

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS**



**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS SUBTIPOS DE VIH-1 EN
ENSENADA Y TIJUANA, BAJA CALIFORNIA**

TESIS

PARA CUBRIR PARCIALEMNTE LOS REQUISTIOS NECESARIOS
PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTROS EN CIENCIAS

PRESENTA

NORMA CONCEPCIÓN MARTÍNEZ CISNEROS

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO, AGOSTO DEL 2013

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS
POSGRADO EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS SUBTIPOS DE VIH-1 EN
ENSENADA Y TIJUANA, BAJA CALIFORNIA

T E S I S

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta

NORMA CONCEPCIÓN MARTÍNEZ CISNEROS

Aprobada por:



Dra. Raquel Muñoz Salazar
Directora de tesis



Dra. Ivone Giffard Mena
Sinodal



M.S.P. David S. Salas Vargas
Sinodal

RESUMEN

Durante 2012 en México se detectaron 763 nuevos casos de pacientes infectados con Virus de Inmunodeficiencia Humana tipo 1 (VIH-1). Las técnicas utilizadas para el diagnóstico y monitoreo del progreso de la infección en centros de salud, no permiten determinar el subtipo viral (A, B, C, D, F, G, H, J y K), que establece el origen genético de la cepa y su resistencia a fármacos. Dicha información es de gran importancia, para establecer estrategias de prevención y tratamiento terapéutico. Por lo que el objetivo de este estudio es identificar y caracterizar molecularmente los subtipos de las cepas de VIH-1 obtenidos de pacientes diagnosticados clínicamente con VIH-1 en Ensenada y Tijuana, Baja California. Se colectaron muestras sanguíneas (n = 22) de pacientes diagnosticados con VIH-1. Se realizó la extracción de RNA a partir de suero sanguíneo y DNA de sangre periférica. Se amplificó el gen *env* (región gp120 V3-V5) a partir de DNA y cDNA. Se identificaron 2 haplotipos correspondientes al subtipo B del grupo M de VIH-1. Las secuencias obtenidas se ingresaron a GenBank bajo los números de acceso: KF356165-67, KF366441-42. El epítipo para V3 corresponde a los aminoácidos GPGR en el 100% de las muestras analizadas (n=5). La secuencia de la región V3 indica que una de las cepas presenta tropismo hacia receptores CXCR4, presentes en linfocitos T, lo cual se relaciona con fenotipo inductor de sincitios, mientras que otra cepa es identificada con tropismo para receptores CCR5. No se identificó una relación entre el haplotipo y el sitio de muestreo u origen del paciente, además no se observan diferencias entre el haplotipo, práctica de riesgo y sexo del paciente.

ÍNDICE

Resumen.....	iii
Glosario.....	viii
Índice.....	iv
Lista de figuras.....	vii
Lista de tablas.....	vi
1. Introducción.....	8
2. Antecedentes.....	10
3. Objetivos.....	24
3.1 Objetivo general.....	24
3.2 Objetivos particulares.....	2
4. Metodología.....	25
4.1 Población de estudio.....	25
4.2 Análisis de carga viral.....	26
4.3 Análisis genético del gen <i>env</i>	26
4.3.1 Extracción de RNA.....	26
4.3.2 Extracción de DNA genómico.....	27
4.3.3 Reacción de retrotranscripción.....	28
4.3.4 Amplificación del gen hemoglobina.....	28
4.3.5 Amplificación del gen <i>env</i> región gp120 V3-V5.....	29
4.3.6 Amplificación del gen <i>gag</i> y del gen <i>pol</i>	31
4.3.7 Secuenciación de los productos amplificados.....	31

4.3.8	Análisis de secuencias.....	31
4.3.8.1	Asignación de subtipos.....	32
4.3.9	Análisis filogenético	33
5.	Resultados	35
5.1	Características de la población	36
5.2	Cuantificación de carga viral.....	37
5.3	Análisis genético.....	37
5.3.1	Extracción de ácidos nucleicos (DNA y RNA)	37
5.3.2	Amplificación de cDNA por RT-PCR.....	39
5.3.3	Amplificación del gen hemoglobina.....	39
5.3.4	Amplificación del gen <i>gag</i> y del gen <i>pol</i>	40
5.3.5	Análisis de secuencias del gen <i>env</i> región V3-V5	40
5.4	Identificación de subtipos VIH-1	45
5.5	Análisis filogenético	49
5.6	Variabilidad región V3 proteína gp120	50
6.	Discusión.....	55
7.	Conclusiones	62
8.	Recomendaciones.....	63
9.	Literatura citada	70
10.	Anexos	70
10.1	Consentimiento informado	70
10.2	Encuesta epidemiológica	71
10.3	Cebadores para amplificación del gen <i>env</i> por PCR	73

10.4 Experimentos de amplificación del gen <i>gag</i> por PCR.....	74
10.5 Experimentos de amplificación del gen <i>pol</i> por PCR.....	76
10.6 Secuencias de referencia utilizadas por el programa REGA para la asignación de subtipos	78
10.7 Secuencias de referencia utilizadas para el alineamiento por el programa Genotyping	79
10.8 Secuencias utilizadas en la alineación y análisis filogenético del gen <i>env</i> región gp120 V3-V5 de VIH-1.....	82

