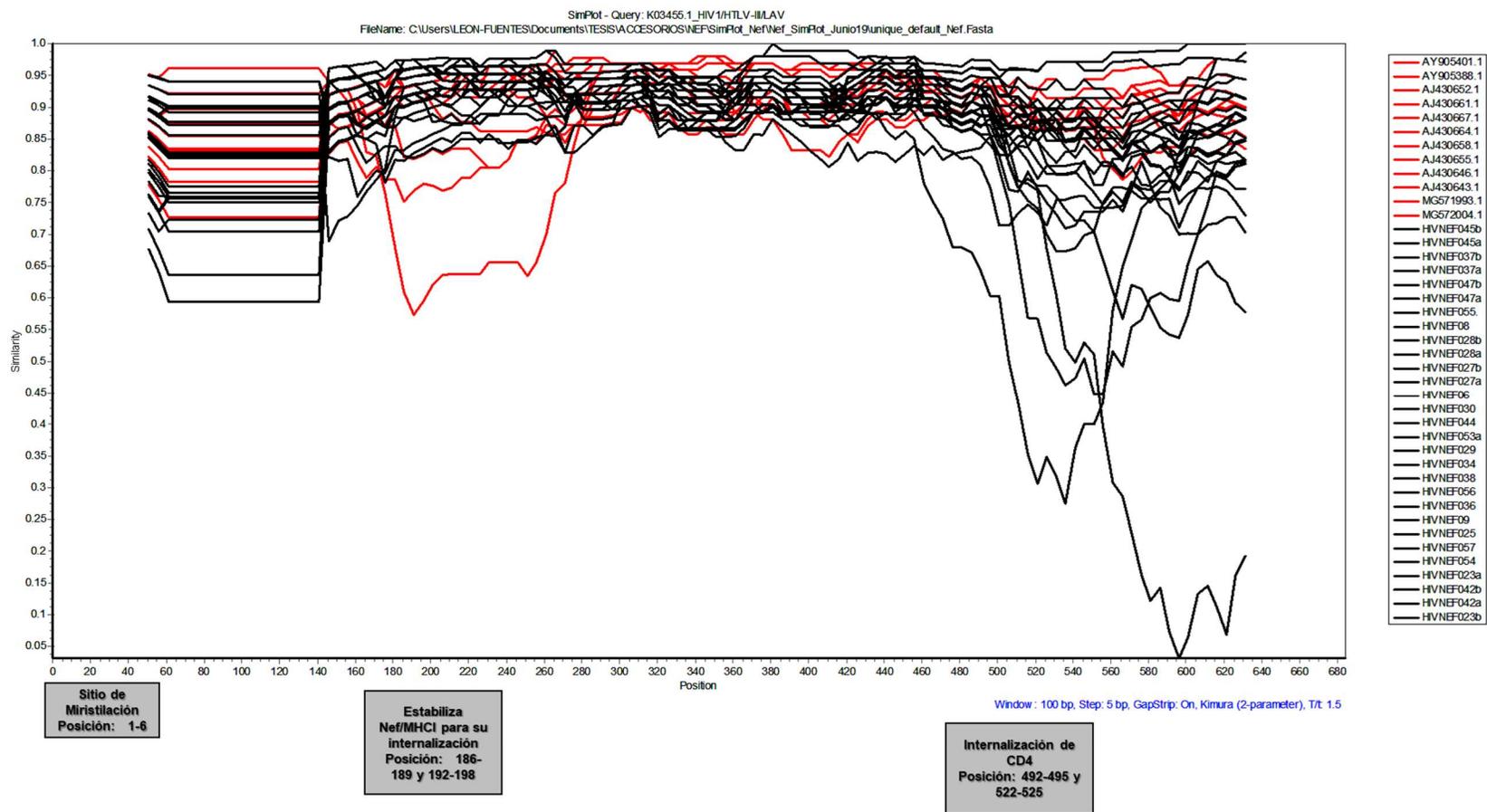
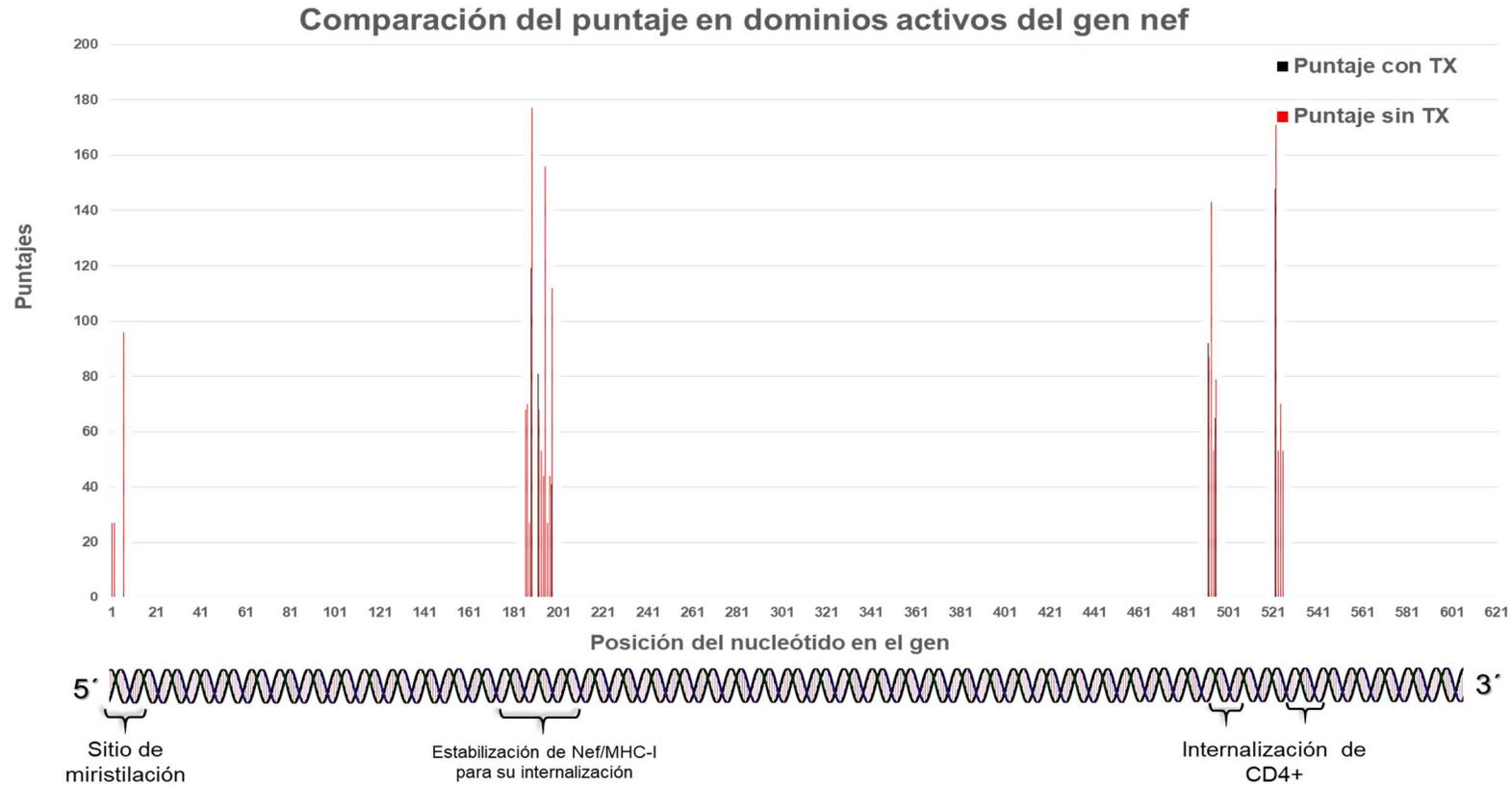


Figura 33. Análisis comparativo de las secuencias del gen *nef* de los pacientes sin tratamiento. En el eje de las abscisas se grafica la región del gen en pares de bases y en el eje de las ordenadas el grado de similitud (de 0 a 1), calculados con la técnica de Kimura (2-parámetros), tomando como secuencia de referencia a HXB2 (K.03455.1).

Análisis del polimorfismo de los dominios funcionales de *nef*

En el análisis estadístico del polimorfismo de cada uno de los dominios funcionales del gen *nef*, en los dos grupos de secuencias (**Tabla 13**), se examinó el comportamiento de los datos obtenidos con el programa *Analyze Sequence Variation* (SNP). No se encontró ninguna mutación en el dominio de miristilación en las secuencias de los pacientes que reciben tratamiento, en contraste, en las secuencias de los pacientes sin tratamiento, sí se encontraron mutaciones con un puntaje promedio de 25, lo que sugiere que existe una diferencia significativa. En los demás dominios funcionales no se encontró una diferencia estadísticamente significativa en el sitio de estabilización de la unión de *nef* con MHCI y de la internalización del receptor membranal CD4.



Gráfica 9. Puntajes obtenidos en cada posición del gen *nef*, de las secuencias de pacientes con y sin tratamiento analizados con el programa Analyze Sequence Variation (SNP) hospedado en la página Virus Pathogen Database and Analysis Resource (ViPR) (Pickett et al., 2012) a través de la página electrónica <http://www.viprbrc.org>. Se grafican únicamente los dominios funcionales del gen.

Tabla 11. Resumen estadístico del polimorfismo de los dominios funcionales del gen *nef* de secuencias de pacientes sin y con tratamiento (GenBank). Análisis realizado con Statgraphics v.15.2.05

Puntaje de los dominios funcionales de la secuencia del gen <i>nef</i> del VIH-1										
	Miristilacion		Estabilización de Nef/MHCI				Internalización de CD4			
	<i>Con Tx</i>	<i>Sin Tx</i>	<i>Con Tx</i>	<i>Sin Tx</i>	<i>Con Tx</i>	<i>Sin Tx</i>	<i>Con Tx</i>	<i>Sin Tx</i>	<i>Con Tx</i>	<i>Sin Tx</i>
Recuento	6	6	4	4	7	7	4	4	4	4
Promedio	0	25	29.75	85.5	34.4286	72	39.25	90.5	37	86.75
Desviación Estándar	0	37.2129	59.5	64.1379	48.4866	45.873	46.6431	37.8902	74	56.7355
Mínimo	0	0	0	27	119	156	0	53	0	53
Máximo	0	96	119	177	119	129	92	143	148	171
Sesgo Estandarizado	ND	1.81081	1.63299	1.14868	1.20043	1.34393	0.230228	0.904639	1.63299	1.53924
Curtosis Estandarizada	ND	1.72685	1.63299	1.07941	-0.11278	0.373746	-1.79415	0.821645	1.63299	1.45683
Distribución (Estadístico W)	ND	No-Normal	No-Normal	Normal	No-Normal	Normal	Normal	Normal	No-Normal	Normal
Prueba <i>t</i> para comparar medias	ND		P = 0.249626 No existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias		P = 0.162226 No hay diferencia significativa entre las medias		P = 0.138948 No existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias		P = 0.326985 No existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias	
Prueba- <i>F</i> para comparar Desviaciones Estándar	ND		P = 0.904712 No existe diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar		P = 0.896425 No hay diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar		P = 0.740967 No existe diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar		P = 0.673241 No existe un diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar	
	ND = No Determinado									