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Enfermedades oportunistas definatorias de SIDA.....	12
Tabla.2 Información epidemiológica.	38
Tabla 3. Sitios variables entre los haplotipos identificados del gen <i>env</i>	42
Tabla 4. Estimaciones de divergencia evolutiva entre secuencias.....	44
Tabla 5. Patrones de cambios en la secuencia de aminoácidos de V3 gen <i>env</i>	53
Tabla 6. Síntesis de resultados.	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura partícula viral VIH-1.....	10
Figura 2. Mapa del genoma de VIH-1.....	17
Figura 3. Distribución mundial de VIH-1.....	19
Figura 4. Diagrama de flujo de la metodología implementada.....	34
Figura 5. Extracción de RNA.....	39
Figura 6. Producto de amplificación del gen de hemoglobina.....	40
Figura 7. Producto de amplificación del gen <i>env</i>	41
Figura 8 Asignación de subtipos por REGA subtyping tool para haplotipo 1.	46
Figura 9 Asignación de subtipos por REGA subtyping tool para haplotipo 2.....	46
Figura 10. Identificación de subtipo para haplotipo 1 por programa Genotyping.	47
Figura 11. Identificación de subtipo para haplotipo 2 por programa Genotyping.	48
Figura 12. Identificación de subtipos por programa RIP. Tamaño de ventana 500 pb. .	49
Figura 13. Relaciones filogenéticas de aislados de VIH-1 de Ensenada y Tijuana, Baja California.....	51

GLOSARIO

Célula CD4: Tipo de linfocito, también denominado células T.

ELISA: Estudio inmunitario por detección de anticuerpos específicos al virus o microorganismo.

Epitope: Región de una proteína o antígeno reconocido por el anticuerpo, se une a él para formar el complejo antígeno-anticuerpo.

Homoderivado: Sustancia derivada de la sangre, como plaquetas, plasma, fracción proteica.

Incidencia: Frecuencia con que ocurre una enfermedad en un periodo de tiempo determinado y en proporción a la población que se presenta.

Linfocito: Célula linfática que se origina en la médula ósea, caracterizada por poseer un núcleo único, rodeado de escaso citoplasma. Interviene en las reacciones inmunitarias.

Macrófago: Tipo de linfocito que participa en la inmunidad adquirida por presencia de antígenos.

Monocitos: Es un tipo de linfocito caracterizado por poseer un solo núcleo celular. Su tamaño oscila entre 20-20µm

Prevalencia: Proporción de personas que sufren una enfermedad con respecto al total de la población en estudio.

Quimiocina: Proteína que actúa como mensajero químico entre las células inmunitarias

Sarcoma de Kaposi: Cáncer originado en las paredes de vasos sanguíneos, piel o mucosas.

Seropositivo: Persona infectada por un virus en cuyo torrente sanguíneo es posible identificar anticuerpos específicos.

Sincitios: Célula multinucleada derivada de la fusión de varias células, comportamiento asociado a infecciones.

Terapéutica: Parte de la medicina cuyo objeto de estudio son los preceptos para el tratamiento de enfermedades

Tropismo VIH: Capacidad del virus por infectar un solo tipo celular ya sea monocitos o macrófagos.

1 INTRODUCCIÓN

El Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) es el causante del Síndrome de Inmunodeficiencia Humana (SIDA), el cual implica el desarrollo de enfermedades infecciosas que se derivan en un déficit de la inmunidad celular. La transmisión del VIH se realiza por contacto sexual, perinatal y sanguínea (Sierra, 2004), esta última se presenta por la mezcla de sangre infectada con sangre de alguien sano por instrumentos contaminados, transfusiones sanguíneas o hemoderivados.

Los primeros casos de SIDA fueron notificados en 1981 en Estados Unidos, - identificándose en hombres homosexuales quienes presentaban un sistema inmunológico suprimido (CDC, 1981a,b). En 1983 se aisló el agente causal (Barré-Sinoussi, et al., 1983) y para 1984 ya se había caracterizado al virus (Montagnier, et al., 1984).

Un estudio realizado por el Programa Conjunto de las Naciones Unidas dedicado al VIH/SIDA (ONUSIDA por sus siglas en inglés) en el año 2011, reporta que 34 millones de personas están infectados con VIH, de los cuales el 52% son hombres (AIDSinfo, 2011). Sólo en 2008 se registraron 2.7 millones de nuevos casos de VIH en el mundo, la prevalencia en adultos entre los 15 - 49 años es de 0.7%. En América Latina se registraron 170,000 casos nuevos durante 2008 (ONUSIDA, 2009). En México, existen 179,478 personas infectadas de VIH, en Baja California se presentan el 4% de los casos nacionales (CENSIDA, 2012)

En 1984 se secuenció el genoma completo del VIH (Wain-Hobson, et al., 1985) observándose que este virus presenta gran variabilidad genética. Hasta el momento el

VIH se subdivide en dos tipos, VIH-1 y VIH-2. El VIH-1 se subdivide en 4 grupos: M, N, O y P (Duri, et al., 2013). Únicamente el grupo M se ha clasificado en subtipos (A, B, C, D, F, G, H, J, y K) (Duri, et al., 2013). Cada subtipo presenta variabilidad en su distribución geográfica, diferencias antigénicas, patogénicas y de estructura genómica (Gómez, et al., 2001). El desconocimiento de los subtipos circulantes presenta una problemática para establecer estrategias eficientes de prevención así como el tratamiento terapéutico (Gómez, et al., 2001). debido a que existen subtipos con resistencia natural a determinados medicamentos antirretrovirales (Rivas, et al., 2006).

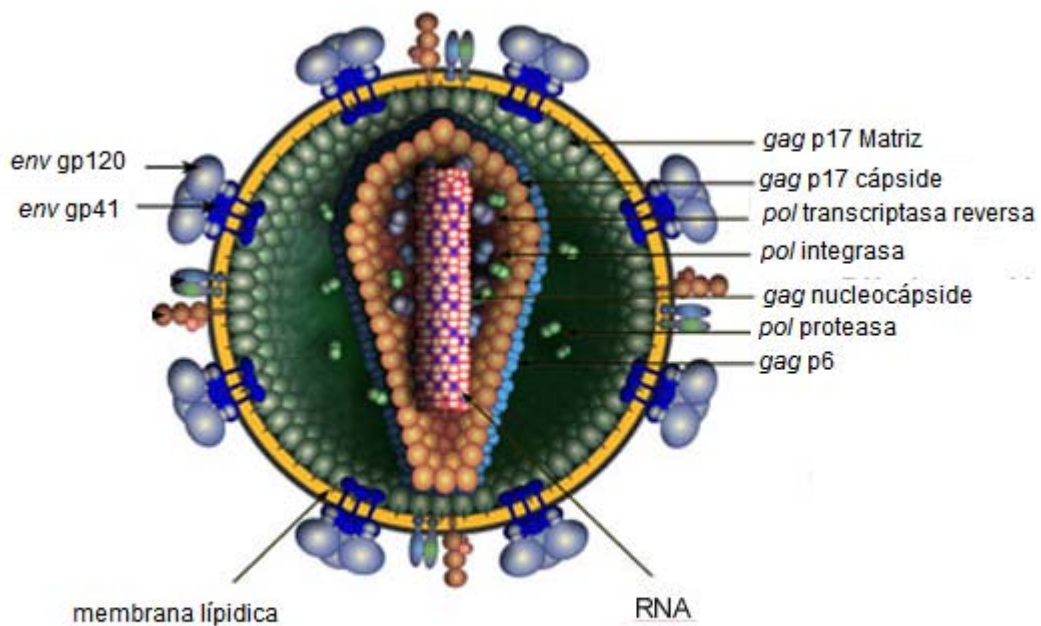
Entre los genes VIH, el gen *env* es uno de los de mayor relevancia, Éste codifica a una glicoproteína que interactúa directamente con los receptores celulares, modificaciones en la secuencia de éste polipéptido afectan la interacción del virus con las células diana y pueden llegar a evadir la respuesta del sistema inmunológico ante la infección (Duri, et al., 2013). La variabilidad nucleotídica de la secuencia del gen *env* es utilizada como marcador para la identificación de los subtipos virales y su tropismo. El tropismo celular se refiere a la capacidad del virus por infectar un solo tipo celular ya sea monocitos, macrófagos o linfocito, lo cual depende del tipo de receptor celular que reconoce (receptor CD4, receptor CCR5, receptor CXCR4), diferencias en éste comportamiento se asocia en la formación de sincitios y una mayor patogenicidad. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es caracterizar genéticamente los subtipos del VIH- 1 en pacientes con diagnóstico clínico de VIH/SIDA en Ensenada y Tijuana, Baja California.

2 ANTECEDENTES

Etiología

El VIH es un retrovirus, de la familia *Retroviridae* (Montagnier, et al., 1984) ésta familia de virus se caracteriza por presentar ácido ribonucleico (RNA) como material genético. Es una partícula infecciosa con un diámetro de 80-110 nanómetros.

Estructuralmente presenta una envoltura proteica y una bicapa de lípidos, en el interior de la envoltura se encuentra la nucleocápside (Fig. 1) donde se localizan dos cadenas lineales de RNA (ssRNA), constituyendo un genoma de 9.7 kilobases (kb) (Nadai, et al., 2008)



Mature HIV-1 Virion
Image courtesy of Lou Henderson
hendersonl@ncifcrf.gov

Figura 1. Estructura partícula viral VIH-1. Se muestra en *itálica* el gen que transcribe la proteína señalada, (Tomado de: <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/STRUCTURE/INDEX.HTML>)

Diagnóstico

El estándar de oro para el diagnóstico de VIH es el método serológico de ensayo ELISA y western blot, los cuales permiten identificar anticuerpos virales o proteínas virales. En los pacientes seropositivos se monitorea el progreso de la infección por medio de dos indicadores. El primero identifica el número de linfocitos T CD4 circulantes en sangre, bajos niveles indican deterioro del sistema inmunológico. El segundo cuantifica la carga viral, que indica la replicación del virus (Córdova, et al., 2010). Los resultados de estas técnicas se utilizan como base para la toma de decisiones terapéuticas (Resino, et al., 2000) indicando el momento en que inicia el tratamiento antirretroviral y el tipo de tratamiento (CONASIDA, 2012b), sin considerarse la posible resistencia a antiretrovirales la únicamente se observa ante un tratamiento fallido.