Análisis general de los seis genes accesorios y reguladores del VIH

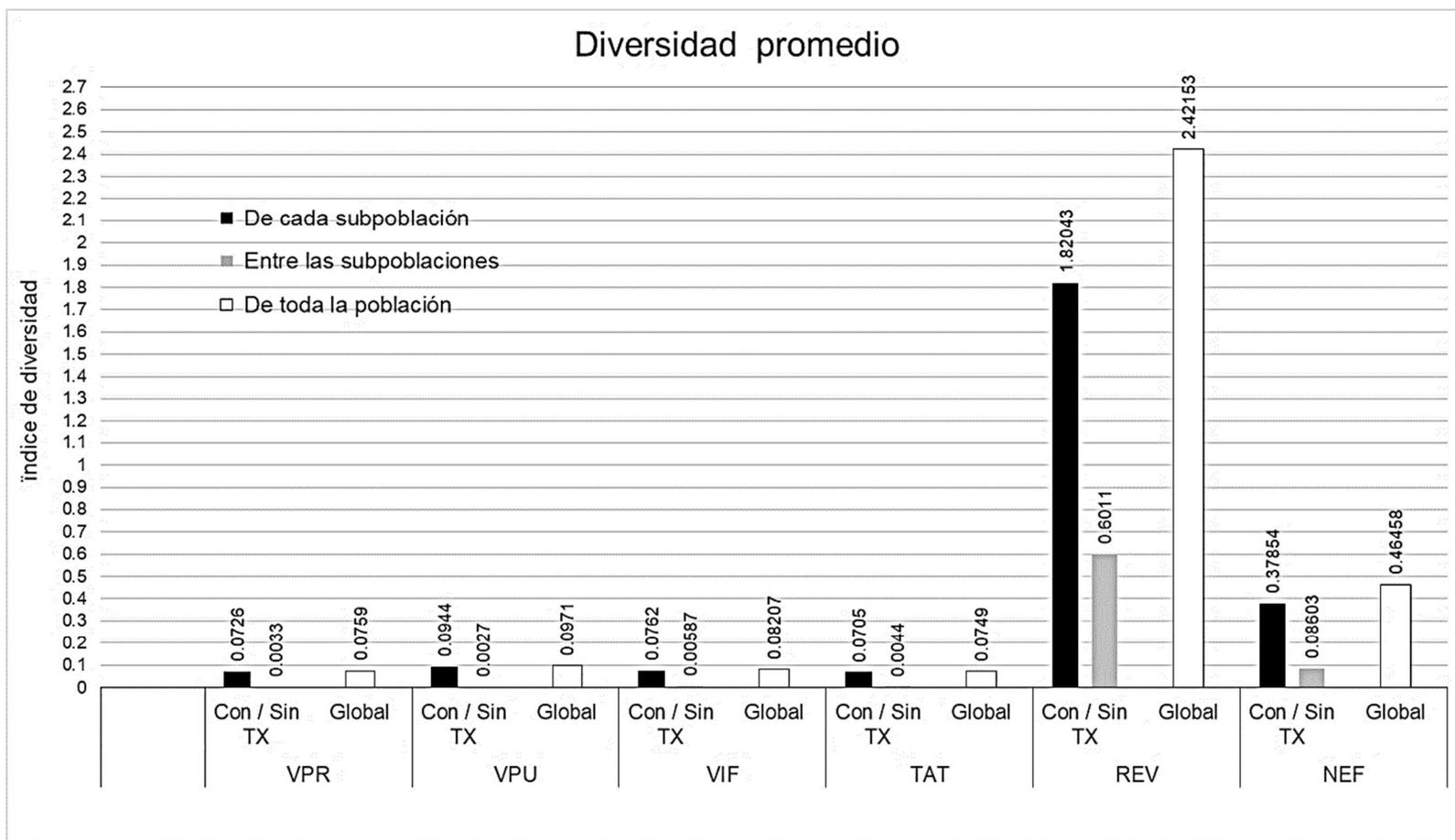
Se calculó la **diversidad promedio** (Coeficiente de Diferenciación de Nucleótidos) en tres grupos: i) dentro de cada subpoblación (intrapoblacional), ii) entre subpoblaciones (interpoblacional) y iii) en el total de la población, según la técnica de Masatoshi Nei y Kumar, 2000, dentro, entre y de toda la población de ambos grupos (**Tabla 14**). Para calcular la **distancia promedio** intra-poblacional, entre ambas subpoblaciones y el promedio total o global se utilizó el método de Kimura 2-parámetros. Donde el gen **rev** fue el que presentó la mayor diversidad y distancia promedio de los seis genes estudiados, resultados que concuerdan con lo expuesto en el análisis filogenético y genómico.

En el **promedio global de la diversidad**, el gen **rev** presentó el valor mayor de distancia de ambos grupos de pacientes; **nef** fue el segundo, **vpu** el tercero y con un valor muy cercano, **vpr** y **vif**. El gen que presentó una distancia global menor fue **tat** (**Gráfica 10**).

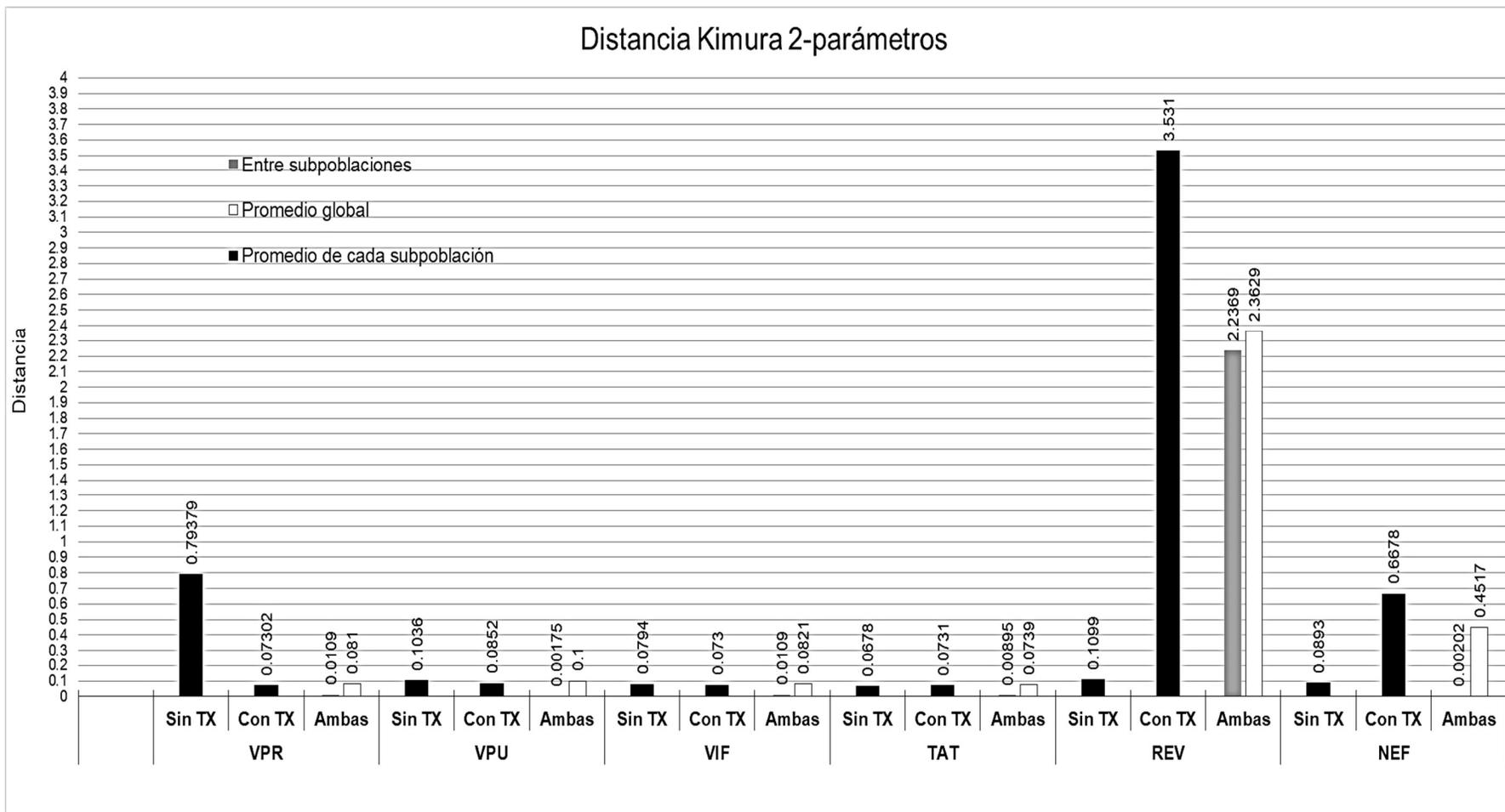
La **distancia global** en orden descendente fue **rev** en primer lugar, seguida por el gen **nef** y **vpu**; **vif**, **vpr** y **tat** fue el gen de menor distancia entre cada grupo (inter e intra-poblacional) (**Gráfica 11**).

Tabla 12. Estimaciones del promedio de diversidad y distancia evolutiva sobre todos los pares de secuencias de pacientes con y sin tratamiento. Se realizó el cálculo de la diversidad promedio dentro, entre y de toda la población de las secuencias de los genes accesorios y reguladores del VIH (Masatoshi Nei y Kumar, 2000), así como el de la distancia, siguiendo el modelo de Kimura 2-parámetros, dentro del programa MEGA X (S. Kumar et al., 2018)

		n	DISTANCIA		Promedio global	DIVERSIDAD PROMEDIO		
			Promedio dentro de las subpoblaciones	Total entre subpoblaciones Sin TX		Dentro de las subpoblaciones	Entre las subpoblaciones	De toda la población
VPR	Sin TX	24	0.79379	NA	0.081	0.0726	0.0033	0.0759
	Con TX	13	0.07302	0.0109				
VPU	Sin TX	24	0.1036	NA	0.1	0.0944	0.0027	0.0971
	Con TX	16	0.0852	0.00175				
VIF	Sin TX	24	0.0794	NA	0.0821	0.0762	0.00587	0.08207
	Con TX	18	0.073	0.0109				
TAT	Sin TX	21	0.0678	NA	0.0739	0.0705	0.0044	0.0749
	Con TX	18	0.0731	0.00895				
REV	Sin TX	21	0.1099	NA	2.3629	1.82043	0.6011	2.42153
	Con TX	11	3.531	2.2369				
NEF	Sin TX	22	0.0893	NA	0.4517	0.37854	0.08603	0.46458
	Con TX	12	0.6678	0.00202				
			NA=No Aplica					



Gráfica 10. Estimaciones del promedio de diversidad de los genes accesorios y reguladores del VIH sobre los pares de secuencias de pacientes con y sin tratamiento. El cálculo de la diversidad promedio dentro de cada población, entre cada población y de toda la población de las secuencias de cada gen se calculó según (Masatoshi Nei y Kumar, 2000), dentro del programa MEGA X (S. Kumar et al., 2018).



Gráfica 11. Estimaciones del promedio de la distancia evolutiva de los genes accesorios y reguladores del VIH sobre todos los pares de secuencias de pacientes con y sin tratamiento. El cálculo de la distancia promedio dentro de cada población, entre cada población y de toda la población de las secuencias de cada gen se calculó siguiendo el modelo de Kimura 2-parámetros, dentro del programa MEGA X (S. Kumar et al., 2018)

Tabla 13. Resumen de los promedios de los puntajes de polimorfismo para cada sitio funcional de los genes accesorios y reguladores del VIH en muestras de pacientes con y sin tratamiento (TX).