Para la caracterización del VIH se emplea principalmente la secuenciación posterior a una reacción en cadena de polimerasa (PCR) (Monzón, et al., 2006). Éste es el método más preciso para identificar y caracterizar el VIH-1 (Gómez, et al., 2001) y todos sus subtipos. Permite caracterizar el genoma completo o un fragmento, identificándose le subtipo a través de análisis filogenéticos o determinar sitios de recombinación entre subtipos.

Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA)

El SIDA es el síndrome de inmunodeficiencia adquirida, se considera la fase aguda de la infección por VIH en la cual el sistema inmunológico del paciente se encuentra

suprimido por la reducción de células linfocitos T, se considera que en pacientes con $<200 \text{ cel/mm}^3 \text{ CD4}$ se ha desarrollado SIDA (Sierra, 2004).

Los pacientes con SIDA se caracterizan por presentar bajo conteo de células CD4, altas cargas virales y manifestar alguna de las enfermedades oportunistas (Tabla 1). En México, el tratamiento antirretroviral es totalmente gratuito en las instituciones de salud del gobierno, y se recomienda su implementación en pacientes con conteo de células CD4 menores a 350 cel/mm^3 (CONASIDA, 2009) o cargas virales de 100,000 copias/mL (CONASIDA, 2012b).

Tabla 1. Enfermedades oportunistas definitorias de SIDA. Prevalencia de enfermedades oportunistas definitorias de SIDA en México. Fuente: Enfermedades Oportunistas VIH, ONUSIDA 2009.

Enfermedad oportunista	Prevalencia
Aspergilosis	3-7%
Micobacteria atípica	5-6%
Candidiasis	30%
Criptococosis	7-11%
Criptosporidiosis isosporiasis	8%
Herpes (sistémico)	5%
Histoplasmosis	5-10%
Sarcoma de Kaposi	30-43%
Linfoma	10%
Nocardiosis	$<2\%$
Neumonía por <i>Pneumocystis carinii</i>	24%
Toxoplamosis	17%
Tuberculosis	28%

Epidemiología

Alrededor de 34 millones de personas en el mundo están infectadas con VIH (AIDSinfo, 2011). En América Latina la prevalencia de VIH es de 1%, en 2012 se

registraron 170,000 casos nuevos (ONUSIDA, 2012) alcanzando los 1.4 millones de personas infectadas con VIH en dicha región. La epidemia se concentra en hombres que tienen relaciones sexuales con hombres, usuarios de drogas inyectables (UDI) y profesionales del sexo (ONUSIDA, 2012).

De acuerdo a la ONUSIDA, México es un país con epidemia concentrada, se identifican como grupos de riesgo a hombres usuarios de drogas intravenosas, hombres que tienen relaciones sexuales sin protección con hombres y trabajadores sexuales (2012) (CENSIDA, 2009). El SIDA en México ocupa el lugar 17 como causa de muerte, con una tasa de mortalidad de 4.6 por cada 100,000 habitantes (hab) (CENSIDA, 2012). El Centro Nacional para la prevención y control del VIH/SIDA (CENSIDA) reportó que existen 179,478 infectados de VIH en el país, por lo que se registra una prevalencia de 0.24% (2012), La vía de transmisión sexual representa el 97.4% de los casos diagnosticados de VIH (CENSIDA, 2012).

En el estado de Baja California, México, se presenta el 4% de los casos nacionales por infección por VIH (CENSIDA, 2012), el 73.6% de los pacientes con VIH son hombres (CENSIDA, 2012). La edad promedio de notificación es de 30 años (EPI, 2009). En Baja California durante 2012 se detectaron 100 nuevos casos de infección por VIH (CENSIDA, 2012). El 67% de los casos de VIH se registran en el municipio de Tijuana, 15% de los casos se presentan en el municipio de Ensenada (EPI, 2009)

La transmisión del VIH es un problema relacionado estrechamente con los movimientos poblacionales, afectando a la población de los lugares de origen y de

destino (California, 2009, Salgado, et al., 2007). Los primeros casos de VIH en el México, se presentaron en hombres de elevado nivel profesional que habían residido en Estados Unidos, por lo que se considera que el virus ingresó a México procedente de éste país (Córdova, et al., 2010). Para 1986 se inició el efecto denominado “ruralización de la epidemia”, caracterizado por migrantes mexicanos que durante su estadía en Estados Unidos se infectaron con VIH y al regresar a sus lugares de origen en México, transmitían el virus. Para el año 2000, la tercera parte de las personas infectadas vivían en entidades con altos niveles de migración (Salgado, et al., 2007). En el estado de Michoacán el 39% de los casos de VIH presentan antecedentes de migración a Estados Unidos (Córdova, et al., 2010). Se ha identificado que los migrantes mexicanos que regresan voluntariamente a México o son deportados, durante su estancia en Estados Unidos y en regiones de la frontera norte de México, presentan una alta prevalencia de prácticas sexuales de riesgo y uso compartido de agujas (Rangel, et al., 2006), lo cual incrementa el riesgo de adquirir el virus.