Comparación de los promedios de los puntaje del polimorfismo obtenidos de los dominios funcionales de cada gen				
	Con TX		Sin TX	Función
NEF	0	<	25	Miristilacion
	29.75	<	85.5	Estabilización de Nef/MHCI
	34.4286	<	72	
	39.25	<	90.5	Internalización de CD4
	37	<	86.75	
REV	98.68	>	41.12	Homo-multimerización
	54.62	>	21.48	Sitio de unión al RNA
	58.5	>	10.2941	Exportación Nuclear
TAT	19.2014	<	20.6111	Transactivación
	12.48	<	14.8	Localización nuclear, unión al RNA
VIF	3	<	6.5	Sitio de unión a APOBEC3F
	0	<	21.615	Sitio de unión a APOBEC3G
	15.4	<	32.85	Sitio de unión a APOBEC3G y 3F
	11.9375	<	15.62	Sitio de inhibición de APOBEC3F
	20.33	<	30.05	Unión al RNA
	0	<	43.9	Multimerización
VPR	19.1825	<	35.9365	Homo-oligomerización
	0	=	0	Q65, interacción con DCAF1 para el arresto en G2
VPU	35.0115	<	45.5287	Dominio transmembranal
	21.522	<	43.3459	Inhibición de CD4
	0	<	22	Fosforilación de S52
	23.3333	<	57	Fosforilación de S56
				Significancia estadística (Prueba de Wilconxon)
				Mayor polimorfismo

Discusión

Desde el descubrimiento del VIH (Barré-Sinoussi y col. , 1983), la naturaleza de este virus ha sido estudiada desde muchos de los ángulos que puedan incidir en la prevención, tratamiento o una potencial cura para esta enfermedad. Una de las principales características que presenta el VIH es la gran diversidad en su genoma, que tiene como consecuencia, el evadir al sistema inmune y generar resistencia al tratamiento antirretroviral. Los resultados de este trabajo proporcionan información sobre la diversidad en los genes accesorios y reguladores del VIH en los pacientes que reciben o no tratamiento farmacológico.

En los análisis iniciales de estos grupos de pacientes, los niveles de los de carga viral (CV), carga proviral (CPV) y el conteo de linfocitos T CD4+, concuerdan con lo reportado por otros estudios (Piliero, 2003; Romeu y col. , 1998; Ruiz y col. , 1996). Se observó una restitución del conteo de linfocitos T CD4+, cargas virales abatidas y baja cantidad de provirus, mientras que el grupo de pacientes sin tratamiento y con falla a éste, mostraron parámetros contrarios.

La falla al tratamiento antirretroviral es un fenómeno multifactorial que tiene como principal característica, la detección del virus circulante (V. Miller y col. , 2000), donde existen subpoblaciones virales diversas con la capacidad de evadir al sistema inmune y al efecto de los antirretrovirales. La diversidad en los genes accesorios y reguladores del VIH se observó en una mayor proporción en los pacientes sin tratamiento, comparados con los pacientes con tratamiento. Esta gran diversidad genómica es donde actúan distintas fuerzas selectivas (Lemey, 2009) que le dan al virus una ventaja evolutiva sobre su hospedero, en el cual se manifiestan a lo largo del tiempo, signos y síntomas definitorios del Síndrome de Inmunodeficiencia Humana (SIDA).

La nula amplificación de los genes accesorios y reguladores en el grupo de pacientes con tratamiento y con falla a este, fue debido a dos características que presenta el virus: i) la mayor parte del genoma viral es “defectuoso”, en el grupo de pacientes con tratamiento

(Imamichi y col. , 2020; Michael y col. , 1995; Pollack y col. , 2017) y ii) la carga proviral en linfocitos T CD4+; fue menor que en el grupo de pacientes sin tratamiento, lo que podría explicar los intentos fallidos de amplificación de los genes de interés.

En este trabajo se realizó el proceso de amplificación y secuenciación del provirus a partir de un promedio de 919 copias provirales por cada 76,000 genomas celulares analizados, únicamente en las muestras de los pacientes sin tratamiento. Aún no existen modelos experimentales y/o estadísticos que nos permitan conocer la relación existente entre la CPV y la probabilidad de amplificación y secuenciación de parte o todo el genoma del provirus existente en el reservorio. Esa información podría ser de utilidad para la investigación clínica y evolutiva de los virus que tienen la capacidad de integrarse al genoma de su célula hospedera.

Debido a la nula amplificación y secuenciación de los genomas provirales en los pacientes con tratamiento (con y sin falla), como una alternativa metodológica, se utilizaron secuencias de pacientes con tratamiento, reportadas en la base de datos del *GenBank* (D. A. Benson y col. , 2013), con el fin de realizar el análisis comparativo que fue dirigido principalmente a las regiones funcionales de cada gen, las cuales son indispensables en el ciclo de patogénesis viral.

La diversidad observada en las secuencias de los pacientes sin tratamiento es muy similar a lo que se ha encontrado en los virus circulantes (Rossenkhan y col. , 2012; Shankarappa y col. , 1999), con excepción del gen *rev*. En cambio, las secuencias de los pacientes con tratamiento (GenBank), presentan una diversidad menor en relación con el grupo de pacientes sin tratamiento, lo que concuerda con lo descrito en otros estudios (van Zyl y col. , 2018).

El tratamiento es el principal factor para que la diversidad del virus se vea afectada, con una tendencia a disminuir (Kearney y col. , 2014; Maldarelli y col. , 2007; Palmer y col. , 2008; Perelson y col. , 1997). Esto se debe a que la diversidad viral disminuye en la medida que el tratamiento tiene un efecto en la capacidad de replicación del virus (*fitness viral*), por lo que la clonación es el principal medio de propagación (Simonetti y col. , 2016). Una deducción lógica de la disminución de la diversidad es el funcionamiento nulo de las dos

proteínas principales responsables de esta heterogeneidad: la retrotranscriptasa (RT) y la enzima de edición del ARN mensajero: apolipoproteína B (APOBEC), lo cual confirmamos con los resultados obtenidos, en donde ponemos en evidencia la existencia de un mayor polimorfismo genético en los provirus de los pacientes sin tratamiento.

En este trabajo se utilizó una cohorte transversal de muestras de pacientes, a diferencia de otros trabajos en donde se realizan seguimientos longitudinales (Alcala y Vuilleumier, 2014; Pérez-Losada y col. , 2017; van Zyl y col. , 2018). El análisis transversal nos muestra solamente una “fotografía” o visión instantánea de las características genómicas de las cepas circulantes en el momento de la recolección de las muestras.

La variabilidad genómica de los virus es muy diferente a la de otros microorganismos, ya que se observan mutaciones significativas a lo largo de su genoma, sin afectar gravemente la función de cada proteína (Sanjuán y Domingo-Calap, 2021). Esto sucede con los genes accesorios y reguladores del VIH analizados en este trabajo como se observa en las gráficas de similitud (*SimPlot*), en donde la diversidad en los 6 genes estudiados se distribuye a lo largo de todo el gen. Esta diversificación nos llevó a analizar el polimorfismo de los dominios funcionales de cada gen, en donde encontramos una diversidad mayor en donde la diferencia es estadísticamente significativa (Tabla 15), lo que concuerda con otros trabajos publicados (Rossenkhan y col. , 2012; Shankarappa y col. , 1999). Los hallazgos que reportamos en este trabajo, tienen como excepción al gen *rev*, sin embargo, es necesario dilucidar como la presión selectiva del tratamiento antirretroviral para el VIH incide en la diversificación del gen *rev* y así, conocer cómo y con cual tratamiento farmacológico se incide más en esta diversificación y que implicaciones clínicas tendría.

Hasta el momento, no se han reportado investigaciones que nos expongan las diferencias genómicas como las propuestas en este trabajo, debido a esto, no podemos comparar nuestros resultados con lo que se ha publicado en este tema. Por lo que consideramos que este tipo de estudios pueden expandirse y modificarse para diferentes poblaciones y condiciones experimentales y epidemiológicas, de tal forma que nos permita obtener una información más precisa del impacto selectivo que tiene el tratamiento farmacológico en los genes accesorios y reguladores del VIH.

Conclusiones

La diversidad genómica de los virus, es impulsada por las mutaciones, fenómenos biológicos que son utilizados por la selección natural, así como la deriva génica y que da como consecuencia la evolución viral como un fenómeno de propagación de la especie en un ambiente muy complejo, donde el sistema inmune y el tratamiento farmacológico tienen un papel preponderante en la genómica viral de pacientes con y sin tratamiento.

En el caso del VIH, existen variantes de análisis que aún faltan por explorar, como es el análisis genómico de los provirus de pacientes sin y con tratamiento.

Este trabajo, aporta información útil de los genes accesorios y reguladores del VIH para la comprensión sobre su diversidad, en pacientes mexicanos que no habían recibido tratamiento al momento de la toma de muestra sanguínea y en pacientes de otros países que recibieron tratamiento antirretroviral.

Las herramientas experimentales a nuestro alcance, nos dieron una información genómica del virus que permitió comprobar la hipótesis planteada en este trabajo y poder concluir que los genes accesorios y reguladores del provirus del VIH en pacientes mexicanos sin tratamiento, son comparativamente más diversos comparada con los de los pacientes tratados.

Una consecuencia lógica de la comprobación de esta hipótesis, es el papel preponderante y decisivo que tiene el TARGA en la disminución del tamaño del reservorio, medido como CPV, y en la disminución de la diversidad de los genes accesorios y reguladores del VIH.

Una excepción a la hipótesis planteada, fue el gen **rev** de los pacientes con tratamiento, que presentó una mayor diversidad, distancia y polimorfismo que los pacientes sin tratamiento. Sin embargo, este resultado hay que tomarlo con reserva, ya que es indispensable realizar más trabajos que lo corroboren. Esta variabilidad no influye de forma evidente en las características clínicas (CV, CPV y CD4+) de pacientes, debido a que se comportan conforme a lo esperado en pacientes que reciben tratamiento antirretroviral.

Aunque la variabilidad de los genes accesorios y reguladores del VIH en pacientes sin tratamiento es mayor, la diversidad, en las regiones genómicas de los dominios funcionales de cada gen, no influyó en la propagación del virus. Esto se corroboró al cuantificar la carga viral circulante y no se obtuvo un resultado diferente al esperado.

Hasta el momento de la escritura de este trabajo, no se encontró ninguna publicación relacionada con el enfoque del análisis genómico de los genes accesorios y reguladores del VIH que se realizó en esta tesis.

Perspectivas

Se considera que la ampliación de este trabajo con cohortes longitudinales de pacientes con diferentes características clínicas, nos permitirá realizar un análisis evolutivo más preciso con respecto al tiempo desde el primer día de inicio del TARGA. Los diferentes escenarios biológicos y clínicos de los pacientes como son la falla al tratamiento por diferentes causas, cambio del tipo de esquema de tratamiento o suspensión del tratamiento, nos permitirían observar polimorfismos genómicos que expliquen un posible patrón de comportamiento y de esta manera se podría tener un modelo de predicción biológica, evolutiva y clínica del VIH y que a su vez se pueda aplicar a otros virus de RNA que incorporen su material genético al núcleo de su célula hospedera.

Para lograr lo anterior se necesitaría la aplicación de nuevas técnicas moleculares, tales como la secuenciación profunda, la clonación *in vitro*, la propagación de cepas virales aisladas y modelos celulares de infección, para dilucidar sobre las posibles vías de evolución viral *in vitro* e *in vivo*. El uso de herramientas informáticas (software y hardware) con suficiente potencia para el análisis de una gran cantidad de datos que *per se* son obtenidos en los estudios genómicos, evolutivos y epidemiológicos, sería de gran utilidad.