Características genéticas de VIH

El genoma viral de VIH se organiza en diferentes secciones: largas repeticiones terminales (LTR), tres genes estructurales (*gag*, *pol* y *env*), dos genes reguladores (*tat* , *rev*) y cuatro genes accesorios. La región LTR regula la integración del genoma viral al genoma del huésped así como la replicación viral (Llano, 2004). El gen *gag* codifica las proteínas que integran la matriz y la cápside. El gen *pol* codifica para los precursores de

la transcriptasa reversa (RT), integrasa (IN), proteasa (PR) y RNAasa, proteínas esenciales para la replicación viral. El gen *env* codifica a las glicoproteínas gp120 y gp41, las cuales recubren la envoltura viral (Pérez, 2000, Sierra, 2004). El gen *tat* regula la actividad transcripcional, el gen *rev* regula la expresión viral. Los genes *vif*, *vpr*, *vpu*, *nef* son denominados genes accesorios o auxiliares de los cuales depende la patogenicidad de la enfermedad pero no son fundamentales para la replicación (Llano, 2004) (Fig. 2)

Patogenicidad de VIH

El gen *env* codifica para las glicoproteínas de cápside (gp 120 y gp41), las cuales son las responsables de identificar y anclarse a la célula blanco para iniciar la infección (Llano, 2004). La glicoproteína gp120 se forma de cinco dominios variables (V1-V5) y cuatro dominios constantes (C1-C4) (Sola, et al., 1999). El VIH infecta células con receptores CD4 o receptores de quimiocinas (CCR5 y CXCR4), en el humano las células más susceptibles son linfocitos, macrófagos y monocitos (Monzón, et al., 2006, Pérez, 2000). La región V3 (asa V3) se conforma de 35 aminoácidos los cuales interactúan con los receptores celulares (Sola, et al., 1999). Sin embargo en el ápice de V3 se forma un epítipo de cuatro aminoácidos (GPGR), el cual juega un papel importante en el tropismo viral debido a que reconocimiento del receptor y en la fusión de la envoltura nuclear y la membrana celular (Papuashvili, et al., 2005).

La infección inicia con el reconocimiento de la célula blanco al interactuar la proteína gp120 de la cápside viral con el receptor celular. Dependiendo del tipo celular es el receptor reconocido, el receptor CD4 en el caso de linfocitos y receptores CCR5 o

CXCR4 en las células macrófagos (Monzón, et al., 2006, Pérez, 2000). Ésta interacción provoca un cambio conformacional exponiendo a la proteína gp41 lo cual finaliza con la fusión de la membrana celular y la envoltura viral. La nucleocápside ingresa al citoplasma celular, liberándose la transcriptasa reversa la cual sintetiza una molécula de DNA viral (dsDNA) a partir de la cadena bicatenaria de RNA, éste es el primer paso de la replicación viral. Por acción de la integrasa la molécula de dsDNA es integrada al cromosoma del huésped, formando el provirus. La expresión génica del provirus se realiza utilizando los procesos celulares el ensamblaje de las partículas virales se realiza en el citoplasma y la liberación del virus desencadena la destrucción de la célula diana (Llano, 2004).

En una célula infectada el virus se replica constantemente, generando de 10^{10} a 10^{12} partículas virales por día en una persona infectada (Pérez, 2000, Taylor, et al., 2008). La retrotranscriptasa reversa viral no cuenta con mecanismos de reparación para corregir errores durante la retrotranscripción (Taylor, et al., 2008). Se ha estimado que por cada ciclo de replicación se sustituye una base nucleotídica del genoma (Sierra, 2004), lo que genera nuevas variantes virales en un corto periodo de tiempo. La región del genoma viral de mayor divergencia es el gen *env* (Brooks, et al., 2005).