Glosario

Analyze Sequence Variation (SNP) El SNP es un algoritmo de computación (<https://www.viprbrc.org/brc/snpAnalysis.spg?method=ShowCleanInputPage&decorator=hepe>) que se utiliza para analizar el polimorfismo en secuencias de nucleótidos o aminoácidos, así como calcular la secuencia consenso. El puntaje obtenido en cada posición de la secuencia de nucleótidos se calcula con base en la ecuación: $S = -100 * \sum (P_i * \log_2 P_i)$ donde P_i es la n ésima frecuencia de cada nucleótido (Crooks y col. , 2004). S (score) tiene un rango que va desde 0 el cual es la carencia de polimorfismo y 232 que es el máximo polimorfismo posible.

Confórmero [conformacional+isómero] (Def. bioquímica) Estado particular de plegamiento o conformación de una proteína. Las proteínas presentan de forma intrínseca “desordenes” estructurales, que se incrementan en la medida que también se incrementa la complejidad del organismo. Muchas de las proteínas virales muestran un desorden parcial o completo, lo que les da cierta ventaja conformacional y con ello se favorece la interacción con un mayor número de biomoléculas que las proteínas con una conformación rígida. Las proteínas que codifica el genoma del VIH, presentan un desorden intrínseco, tal es el caso de **tat** que es una proteína predominantemente no estructurada (Ali y col. , 2021; dictionary, 2021).

CyP A. (*Cyclophilin A*) proteína implicada en el doblamiento y/o transporte intracelular de proteínas. Para evitar una infección aguda por el VIH, se ha demostrado que el medicamento ciclosporina A (CsA) que se une a CyP-A y tiene una potente actividad inmunosupresora que inhibe competitivamente la unión de CyP-A a la cápside (CA) y con ello, se bloquean las primeras etapas de la infección por VIH, antes o durante el proceso de reverso-transcripción del RNA viral. Una posible explicación es que CyP-A promueve la desestabilización de la nucleocápside viral. Una hipótesis alternativa es que CyP-A, puede inhibir estéricamente las interacciones dentro de la red hexamérica que forma la nucleocápside (Fassati, 2012).

CPSF6 (Factor de especificidad de escisión y poliadenilación 6). La integración del VIH se ve favorecida en genes activos y regiones cromosómicas enriquecidas de la célula hospedera, maximizando así la probabilidad de expresión del provirus inmediatamente después de la integración. Esto requiere del CPSF6, una proteína celular involucrada en el procesamiento final del pre-ARNm 3' que se une a la cápside del VIH-1 y conecta a los complejos de preintegración del VIH-1 con las vías de tráfico intranuclear que vinculan la integración con la cromatina transcripcionalmente activa. Se ha descrito que durante la replicación del VIH, la interacción de la cápside con CPSF6 mejora la entrada al núcleo y potencia la integración del VIH. La importancia de la unión a la cápside con CPSF6 y la importación nuclear de CPSF6 que es mediada por TNPO3 (Transportina 3), que son las responsables de retener la unión de la cápside, radica en su desacoplamiento que conduce

al desvanecimiento de la nucleocápside viral dando lugar a una transcripción inversa defectuosa y por ende a una infección abortiva (Rasheedi y col. , 2016).

Distancia genómica. Cuando dos secuencias de ADN provienen de una misma secuencia ancestral, las secuencias de los descendientes gradualmente divergen debido a la sustitución de los nucleótidos. Esta distancia se puede cuantificar por diferentes métodos de sustitución de nucleótidos (p.ej. Jukes-Cantor, Kimura, Tamura-Nei, etc.) (Masatoshi Nei y Kumar, 2000)

Diversidad Promedio. Promedio de la diferencia de nucleótidos por sitio entre las secuencias (M. Nei y Li, 1979).

Epistasis. Cualquier forma de interacción entre genes (Whitlock y col. , 1995).

ESCRT (*Endosomal Sorting Complex Required to Transport*). Complejo endosomal ordenado requerido para el transporte. Este complejo proteico es secuestrado durante la salida del VIH en la superficie de la célula infectada, catalizando la escisión de la membrana celular y viral (Ahmed y col. , 2019).

Falla al TARGA. Debido a que el criterio de inclusión para un paciente con falla al TARGA es con una CV detectable, se considera que el tiempo en falla es el que tiene el paciente para presentarse a su consulta, que por protocolo es cada seis meses.

Filogenia. El propósito de la reconstrucción filogenética es tratar de inferir las relaciones de parentesco o de ancestría-descendencia de un conjunto de datos representativos de entidades biológicas. Estos datos representativos pueden ser secuencias de nucleótidos o aminoácidos (Eguiarte, 2007).

ICAM-1 La molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) es una glicoproteína que participa en las respuestas inflamatorias e inmunitarias. La glicoproteína celular ICAM-1 unida al VIH es biológicamente activa y funcional, por lo que puede mediar la captura y transmisión eficiente del VIH a las células de destino que expresan e interactúan con la proteína LFA-1. Esta interacción promueve la unión y la entrada en las células del VIH, lo que resulta en un aumento significativo en la infectividad del virus (Yu y col. , 2020).

Integrinas Las integrinas son una superfamilia de receptores de adherencia celular que desempeñan un papel central en la biología de los metazoos, controlando la adhesión celular a la matriz extracelular, la migración celular, el crecimiento, la diferenciación y la apoptosis. Las integrinas son un ejemplo de receptores fisiológicamente importantes que han sido utilizados por los virus para la atracción y / o la entrada a su célula blanco, incluido el VIH; mediante la interacción con la proteína gp120. La integrina $\alpha 4\beta 7$ del receptor intestinal (*gut-homing*) puede servir a su vez como receptor y molécula de señalización para el VIH. La afinidad específica de la gp120 para la $\alpha 4\beta 7$ proporciona un mecanismo para el virus que utiliza para elegir como blanco a la célula activada y que es crítica para la

propagación eficiente y la diseminación del virus después de una transmisión sexual (Ballana y Esté, 2014)

MX2 (*Myxovirus Resistencia 2*) es un inhibidor de la infección por VIH inducido por el interferón. MX2 inhibe la importación nuclear del VIH, o desestabiliza el ADN del VIH nuclear. MX2 es un efector de la actividad anti-VIH del IFN-I. Se ha sugerido que MX2 inhibe la infección por VIH al inhibir la importación nuclear de complejos sub-virales dependiente de la cápside (Kane y col. , 2013).

TRIM5 (*The tripartite motif*) reconoce e intercepta a los retrovirus entrantes, al unirse a la nucleocápside viral. Existen modelos que muestran la estabilización directa de la nucleocápside cuando se une a TRIM5 y/o al sistema de reclutamiento dependiente de la ubiquitina de la maquinaria de degradación celular (Ganser-Pornillos y Pornillos, 2019).

Bibliografía:

- Ahmed, I., Akram, Z., Iqbal, H. M. N., y Munn, A. L. (2019). The regulation of Endosomal Sorting Complex Required for Transport and accessory proteins in multivesicular body sorting and enveloped viral budding - An overview. *International Journal of Biological Macromolecules*, 127, 1-11. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.015>, <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813018358380>
- Alcala, N., y Vuilleumier, S. (2014). Turnover and accumulation of genetic diversity across large time-scale cycles of isolation and connection of populations. *Proc Biol Sci*, 281(1794), 20141369. doi:10.1098/rspb.2014.1369,
- Ali, A., Mishra, R., Kaur, H., y Chandra Banerjea, A. (2021). HIV-1 Tat: An update on transcriptional and non-transcriptional functions. *Biochimie*, 190, 24-35. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2021.07.001>, <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300908421001759>
- Ambrosino, C., Palmieri, C., Puca, A., Trimboli, F., Schiavone, M., Olimpico, F., Ruocco, M. R., di Leva, F., Toriello, M., y Quinto, I. (2002). Physical and functional interaction of HIV-1 Tat with E2F-4, a transcriptional regulator of mammalian cell cycle. *Journal of Biological Chemistry*, 277(35), 31448-31458.
- Aravind, L., y Koonin, E. V. (1998). The HD domain defines a new superfamily of metal-dependent phosphohydrolases. *Trends in Biochemical Sciences*, 23(12), 469-472. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0968-0004\(98\)01293-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0968-0004(98)01293-6), <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968000498012936>

- Arora, S., Verma, S., y Banerjea, A. C. (2014). HIV-1 Vpr redirects host ubiquitination pathway. *J Virol*, 88(16), 9141-9152. doi:10.1128/jvi.00619-14,
- Arts, E. J., y Hazuda, D. J. (2012). HIV-1 Antiretroviral Drug Therapy. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(4), a007161. doi:10.1101/cshperspect.a007161, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3312400/>
- Bailey, J., Blankson, J. N., Wind-Rotolo, M., y Siliciano, R. F. (2004). Mechanisms of HIV-1 escape from immune responses and antiretroviral drugs. *Current Opinion in Immunology*, 16(4), 470-476. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.coi.2004.05.005>, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0952791504000743>
- Ballana, E., y Esté, J. A. (2014). Integrin Alpha4beta7. In T. J. Hope, M. Stevenson, y D. Richman (Eds.), *Encyclopedia of AIDS* (pp. 1-8). New York, NY: Springer New York.
- Barré-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vézinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., y Montagnier, L. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, 220(4599), 868-871. doi:10.1126/science.6189183,
- Basmaciogullari, S., y Pizzato, M. (2014). The activity of Nef on HIV-1 infectivity. *Frontiers in Microbiology*, 5(232). doi:10.3389/fmicb.2014.00232, <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2014.00232>
- Bbosa, N., Kaleebu, P., y Ssemwanga, D. (2019). HIV subtype diversity worldwide. *Curr Opin HIV AIDS*, 14(3), 153-160. doi:10.1097/coh.0000000000000534, https://journals.lww.com/co-hivandaids/Fulltext/2019/05000/HIV_subtype_diversity_worldwide.3.aspx
- Becquart, P., Courgnaud, V., Willumsen, J., y Van de Perre, P. (2007). Diversity of HIV-1 RNA and DNA in breast milk from HIV-1-infected mothers. *Virology*, 363(2), 256-260. doi:<https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.02.003>, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682207000888>
- Beerenwinkel, N., Daumer, M., Oette, M., Korn, K., Hoffmann, D., Kaiser, R., Lengauer, T., Selbig, J., y Walter, H. (2003). Geno2pheno: Estimating phenotypic drug resistance from HIV-1 genotypes. *Nucleic Acids Res*, 31(13), 3850-3855. doi:10.1093/nar/gkg575,
- Benson, D. A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., y Sayers, E. W. (2013). GenBank. *Nucleic Acids Res*, 41(Database issue), D36-42. doi:10.1093/nar/gks1195,
- Benson, R. E., Sanfridson, A., Ottinger, J. S., Doyle, C., y Cullen, B. R. (1993). Downregulation of cell-surface CD4 expression by simian immunodeficiency virus Nef prevents viral super infection. *J Exp Med*, 177(6), 1561-1566. doi:10.1084/jem.177.6.1561,
- Brussel, A., Delelis, O., y Sonigo, P. (2005). Alu-LTR real-time nested PCR assay for quantifying integrated HIV-1 DNA. *Methods Mol Biol*, 304, 139-154. doi:10.1385/1-59259-907-9:139,

- Cáncer, N.-I. N. d. (2021). TARGA Definición. *Diccionario de cáncer*. Retrieved from <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/targa>
- Castilla, J., Del Romero, J., Hernando, V., Marincovich, B., García, S., y Rodríguez, C. (2005). Effectiveness of highly active antiretroviral therapy in reducing heterosexual transmission of HIV. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 40(1), 96-101.
- Ceballos, L. S., Carbajal, S.G, Arellanos, J.Y., Ramírez, L.G., González, C.A., Martínez, G. A. (2021). SISTEMA DE VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE VIH INFORME HISTÓRICO DE VIH 1ER TRIMESTRE 2021. Retrieved from <https://www.gob.mx/censida/documentos/epidemiologia-registro-nacional-de-casos-de-sida>
- Cohn, L. B., Chomont, N., y Deeks, S. G. (2020). The Biology of the HIV-1 Latent Reservoir and Implications for Cure Strategies. *Cell host & microbe*, 27(4), 519-530. doi:10.1016/j.chom.2020.03.014,
- Coiras, M., Lopez-Huertas, M. R., Perez-Olmeda, M., y Alcami, J. (2009). Understanding HIV-1 latency provides clues for the eradication of long-term reservoirs. *Nat Rev Microbiol*, 7(11), 798-812. doi:10.1038/nrmicro2223,
- Crooks, G. E., Hon, G., Chandonia, J.-M., y Brenner, S. E. (2004). WebLogo: A Sequence Logo Generator. *Genome Research*, 14(6), 1188-1190. doi:10.1101/gr.849004, <http://genome.cshlp.org/content/14/6/1188.abstract>
- Cuevas, J. M., Geller, R., Garijo, R., López-Aldeguer, J., y Sanjuán, R. (2015). Extremely High Mutation Rate of HIV-1 In Vivo. *PLOS Biology*, 13(9), e1002251. doi:10.1371/journal.pbio.1002251, <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002251>
- Chen, S., Yang, X., Cheng, W., Ma, Y., Shang, Y., Cao, L., Chen, S., Chen, Y., Wang, M., y Guo, D. (2017). Immune regulator ABIN1 suppresses HIV-1 transcription by negatively regulating the ubiquitination of Tat. *Retrovirology*, 14(1), 12. doi:10.1186/s12977-017-0338-5, <https://doi.org/10.1186/s12977-017-0338-5>
- Chomont, N., El-Far, M., Ancuta, P., Trautmann, L., Procopio, F. A., Yassine-Diab, B., Boucher, G., Boulassel, M.-R., Ghattas, G., y Brenchley, J. M. (2009). HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nat Med*, 15(8), 893-900.
- Chun, T.-W., Carruth, L., Finzi, D., y Shen, X. (1997). Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature*, 387(6629), 183.
- Chun, T.-W., Engel, D., Berrey, M. M., Shea, T., Corey, L., y Fauci, A. S. (1998). Early establishment of a pool of latently infected, resting CD4(+) T cells during primary HIV-1 infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(15), 8869-8873. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC21169/>
- Dampier, W., Nonnemacher, M. R., Mell, J., Earl, J., Ehrlich, G. D., Pirrone, V., Aiamkitsumrit, B., Zhong, W., Kercher, K., Passic, S., Williams, J. W., Jacobson, J. M., y Wigdahl, B.

- (2016). HIV-1 Genetic Variation Resulting in the Development of New Quasispecies Continues to Be Encountered in the Peripheral Blood of Well-Suppressed Patients. *PLoS One*, 11(5), e0155382. doi:10.1371/journal.pone.0155382,
- Davey, N. E., Satagopam, V. P., Santiago-Mozos, S., Villacorta-Martin, C., Bharat, T. A. M., Schneider, R., y Briggs, J. A. G. (2014). The HIV mutation browser: a resource for human immunodeficiency virus mutagenesis and polymorphism data. *PLoS computational biology*, 10(12), e1003951-e1003951. doi:10.1371/journal.pcbi.1003951, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25474213> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4256008/>
- de Azevedo, S. S. D., Caetano, D. G., Cortes, F. H., Teixeira, S. L. M., Dos Santos Silva, K., Hoagland, B., Grinsztejn, B., Veloso, V. G., Morgado, M. G., y Bello, G. (2017). Highly divergent patterns of genetic diversity and evolution in proviral quasispecies from HIV controllers. *Retrovirology*, 14(1), 29. doi:10.1186/s12977-017-0354-5,
- dictionary, W. T. f. (2021, Nov, 19, 2020). conformer. Retrieved from <http://en.wiktionary.org/wiki/conformer>
- Domingo, E., Sheldon, J., y Perales, C. (2012). Viral quasispecies evolution. *Microbiol Mol Biol Rev*, 76(2), 159-216. doi:10.1128/mmb.05023-11,
- Donahue, D. A., Amraoui, S., di Nunzio, F., Kieffer, C., Porrot, F., Opp, S., Diaz-Griffero, F., Casartelli, N., y Schwartz, O. (2016). SUN2 Overexpression Deforms Nuclear Shape and Inhibits HIV. *J Virol*, 90(8), 4199-4214. doi:10.1128/jvi.03202-15,
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res*, 32(5), 1792-1797. doi:10.1093/nar/gkh340,
- Eguiarte, L. E. (2007). *Ecología molecular*: Instituto Nacional de Ecología.
- Engelman, A., y Cherepanov, P. (2012). The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. *Nature Reviews Microbiology*, 10(4), 279-290.
- Fackler, O. T., Kienzle, N., Kremmer, E., Boese, A., Schramm, B., Klimkait, T., Kucherer, C., y Mueller-Lantzsch, N. (1997). Association of human immunodeficiency virus Nef protein with actin is myristoylation dependent and influences its subcellular localization. *Eur J Biochem*, 247(3), 843-851. doi:10.1111/j.1432-1033.1997.00843.x,
- Fassati, A. (2012). Multiple roles of the capsid protein in the early steps of HIV-1 infection. *Virus Research*, 170(1), 15-24. doi:<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.09.012>, <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168170212003656>
- Finzi, D., Hermankova, M., Pierson, T., Carruth, L. M., Buck, C., y Chaisson, R. E. (1997). Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science*, 278. doi:10.1126/science.278.5341.1295, <https://doi.org/10.1126/science.278.5341.1295>
- Fisher, A., Ensoli, B., Ivanoff, L., Chamberlain, M., Petteway, S., Ratner, L., Gallo, R., y Wong-Staal, F. (1987). The sor gene of HIV-1 is required for efficient virus transmission in vitro. *Science*, 237(4817), 888-893. doi:10.1126/science.3497453, <https://science.sciencemag.org/content/sci/237/4817/888.full.pdf>

- Foley, B. T., Korber, B. T. M., Leitner, T. K., Apetrei, C., Hahn, B., Mizrachi, I., Mullins, J., Rambaut, A., y Wolinsky, S. (2018). *HIV Sequence Compendium 2018*. Retrieved from
- Fourati, S., Lambert-Niclot, S., Soulie, C., Wirden, M., Malet, I., Valantin, M. A., Tubiana, R., Simon, A., Katlama, C., Carcelain, G., Calvez, V., y Marcelin, A. G. (2014). Differential impact of APOBEC3-driven mutagenesis on HIV evolution in diverse anatomical compartments. *Aids*, *28*(4), 487-491. doi:10.1097/qad.000000000000182,
- Fourati, S., Malet, I., Binka, M., Boukobza, S., Wirden, M., Sayon, S., Simon, A., Katlama, C., Simon, V., Calvez, V., y Marcelin, A. G. (2010). Partially active HIV-1 Vif alleles facilitate viral escape from specific antiretrovirals. *Aids*, *24*(15), 2313-2321. doi:10.1097/QAD.0b013e32833e515a,
- Gallo, R., Wong-Staal, F., Montagnier, L., Haseltine, W. A., y Yoshida, M. (1988). HIV/HTLV gene nomenclature. *Nature*, *333*(6173), 504. doi:10.1038/333504a0,
- Ganser-Pornillos, B. K., y Pornillos, O. (2019). Restriction of HIV-1 and other retroviruses by TRIM5. *Nature Reviews Microbiology*, *17*(9), 546-556. doi:10.1038/s41579-019-0225-2, <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0225-2>
- Garcia-Minambres, A., Eid, S. G., Mangan, N. E., Pade, C., Lim, S. S., Matthews, A. Y., de Weerd, N. A., Hertzog, P. J., y Mak, J. (2017). Interferon epsilon promotes HIV restriction at multiple steps of viral replication. *Immunol Cell Biol*, *95*(5), 478-483. doi:10.1038/icb.2016.123,
- George, D., y Mallery, P. (2010). *SPSS for Windows step by step. A simple study guide and reference* (10. Baski): Boston, MA: Pearson Education, Inc.
- González, C. G., Ruiz, G.P., Martínez, T.L., Santana, M.P., Ortíz, R.O., Manuel, C.J., Alejandre, V.A. (2021, JUNIO 2021). Personas en Tratamiento Antirretroviral (TAR) - Primer trimestre 2021. *Boletín de Atención Integral de Personas que viven con VIH*, *7*, 25.
- Gonzalez, M. E. (2017). The HIV-1 Vpr Protein: A Multifaceted Target for Therapeutic Intervention. *Int J Mol Sci*, *18*(1). doi:10.3390/ijms18010126,
- González, M. E. (2015). Vpu Protein: The Viroporin Encoded by HIV-1. *Viruses*, *7*(8), 4352-4368. doi:10.3390/v7082824, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26247957>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4576185/>
- Graf, E. H., y O'Doherty, U. (2013). Quantitation of integrated proviral DNA in viral reservoirs. *Curr Opin HIV AIDS*, *8*(2), 100-105. doi:10.1097/COH.0b013e32835d8132,
- Guerra-Palomares, S. E., Hernandez-Sanchez, P. G., Esparza-Perez, M. A., Arguello, J. R., Noyola, D. E., y Garcia-Sepulveda, C. A. (2016). Molecular Characterization of Mexican HIV-1 Vif Sequences. *AIDS Res Hum Retroviruses*, *32*(3), 290-295. doi:10.1089/aid.2015.0290,
- Gulick, R. M. (2004). Causes of HIV treatment failure. In E. D. A. De Clercq y A.-M. I. Vandamme (Eds.), *Combination Therapy of AIDS* (pp. 159-194). Basel: Birkhäuser Basel.