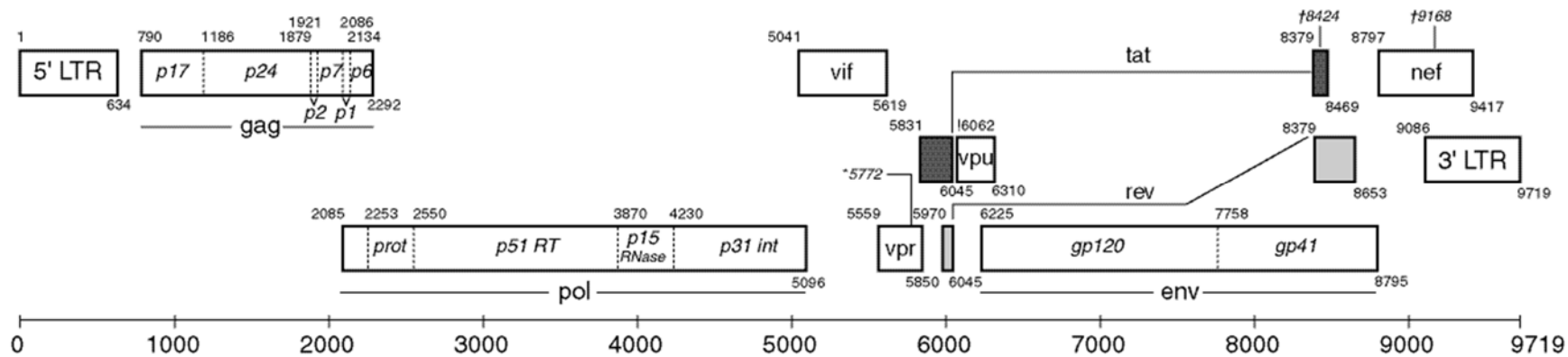


Figura 2. Mapa del genoma de VIH-1. Tamaño de 9.7 kb. LTR: repeticiones terminales largas. Genes estructurales: *gag*, *pol* y *env*. Genes reguladores: *tat*, *rev*. Genes accesorios: *vif*, *vpr*, *vpu*, *nef*. Dentro de los rectángulos se muestra el nombre del gen, la numeración indica la posición nucleotídica donde inicia y termina cada gen (Korber, et al., 1998).

Variabilidad genética del VIH

Analizando la variabilidad nucleotídica el VIH se subdivide en tipo VIH-1 y tipo VIH-2 (Sierra, 2004), los cuales presentan diversidad en su distribución geográfica, diferencias antigénicas, patogénicas y de estructura genómica (Gómez, et al., 2001). El virus VIH-1 es de distribución universal, mientras que el tipo VIH-2 es endémico del continente Africano (Sierra, 2004). El virus VIH-2 presenta menor patogenicidad y transmisibilidad, por lo que los infectados con este tipo viral presentan menor mortalidad (Llano, 2004).

El virus tipo VIH-1 se categoriza en 3 grupos, según su variabilidad genética: grupo M (por su nombre en inglés “main”), el grupo O (por su nombre en inglés “outlier”) y grupo N (por su nombre en inglés “new”). Según la diversidad en el gen *env* el grupo M se divide en nueve subtipos: A, B, C, D, F, G, H, J, K. Los subtipo A y F a su vez se subdivide en sub-subtipos: A1, A2, A3, A4, F1 Y F2 (Takebe, et al., 2008, Taylor, et al., 2008), respectivamente. Cada subtipo y subsubtipo presenta una distribución geográfica (Fig. 3) y comportamiento biológico característicos (tropismos celular, replicación y citopatogenicidad) (Freitas, et al., 1999, Holguín, et al., 1998). El subtipo D se asocia a un progreso más rápido de la infección y con tratamiento antirretrovirales fallidos (Eaterbrook, et al., 2010). Kanki et al. (1999) reportan que el 87% de las mujeres infectadas con subtipo A por transmisión sexual después de 5 años de infección y sin recibir tratamiento antirretroviral no han desarrollado SIDA, comparado con el 60% de infectadas con subtipo D y 30% de subtipo C.