- Gunthard, H. F., Frost, S. D., Leigh-Brown, A. J., Ignacio, C. C., Kee, K., Perelson, A. S., Spina, C. A., Havlir, D. V., Hezareh, M., Looney, D. J., Richman, D. D., y Wong, J. K. (1999). Evolution of envelope sequences of human immunodeficiency virus type 1 in cellular reservoirs in the setting of potent antiviral therapy. *J Virol*, *73*(11), 9404-9412.
- Hasegawa, M., Kishino, H., y Yano, T.-a. (1985). Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J Mol Evol*, *22*(2), 160-174. doi:10.1007/BF02101694, <https://doi.org/10.1007/BF02101694>
- Hasegawa, M., Kishino, H., y Yano, T. (1985). Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J Mol Evol*, *22*(2), 160-174.
- Ho, Y. C., Shan, L., Hosmane, N. N., Wang, J., Laskey, S. B., Rosenbloom, D. I., Lai, J., Blankson, J. N., Siliciano, J. D., y Siliciano, R. F. (2013). Replication-competent noninduced proviruses in the latent reservoir increase barrier to HIV-1 cure. *Cell*, *155*(3), 540-551. doi:10.1016/j.cell.2013.09.020,
- Hong, F., Jacobs, J. L., Aga, E., Cillo, A. R., Fyne, E., Koontz, D. L., Zheng, L., y Mellors, J. W. (2018). Associations between HIV-1 DNA copy number, proviral transcriptional activity, and plasma viremia in individuals off or on suppressive antiretroviral therapy. *Virology*, *521*, 51-57. doi:10.1016/j.virol.2018.05.018,
- Hong, S., Cao, J., y Tu, Y. T. (2009). Evolution of HIV-1 in a patient population failing multiple-drug therapy. *Microbiol Immunol*, *53*(9), 535-539. doi:10.1111/j.1348-0421.2009.00153.x,
- Hope, T. J., Richman, D. D., y Stevenson, M. (2018). *Encyclopedia of AIDS*: Springer Nature Publishing AG.
- Hulo, C., de Castro, E., Masson, P., Bougueleret, L., Bairoch, A., Xenarios, I., y Le Mercier, P. (2011). ViralZone: a knowledge resource to understand virus diversity. *Nucleic Acids Res*, *39*(Database issue), D576-582. doi:10.1093/nar/gkq901, <https://viralzone.expasy.org/4976>
- ICTV, I. C. o. T. o. V. (2020). Retroviridae. *Virus Taxonomy: 2020 Release*. Retrieved from https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/reverse-transcribing-dna-and-rna-viruses-2011/w/rt_viruses/161/retroviridae
- Imamichi, H., Smith, M., Adelsberger, J. W., Izumi, T., Scrimieri, F., Sherman, B. T., Rehm, C. A., Imamichi, T., Pau, A., Catalfamo, M., Fauci, A. S., y Lane, H. C. (2020). Defective HIV-1 proviruses produce viral proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *117*(7), 3704-3710. doi:10.1073/pnas.1917876117,
- Jager, S., Cimermancic, P., Gulbahce, N., Johnson, J. R., McGovern, K. E., Clarke, S. C., Shales, M., Mercenne, G., Pache, L., Li, K., Hernandez, H., Jang, G. M., Roth, S. L., Akiva, E., Marlett, J., Stephens, M., D'Orso, I., Fernandes, J., Fahey, M., Mahon, C., O'Donoghue, A. J., Todorovic, A., Morris, J. H., Maltby, D. A., Alber, T., Cagney, G., Bushman, F. D., Young, J. A., Chanda, S. K., Sundquist, W. I., Kortemme, T., Hernandez, R. D., Craik, C. S., Burlingame, A., Sali, A., Frankel, A. D., y Krogan, N. J. (2011). Global landscape of HIV-human protein complexes. *Nature*, *481*(7381), 365-370. doi:10.1038/nature10719,

- Jager, S., Kim, D. Y., Hultquist, J. F., Shindo, K., LaRue, R. S., Kwon, E., Li, M., Anderson, B. D., Yen, L., Stanley, D., Mahon, C., Kane, J., Franks-Skiba, K., Cimermancic, P., Burlingame, A., Sali, A., Craik, C. S., Harris, R. S., Gross, J. D., y Krogan, N. J. (2011). Vif hijacks CBF-beta to degrade APOBEC3G and promote HIV-1 infection. *Nature*, *481*(7381), 371-375. doi:10.1038/nature10693,
- Jung, A., Maier, R., Vartanian, J. P., Bocharov, G., Jung, V., Fischer, U., Meese, E., Wain-Hobson, S., y Meyerhans, A. (2002). Recombination: Multiply infected spleen cells in HIV patients. *Nature*, *418*(6894), 144. doi:10.1038/418144a,
- Kane, M., Yadav, S. S., Bitzegeio, J., Kutluay, S. B., Zang, T., Wilson, S. J., Schoggins, J. W., Rice, C. M., Yamashita, M., Hatziioannou, T., y Bieniasz, P. D. (2013). MX2 is an interferon-induced inhibitor of HIV-1 infection. *Nature*, *502*(7472), 563-566. doi:10.1038/nature12653, <https://doi.org/10.1038/nature12653>
- Karn, J. (2011). The molecular biology of HIV latency: breaking and restoring the Tat-dependent transcriptional circuit. *Curr Opin HIV AIDS*, *6*(1), 4-11. doi:10.1097/COH.0b013e328340ffbb,
- Kearney, M. F., Spindler, J., Shao, W., Yu, S., Anderson, E. M., O'Shea, A., Rehm, C., Poethke, C., Kovacs, N., Mellors, J. W., Coffin, J. M., y Maldarelli, F. (2014). Lack of detectable HIV-1 molecular evolution during suppressive antiretroviral therapy. *PLoS Pathog*, *10*(3), e1004010. doi:10.1371/journal.ppat.1004010,
- Kepler, T. B., y Perelson, A. S. (1998). Drug concentration heterogeneity facilitates the evolution of drug resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *95*(20), 11514-11519. doi:10.1073/pnas.95.20.11514, <http://www.pnas.org/content/95/20/11514.abstract>
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*, *16*(2), 111-120.
- Kirchhoff, F. (2010). Immune evasion and counteraction of restriction factors by HIV-1 and other primate lentiviruses. *Cell host & microbe*, *8*(1), 55-67. doi:10.1016/j.chom.2010.06.004,
- Klenerman, P., Lechner, F., Kantzanou, M., Ciurea, A., Hengartner, H., y Zinkernagel, R. (2000). Viral escape and the failure of cellular immune responses. *Science*, *289*(5487), 2003.
- Kogan, M., y Rappaport, J. (2011). HIV-1 accessory protein Vpr: relevance in the pathogenesis of HIV and potential for therapeutic intervention. *Retrovirology*, *8*, 25. doi:10.1186/1742-4690-8-25,
- Korber, B., Gaschen, B., Yusim, K., Thakallapally, R., Kesmir, C., y Detours, V. (2001). Evolutionary and immunological implications of contemporary HIV-1 variation. *Br Med Bull*, *58*, 19-42.
- Kumar, A., y Jadhav, C. (2011). Genotypic prediction of resistant mutation in HIV-1 pol gene towards the antiretroviral drugs. *Int J Bioinform Res Appl*, *7*(1), 15-23. doi:10.1504/ijbra.2011.039167,
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., y Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol*, *35*(6), 1547-1549. doi:10.1093/molbev/msy096,

- Laguette, N., Sobhian, B., Casartelli, N., Ringeard, M., Chable-Bessia, C., Segeral, E., Yatim, A., Emiliani, S., Schwartz, O., y Benkirane, M. (2011). SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature*, 474(7353), 654-657. doi:10.1038/nature10117,
- Lahouassa, H., Daddacha, W., Hofmann, H., Ayinde, D., Logue, E. C., Dragin, L., Bloch, N., Maudet, C., Bertrand, M., Gramberg, T., Pancino, G., Priet, S., Canard, B., Laguette, N., Benkirane, M., Transy, C., Landau, N. R., Kim, B., y Margottin-Goguet, F. (2012). SAMHD1 restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 by depleting the intracellular pool of deoxynucleoside triphosphates. *Nat Immunol*, 13(3), 223-228. doi:10.1038/ni.2236,
- Le Rouzic, E., Belaidouni, N., Estrabaud, E., Morel, M., Rain, J. C., Transy, C., y Margottin-Goguet, F. (2007). HIV1 Vpr arrests the cell cycle by recruiting DCAF1/VprBP, a receptor of the Cul4-DDB1 ubiquitin ligase. *Cell Cycle*, 6(2), 182-188. doi:10.4161/cc.6.2.3732,
- Lee, G. Q., Reddy, K., Einkauf, K. B., Gounder, K., Chevalier, J. M., Dong, K. L., Walker, B. D., Yu, X. G., Ndung'u, T., y Lichtenfeld, M. (2019). HIV-1 DNA sequence diversity and evolution during acute subtype C infection. *Nat Commun*, 10(1), 2737. doi:10.1038/s41467-019-10659-2,
- Leitner, T. (2003). HIV Sequence Compendium 2003 <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV.COMPENDIUM>.
- Lemey, P., Salemi, M., Vadamme, A.M. (2009). *The Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing*.
- Li, C., Burdick, R. C., Nagashima, K., Hu, W. S., y Pathak, V. K. (2021). HIV-1 cores retain their integrity until minutes before uncoating in the nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(10). doi:10.1073/pnas.2019467118,
- Liu, T. F., y Shafer, R. W. (2006). Web resources for HIV type 1 genotypic-resistance test interpretation. *Clin Infect Dis*, 42(11), 1608-1618. doi:10.1086/503914,
- Lole, K. S., Bollinger, R. C., Paranjape, R. S., Gadkari, D., Kulkarni, S. S., Novak, N. G., Ingersoll, R., Sheppard, H. W., y Ray, S. C. (1999). Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *J Virol*, 73(1), 152-160.
- Lorenzo-Redondo, R., Fryer, H. R., Bedford, T., Kim, E. Y., Archer, J., Pond, S. L. K., Chung, Y. S., Penugonda, S., Chipman, J., Fletcher, C. V., Schacker, T. W., Malim, M. H., Rambaut, A., Haase, A. T., McLean, A. R., y Wolinsky, S. M. (2016). Persistent HIV-1 replication maintains the tissue reservoir during therapy. *Nature*, 530(7588), 51-56. doi:10.1038/nature16933,
- Macpherson, J. L., Boyd, M. P., Arndt, A. J., Todd, A. V., Fanning, G. C., Ely, J. A., Elliott, F., Knop, A., Raponi, M., Murray, J., Gerlach, W., Sun, L. Q., Penny, R., Symonds, G. P., Carr, A., y Cooper, D. A. (2005). Long-term survival and concomitant gene expression of ribozyme-transduced CD4+ T-lymphocytes in HIV-infected patients. *J Gene Med*, 7(5), 552-564. doi:10.1002/jgm.705,
- Maldarelli, F., Palmer, S., King, M. S., Wiegand, A., Polis, M. A., Mican, J., Kovacs, J. A., Davey, R. T., Rock-Kress, D., Dewar, R., Liu, S., Metcalf, J. A., Rehm, C., Brun, S. C., Hanna, G. J., Kempf, D. J., Coffin, J. M., y Mellors, J. W. (2007). ART suppresses

- plasma HIV-1 RNA to a stable set point predicted by pretherapy viremia. *PLoS Pathog*, 3(4), e46. doi:10.1371/journal.ppat.0030046,
- Martinez, M. A., Cabana, M., Ibanez, A., Clotet, B., Arno, A., y Ruiz, L. (1999). Human immunodeficiency virus type 1 genetic evolution in patients with prolonged suppression of plasma viremia. *Virology*, 256(2), 180-187. doi:10.1006/viro.1999.9601,
- McGee, B., Smith, N., y Aweeka, F. (2006). HIV pharmacology: barriers to the eradication of HIV from the CNS. *HIV Clin Trials*, 7(3), 142-153. doi:10.1310/aw2h-tp5c-np43-k6by,
- Melkova, Z., Shankaran, P., Madlenakova, M., y Bodor, J. (2017). Current views on HIV-1 latency, persistence, and cure. *Folia Microbiol (Praha)*, 62(1), 73-87. doi:10.1007/s12223-016-0474-7,
- Meyerhans, A., Breinig, T., Vartanian, J.-P., y Wain-Hobson, S. (2003). Forms and function of intracellular HIV DNA. *HIV sequence compendium, 2004*, 14.
- Michael, N. L., Chang, G., d'Arcy, L. A., Ehrenberg, P. K., Mariani, R., Busch, M. P., Birx, D. L., y Schwartz, D. H. (1995). Defective accessory genes in a human immunodeficiency virus type 1-infected long-term survivor lacking recoverable virus. *J Virol*, 69(7), 4228-4236. doi:10.1128/JVI.69.7.4228-4236.1995, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7769682>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC189160/>
- Michienzi, A., Castanotto, D., Lee, N., Li, S., Zaia, J. A., y Rossi, J. J. (2003). RNA-mediated inhibition of HIV in a gene therapy setting. *Ann N Y Acad Sci*, 1002, 63-71. doi:10.1196/annals.1281.008,
- Miller, R. H., y Sarver, N. (1997). HIV accessory proteins as therapeutic targets. *Nat Med*, 3(4), 389-394. doi:10.1038/nm0497-389, <https://doi.org/10.1038/nm0497-389>
- Miller, R. L., Ponte, R., Jones, B. R., Kinloch, N. N., Omondi, F. H., Jenabian, M. A., Dupuy, F. P., Fromentin, R., Brassard, P., Mehraj, V., Chomont, N., Poon, A. F. Y., Joy, J. B., Brumme, Z. L., y Routy, J. P. (2019). HIV Diversity and Genetic Compartmentalization in Blood and Testes during Suppressive Antiretroviral Therapy. *J Virol*, 93(17). doi:10.1128/jvi.00755-19,
- Miller, V., Sabin, C., Hertogs, K., Bloor, S., Martinez-Picado, J., D'Aquila, R., Larder, B., Lutz, T., Gute, P., Weidmann, E., Rabenau, H., Phillips, A., y Staszewski, S. (2000). Virological and immunological effects of treatment interruptions in HIV-1 infected patients with treatment failure. *Aids*, 14(18), 2857-2867. doi:10.1097/00002030-200012220-00007,
- Müller, T. G., Zila, V., Peters, K., Schifferdecker, S., Stanic, M., Lucic, B., Laketa, V., Lusic, M., Müller, B., y Kräusslich, H. G. (2021). HIV-1 uncoating by release of viral cDNA from capsid-like structures in the nucleus of infected cells. *Elife*, 10. doi:10.7554/eLife.64776,
- Murphy, E. L., Collier, A. C., Kalish, L. A., y et al. (2001). Highly active antiretroviral therapy decreases mortality and morbidity in patients with advanced hiv disease. *Annals of Internal Medicine*, 135(1), 17-26. doi:10.7326/0003-4819-135-1-200107030-00005, <http://dx.doi.org/10.7326/0003-4819-135-1-200107030-00005>
- Myers G, J. S., Rabson AB and Smith TF, Eds. (1987). A Compilation and Analysis of Nucleic Acid and Amino Acid Sequences. Retrieved from <http://www.hiv.lanl.gov/>.

- Mzingwane, M. L., y Tiemessen, C. T. (2017). Mechanisms of HIV persistence in HIV reservoirs. *Rev Med Virol*, 27(2). doi:10.1002/rmv.1924,
- Nei, M., y Kumar, S. (2000). *Molecular evolution and phylogenetics*: Oxford university press.
- Nei, M., y Li, W. H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(10), 5269-5273. doi:10.1073/pnas.76.10.5269, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/291943>, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC413122/>
- Neil, S. J., Zang, T., y Bieniasz, P. D. (2008). Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature*, 451(7177), 425-430. doi:10.1038/nature06553,
- Neil, S. J. D., Zang, T., y Bieniasz, P. D. (2008). Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature*, 451(7177), 425-430. doi:http://www.nature.com/nature/journal/v451/n7177/suppinf/nature06553_S1.html, <http://dx.doi.org/10.1038/nature06553>
- NIH. (2019). Nucleotide. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore>
- ONUSIDA. (2021). Últimas estadísticas sobre el estado de la epidemia de sida. Retrieved from <http://www.unaids.org/es/resources/fact-sheet>
- Ouyang, Y., Yin, Q., Li, W., Li, Z., Kong, D., Wu, Y., Hong, K., Xing, H., Shao, Y., Jiang, S., Ying, T., y Ma, L. (2017). Escape from humoral immunity is associated with treatment failure in HIV-1-infected patients receiving long-term antiretroviral therapy. *Sci Rep*, 7(1), 6222. doi:10.1038/s41598-017-05594-5,
- Ozato, K., Shin, D.-M., Chang, T.-H., y Morse, H. C. (2008). TRIM family proteins and their emerging roles in innate immunity. *Nat Rev Immunol*, 8(11), 849-860. doi:http://www.nature.com/nri/journal/v8/n11/suppinf/nri2413_S1.html, <http://dx.doi.org/10.1038/nri2413>
- Pace, M. J., Agosto, L., Graf, E. H., y O'Doherty, U. (2011). HIV reservoirs and latency models. *Virology*, 411(2), 344-354.
- Palmer, S., Maldarelli, F., Wiegand, A., Bernstein, B., Hanna, G. J., Brun, S. C., Kempf, D. J., Mellors, J. W., Coffin, J. M., y King, M. S. (2008). Low-level viremia persists for at least 7 years in patients on suppressive antiretroviral therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(10), 3879-3884. doi:10.1073/pnas.0800050105,
- Palmisano, L., y Vella, S. (2011). A brief history of antiretroviral therapy of HIV infection: success and challenges. *Annali dell'Istituto superiore di sanità*, 47(1), 44-48.
- Paul, M., y Jabbar, M. A. (1997). Phosphorylation of Both Phosphoacceptor Sites in the HIV-1 Vpu Cytoplasmic Domain Is Essential for Vpu-Mediated ER Degradation of CD4. *Virology*, 232(1), 207-216. doi:<https://doi.org/10.1006/viro.1997.8541>, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004268229798541X>

- Pereira, E. A., y daSilva, L. L. (2016). HIV-1 Nef: Taking Control of Protein Trafficking. *Traffic*, 17(9), 976-996. doi:10.1111/tra.12412,
- Perelson, A. S., Essunger, P., Cao, Y., Vesanen, M., Hurley, A., Saksela, K., Markowitz, M., y Ho, D. D. (1997). Decay characteristics of HIV-1-infected compartments during combination therapy. *Nature*, 387(6629), 188-191. doi:10.1038/387188a0,
- Pérez-Losada, M., Castel, A. D., Lewis, B., Kharfen, M., Cartwright, C. P., Huang, B., Maxwell, T., Greenberg, A. E., y Crandall, K. A. (2017). Characterization of HIV diversity, phylodynamics and drug resistance in Washington, DC. *PLoS One*, 12(9), e0185644. doi:10.1371/journal.pone.0185644,
- Perkins, N. D., Edwards, N. L., Duckett, C. S., Agranoff, A. B., Schmid, R. M., y Nabel, G. J. (1993). A cooperative interaction between NF-kappa B and Sp1 is required for HIV-1 enhancer activation. *Embo j*, 12(9), 3551-3558.
- Phillips, P. C. (2008). Epistasis--the essential role of gene interactions in the structure and evolution of genetic systems. *Nat Rev Genet*, 9(11), 855-867. doi:10.1038/nrg2452,
- Pickett, B. E., Sadat, E. L., Zhang, Y., Noronha, J. M., Squires, R. B., Hunt, V., Liu, M., Kumar, S., Zaremba, S., Gu, Z., Zhou, L., Larson, C. N., Dietrich, J., Klem, E. B., y Scheuermann, R. H. (2012). ViPR: an open bioinformatics database and analysis resource for virology research. *Nucleic Acids Res*, 40(Database issue), D593-D598. doi:10.1093/nar/gkr859, <https://www.viprbrc.org/brc/home.spg?decorator=vipr>
- Pierson, T., McArthur, J., y Siliciano, R. F. (2000). Reservoirs for HIV-1: mechanisms for viral persistence in the presence of antiviral immune responses and antiretroviral therapy. *Annual review of immunology*, 18(1), 665-708.
- Pillero, P. J. (2003). Early factors in successful anti-HIV treatment. *J Int Assoc Physicians AIDS Care (Chic)*, 2(1), 10-20. doi:10.1177/154510970300200102,
- Pineda-Pena, A. C., Faria, N. R., Imbrechts, S., Libin, P., Abecasis, A. B., Deforche, K., Gomez-Lopez, A., Camacho, R. J., de Oliveira, T., y Vandamme, A. M. (2013). Automated subtyping of HIV-1 genetic sequences for clinical and surveillance purposes: performance evaluation of the new REGA version 3 and seven other tools. *Infect Genet Evol*, 19, 337-348. doi:10.1016/j.meegid.2013.04.032,
- Pinzone, M. R., VanBelzen, D. J., Weissman, S., Bertuccio, M. P., Cannon, L., Hwang, W.-T., Sherman, B., y O'Doherty, U. (2018). Proviral sequencing suggests the majority of the HIV reservoir is expressed over time but significant decay is obscured by clonal expansion. *bioRxiv*, 348409.
- Pollack, R. A., Jones, R. B., Perteau, M., Bruner, K. M., Martin, A. R., Thomas, A. S., Capoferri, A. A., Beg, S. A., Huang, S.-H., Karandish, S., Hao, H., Halper-Stromberg, E., Yong, P. C., Kovacs, C., Benko, E., Siliciano, R. F., y Ho, Y.-C. (2017). Defective HIV-1 Proviruses Are Expressed and Can Be Recognized by Cytotoxic T Lymphocytes, which Shape the Proviral Landscape. *Cell host & microbe*, 21(4), 494-506.e494. doi:10.1016/j.chom.2017.03.008, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28407485>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5433942/>
- Price, D. A., Goulder, P. J., Klenerman, P., Sewell, A. K., Easterbrook, P. J., Troop, M., Bangham, C. R., y Phillips, R. E. (1997). Positive selection of HIV-1 cytotoxic T lymphocyte escape variants during primary infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(5), 1890-1895.