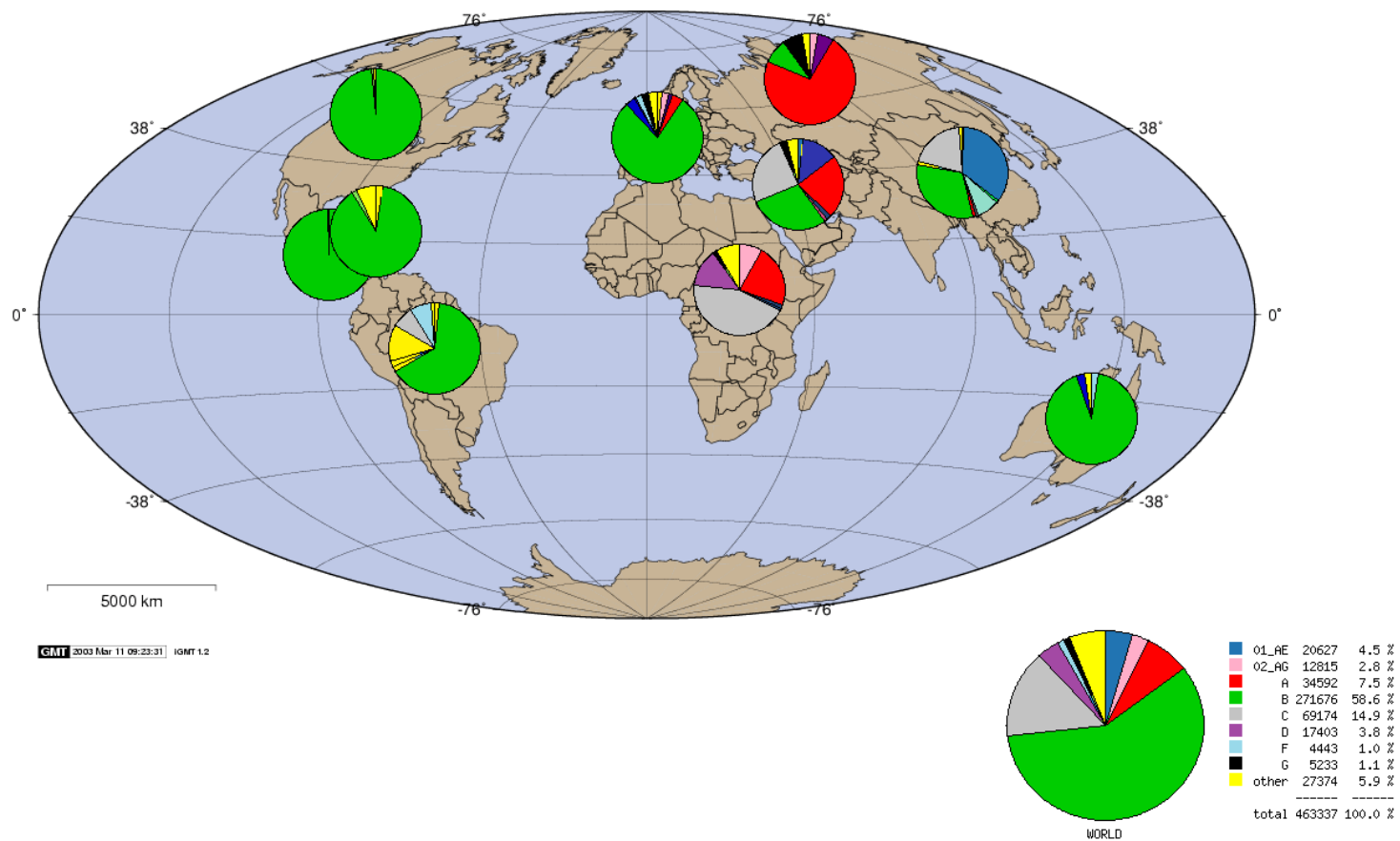


Figura 3. Distribución mundial de VIH-1. Se incluyen las secuencias de subtipos y formas recombinantes disponibles en Los Alamos Database , última actualización 2012. (<http://www.hiv.lanl.gov/components/sequence/HIV/geo/geo.comp>)

Cuando una célula es infectada por dos variantes virales, se presenta el fenómeno de elección de copia (“copy choice”) de la transcriptasa reversa, lo cual se asocia con la generación de virus con secuencias derivadas de dos o más subtipos virales, éstos se denominan Formas Recombinantes Circulantes (CRF) (Gómez, et al., 2001). Las CRF se presentan en más de 3 individuos sin relación epidemiológica, se caracterizan por fragmentos de genómicos de distintos subtipos virales y presentan sitios de recombinaciones comunes (Rivas, et al., 2006). Si las formas recombinantes solo se han identificado en individuos aislados o grupos de personas con cierta relación epidemiológica, se denominan Formas Únicas Recombinantes (URF, por sus siglas en inglés).

En Europa, Estados Unidos (Brodine, et al., 2003) y Australia predomina en el subtipo B, al igual que en Brasil, Ecuador, Perú, Ecuador, Bolivia (Gómez, et al., 2001) y México (Eyzaguirre, et al., 2007, Rivera-Morales, et al., 2001). En Paraguay, Argentina, Uruguay predomina el subtipo F (Laguna-Torres, et al., 2005). En Estados Unidos se han identificado diversas formas recombinantes, entre ellas CRF01_AE, CRF02_AG (Brodine, et al., 2003) y otros subtipos A, D y E de VIH-1 (Brodine, et al., 1995). Además se ha identificado una asociación de los subtipos por la vía de transmisión y/o grupos de riesgo. En Argentina se identificó una alta proporción de subtipo F y forma recombinante B/F en usuarios de drogas inyectable y heterosexuales, mientras que el subtipo B domina en la población homosexual (Gómez, et al., 2001).

La variabilidad genética dentro de cada subtipo del grupo M en el gp 120 del gen *env* oscila entre el 15% al 20%, la variabilidad entre los subtipos va del 25% al 30% (Taylor,

et al., 2008) (Holguín, et al., 1998). La heterogeneidad de la región gp120 se ha incrementa por lo que lo que ha aumentado el número cepas circulantes (Agwale, et al., 2001). En el grupo O la variabilidad genética entre los subtipos alcanza el 35% (García-Vellejo, et al., 2003).

La caracterización de subtipos se realiza con DNA y/o RNA. El trabajar con el virón de RNA es ideal en estudios de patogenicidad y epidemiología del VIH, debido a que refleja las secuencias específicas que se replican en el huésped (Nadai, et al., 2008). El DNA proviral presente en las células infectadas contiene altos niveles de secuencias virales integradas deficientemente al DNA huésped (Nadai, et al., 2008) pero mediante al análisis de éste DNA se han identificado los subtipos del virus tipo VIH-1 (Delwart, et al., 1993). Los alineamientos de las secuencias del gen *env* se han utilizado para asignar los subtipos virales, con base en un análisis filogenético de los aislados analizados (Sola, et al., 1999). Con lo cual se ha identificado que los subtipos y formas recombinantes del grupo M son responsables de la epidemia mundial (Agwale, et al., 2001) (Gómez, et al., 2001, Taylor, et al., 2008).