- Rasheedi, S., Shun, M.-C., Serrao, E., Sowd, G. A., Qian, J., Hao, C., Dasgupta, T., Engelman, A. N., y Skowronski, J. (2016). The Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor 6 (CPSF6) Subunit of the Capsid-recruited Pre-messenger RNA Cleavage Factor I (CFIm) Complex Mediates HIV-1 Integration into Genes. *J Biol Chem*, 291(22), 11809-11819. doi:10.1074/jbc.M116.721647, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26994143>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4882448/>
- Ratner, L., Haseltine, W., Patarca, R., Livak, K. J., Starcich, B., Josephs, S. F., Doran, E. R., Rafalski, J. A., Whitehorn, E. A., Baumeister, K., y et al. (1985). Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III. *Nature*, 313(6000), 277-284. doi:10.1038/313277a0,
- Rausch, J. W., y Grice, S. F. J. L. (2015). HIV Rev Assembly on the Rev Response Element (RRE): A Structural Perspective. *Viruses*, 7(6), 3053-3075. <http://www.mdpi.com/1999-4915/7/6/2760>
- Richman, D. D., Margolis, D. M., Delaney, M., Greene, W. C., Hazuda, D., y Pomerantz, R. J. (2009). The challenge of finding a cure for HIV infection. *Science*, 323(5919), 1304-1307.
- Ritchie, M. R. a. H. (2018). Our World in Data. *HIV/AIDS*. Retrieved from <https://ourworldindata.org/hiv-aids>
- Rojas Sanchez, P., y Holguin, A. (2014). Drug resistance in the HIV-1-infected paediatric population worldwide: a systematic review. *J Antimicrob Chemother*, 69(8), 2032-2042. doi:10.1093/jac/dku104,
- Romeu, J., Balagué, M., Ruiz, L., Marfil, S., Puig, T., Arnó, A., Veny, A., Tural, C., Sirera, G., y Clotet, B. (1998). [Value of HIV-1 viral load and CD4 lymphocyte count as determinants of progression to AIDS and survival]. *Med Clin (Barc)*, 110(20), 761-767.
- Ross, T. M., Oran, A. E., y Cullen, B. R. (1999). Inhibition of HIV-1 progeny virion release by cell-surface CD4 is relieved by expression of the viral Nef protein. *Curr Biol*, 9(12), 613-621. doi:10.1016/s0960-9822(99)80283-8,
- Rossen Khan, R., Novitsky, V., Sebunya, T. K., Musonda, R., Gashe, B. A., y Essex, M. (2012). Viral diversity and diversification of major non-structural genes vif, vpr, vpu, tat exon 1 and rev exon 1 during primary HIV-1 subtype C infection. *PLoS One*, 7(5), e35491-e35491. doi:10.1371/journal.pone.0035491, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22590503>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3348911/>
- Ruelas, D. S., y Greene, W. C. (2013). An integrated overview of HIV-1 latency. *Cell*, 155(3), 519-529. doi:10.1016/j.cell.2013.09.044,
- Ruiz, L., Romeu, J., Clotet, B., Balagué, M., Cabrera, C., Sirera, G., Ibáñez, A., Martínez-Picado, J., Raventós, A., Tural, C., Segura, A., y Foz, M. (1996). Quantitative HIV-1 RNA as a marker of clinical stability and survival in a cohort of 302 patients with a mean CD4 cell count of 300 x 10(6)/l. *Aids*, 10(11), F39-44. doi:10.1097/00002030-199609000-00001,
- Russell, R. A., Moore, M. D., Hu, W. S., y Pathak, V. K. (2009). APOBEC3G induces a hypermutation gradient: purifying selection at multiple steps during HIV-1 replication

- results in levels of G-to-A mutations that are high in DNA, intermediate in cellular viral RNA, and low in virion RNA. *Retrovirology*, 6, 16. doi:10.1186/1742-4690-6-16,
- Sadler, H. A., Stenglein, M. D., Harris, R. S., y Mansky, L. M. (2010). APOBEC3G contributes to HIV-1 variation through sublethal mutagenesis. *J Virol*, 84(14), 7396-7404. doi:10.1128/jvi.00056-10,
- Sagnier, S., Daussy, C. F., Borel, S., Robert-Hebmann, V., Faure, M., Blanchet, F. P., Beaumelle, B., Biard-Piechaczyk, M., y Espert, L. (2015). Autophagy restricts HIV-1 infection by selectively degrading Tat in CD4+ T lymphocytes. *J Virol*, 89(1), 615-625. doi:10.1128/jvi.02174-14,
- Sanger, F., y Coulson, A. R. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology*, 94(3), 441-448. doi:[https://doi.org/10.1016/0022-2836\(75\)90213-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(75)90213-2),
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022283675902132>
- Sanjuán, R., y Domingo-Calap, P. (2021). Genetic Diversity and Evolution of Viral Populations. *Encyclopedia of Virology*, 53-61. doi:10.1016/B978-0-12-809633-8.20958-8, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7157443/>
- Saurya, S., Lichtenstein, Z., y Karpas, A. (2002). Characterization of nef gene of HIV type 1 in highly active antiretroviral therapy treated AIDS patients with discordance between viral load and CD4+ T cell counts. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 18(13), 983-987. doi:10.1089/088922202760265650,
- Saurya, S., Lichtenstein, Z., y Karpas, A. (2005). Defective rev response element (RRE) and rev gene in HAART treated AIDS patients with discordance between viral load and CD4+ T-cell counts. *Journal of Clinical Virology*, 33(4), 324-327. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jcv.2005.05.003>,
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1386653205001411>
- Seelamgari, A., Maddukuri, A., Berro, R., de la Fuente, C., Kehn, K., Deng, L., Dadgar, S., Bottazzi, M. E., Ghedin, E., Pumfery, A., y Kashanchi, F. (2004). Role of viral regulatory and accessory proteins in HIV-1 replication. *Front Biosci*, 9, 2388-2413.
- Shankarappa, R., Margolick, J. B., Gange, S. J., Rodrigo, A. G., Upchurch, D., Farzadegan, H., Gupta, P., Rinaldo, C. R., Learn, G. H., He, X., Huang, X. L., y Mullins, J. I. (1999). Consistent viral evolutionary changes associated with the progression of human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol*, 73(12), 10489-10502. doi:10.1128/jvi.73.12.10489-10502.1999,
- Sheehy, A. M., Gaddis, N. C., Choi, J. D., y Malim, M. H. (2002). Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature*, 418(6898), 646-650. doi:10.1038/nature00939,
- Simon, V., Bloch, N., y Landau, N. R. (2015). Intrinsic host restrictions to HIV-1 and mechanisms of viral escape. *Nat Immunol*, 16(6), 546-553. doi:10.1038/ni.3156,
- Simonetti, F. R., Sobolewski, M. D., Fyne, E., Shao, W., Spindler, J., Hattori, J., Anderson, E. M., Watters, S. A., Hill, S., Wu, X., Wells, D., Su, L., Luke, B. T., Halvas, E. K., Besson, G., Penrose, K. J., Yang, Z., Kwan, R. W., Van Waes, C., Uldrick, T., Citrin, D. E., Kovacs, J., Polis, M. A., Rehm, C. A., Gorelick, R., Piatak, M., Keele, B. F., Kearney, M. F., Coffin, J. M., Hughes, S. H., Mellors, J. W., y Maldarelli, F. (2016). Clonally expanded

- CD4+ T cells can produce infectious HIV-1 in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(7), 1883-1888. doi:10.1073/pnas.1522675113,
- Smyth, R. P., Davenport, M. P., y Mak, J. (2012). The origin of genetic diversity in HIV-1. *Virus Research*, 169(2), 415-429.
- Smyth, R. P., y Negroni, M. (2016). A step forward understanding HIV-1 diversity. *Retrovirology*, 13, 27. doi:10.1186/s12977-016-0259-8, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4837613/>
- Suspene, R., Rusniok, C., Vartanian, J. P., y Wain-Hobson, S. (2006). Twin gradients in APOBEC3 edited HIV-1 DNA reflect the dynamics of lentiviral replication. *Nucleic Acids Res*, 34(17), 4677-4684. doi:10.1093/nar/gkl555,
- Tamura, K., y Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol*, 10(3), 512-526. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023,
- Tang, M. W., y Shafer, R. W. (2012). HIV-1 Antiretroviral Resistance: Scientific Principles and Clinical Applications. *Drugs*, 72(9), e1-e25. doi:10.2165/11633630-000000000-00000, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3689909/>
- Trautz, B., Wiedemann, H., Luchtenborg, C., Pierini, V., Kranich, J., Glass, B., Krausslich, H. G., Brocker, T., Pizzato, M., Ruggieri, A., Brugger, B., y Fackler, O. T. (2017). The host-cell restriction factor SERINC5 restricts HIV-1 infectivity without altering the lipid composition and organization of viral particles. *J Biol Chem*, 292(33), 13702-13713. doi:10.1074/jbc.M117.797332,
- UniProtKB. (2021). UniProtKB-P04608(TAT_HV1H2). Retrieved from <http://www.uniprot.org/uniprot/P04608#sequences>
- Van Damme, N., Goff, D., Katsura, C., Jorgenson, R. L., Mitchell, R., Johnson, M. C., Stephens, E. B., y Guatelli, J. (2008). The Interferon-Induced Protein BST-2 Restricts HIV-1 Release and Is Downregulated from the Cell Surface by the Viral Vpu Protein. *Cell host & microbe*, 3(4), 245-252. doi:10.1016/j.chom.2008.03.001, <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.03.001>
- van Zyl, G., Bale, M. J., y Kearney, M. F. (2018). HIV evolution and diversity in ART-treated patients. *Retrovirology*, 15(1), 14. doi:10.1186/s12977-018-0395-4,
- Venkatachari, N. J., Walker, L. A., Tastan, O., Le, T., Dempsey, T. M., Li, Y., Yanamala, N., Srinivasan, A., Klein-Seetharaman, J., Montelaro, R. C., y Ayyavoo, V. (2010). Human immunodeficiency virus type 1 Vpr: oligomerization is an essential feature for its incorporation into virus particles. *Virology*, 7, 119. doi:10.1186/1743-422x-7-119,
- Venkatesh, S., y Bieniasz, P. D. (2013). Mechanism of HIV-1 virion entrapment by tetherin. *PLoS Pathog*, 9(7), e1003483. doi:10.1371/journal.ppat.1003483,
- Vitone, F., Gibellini, D., Schiavone, P., y Re, M. C. (2005). Quantitative DNA proviral detection in HIV-1 patients treated with antiretroviral therapy. *J Clin Virol*, 33(3), 194-200. doi:10.1016/j.jcv.2004.11.003,

- Wagner, A. (2002). Selection and gene duplication: a view from the genome. *Genome Biology*, 3(5), reviews1012.1011-reviews1012.1013. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC139360/>
- Wei, P., Garber, M. E., Fang, S. M., Fischer, W. H., y Jones, K. A. (1998). A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. *Cell*, 92. doi:10.1016/s0092-8674(00)80939-3, [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80939-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80939-3)
- Whitlock, M. C., Phillips, P. C., Moore, F. B.-G., y Tonsor, S. J. (1995). MULTIPLE FITNESS PEAKS AND EPISTASIS. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 26(1), 601-629. doi:10.1146/annurev.es.26.110195.003125, <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.es.26.110195.003125>
- Wonderlich, E. R., Leonard, J. A., y Collins, K. L. (2011). HIV immune evasion disruption of antigen presentation by the HIV Nef protein. *Adv Virus Res*, 80, 103-127. doi:10.1016/b978-0-12-385987-7.00005-1,
- Yu, X., Shang, H., y Jiang, Y. (2020). ICAM-1 in HIV infection and underlying mechanisms. *Cytokine*, 125, 154830. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2019.154830>, <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043466619302595>
- Zhao, L. J., Wang, L., Mukherjee, S., y Narayan, O. (1994). Biochemical mechanism of HIV-1 Vpr function. Oligomerization mediated by the N-terminal domain. *J Biol Chem*, 269(51), 32131-32137.
- Zharkikh, A., y Li, W. H. (1992). Statistical properties of bootstrap estimation of phylogenetic variability from nucleotide sequences. I. Four taxa with a molecular clock. *Mol Biol Evol*, 9(6), 1119-1147. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a040782,



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00235

Matrícula: 2163801958

EL TARGA como factor determinante en el tamaño del reservorio y la diversidad de los genes accesorios y reguladores del provirus del VIH-1

Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 15:00 horas del día 22 del mes de octubre del año 2021 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

DR. EDMUNDO BONILLA GONZALEZ
DRA. CLAUDIA SELENE ZARATE GUERRA
DR. MOISES VERGARA MENDOZA
DRA. MONICA VIVEROS ROGEL

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la ultima, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: LUIS LEON FUENTES ROMERO

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



LUIS LEON FUENTES ROMERO
ALUMNO

REVISÓ

MTRA. ROSALVA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCÍA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE

DR. EDMUNDO BONILLA GONZALEZ

VOCAL

DRA. CLAUDIA SELENE ZARATE GUERRA

VOCAL

DR. MOISES VERGARA MENDOZA

SECRETARIA

DRA. MONICA VIVEROS ROGEL