Rivera-Morales et al (2001), caracterizaron genéticamente a VIH-1, mediante el análisis filogenético de las secuencias del gen *env* región C2-V3 gp120 de 65 muestras clínicas de pacientes diagnosticados con VIH/SIDA. Se identificó el subtipo B del grupo M como predominante en México. Eyzaguirre et al. (2007) analizaron 11 muestras sanguíneas de pacientes con VIH usuarios de drogas intravenosas y trabajadoras sexuales de la ciudad de Tijuana y Ciudad Juárez en México identificándose que las cepas pertenecen al subtipo B, además no se encontraron

diferencias filogenéticas entre las cepas mexicanas y otras cepas del subtipo B. Para 2010 se identificaron pacientes mexicanos infectados con CRF_BG y con CRF_BG (Vázquez-Valls, et al., 2010).

La variabilidad de la secuencia del gen *env* gp120 además de diferenciar el subtipo viral permite conocer e inferir el tropismo viral, lo cual depende de las características de la secuencia de aminoácidos que lo conforman V3. Ésta región se conforma de 35 aminoácidos, inicia y termina con cisteína las cuales se unen por puentes de disulfuro formando un asa (Papuashvili, et al., 2005). La heterogeneidad de la región influye en el tropismo y su comportamiento biológico del virus (Papuashvili, et al., 2005). Cambios en las posiciones 11 y 25 por aminoácidos básicos son críticos para determinar el tropismo hacia receptores CXCR4 (Kostense, et al., 1998) relacionada con la formación de sincitios, lo cual implica una mayor patogenicidad (Korber, et al., 1998). Las cepas que no forman sincitios se consideran menos patogénicas y con un tropismo hacia macrófagos (Chesebro, et al., 1996) con receptores CCR5 (Mezei, et al., 2011).

El diseño de las terapias antirretrovirales se basan en el estudio de las cepas del subtipo B, pero debe considerarse que el 50% de las infecciones en el mundo son causadas por los subtipos A, B, C y la forma recombinante CRF02_AG (Buonaguro, et al., 2007). La función de los fármacos antirretrovirales es evitar la replicación viral por diferentes estrategias, se clasifican en inhibidores de retrotranscriptasa, inhibidores de proteasa, inhibidores de integrasa, inhibidores de fusión y antagonistas de CCR5 (García-Vellejo, et al., 2003).

El tipo VIH-2 y el grupo O del VIH-1 presentan resistencia a los inhibidores de retrotranscriptasa, debido a una mutación en la posición 181 de la RT (Rivas, et al., 2006). Se han identificado mutaciones asociadas a cambios en la susceptibilidad ante ciertos medicamento. La presencia de la mutación V82I de la región codificante a la proteasa en los aislados de subtipo C y CRF02_AG se asocia a una menor susceptibilidad a los inhibidores de proteasa (Rivas, et al., 2006). Mientras que los subtipos no B del grupo M presentan una susceptibilidad 60-70% a los inhibidores de proteasa. La alta variabilidad del VIH-1 genera que se presenten mayor resistencia a los medicamentos por presión selectiva, provocando que el tratamiento fallé (Holguín, et al., 2006).

Ante la gran variabilidad genética y taxonómica del virus VIH es necesario identificar y caracterizar las cepas virales circulantes en la ciudad Ensenada y Tijuana por la amplificación y análisis de la región V3-V5 del gen *env* como primer paso en la búsqueda de implementar medidas de prevención y tratamiento más efectivas para combatir la infección por VIH.

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Caracterizar genéticamente los subtipos del Virus de Inmunodeficiencia Humana tipo 1 (VIH-1) en pacientes diagnosticados clínicamente con VIH en Ensenada y Tijuana, Baja California en el periodo de febrero 2012 a abril 2013.

3.2 Objetivos particulares

- a) Identificar molecularmente el subtipo de VIH-1 en pacientes diagnosticados clínicamente con VIH que no se encuentren bajo tratamiento antirretroviral en Ensenada y Tijuana, Baja California.
- b) Identificar el tropismo viral basado en la variabilidad de la región V3 del gen *env*
- c) Asociar el origen del paciente con el origen geográfico de la cepa viral.

4 METODOLOGÍA

4.1. Población de estudio

El estudio fue prospectivo transversal, siendo la población de estudio pacientes diagnosticados con VIH que acudieron al Centro Ambulatorio de Prevención y Atención en SIDA e Infecciones de Transmisión Sexual (CAPASITS), clínica 8 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) y del Hospital General de ISESALUD, en el periodo de febrero 2012 a abril 2013. Todos los pacientes que participaron en el estudio fueron bajo consentimiento informado (anexo 10.1) y que cumplieron con los criterios de inclusión.

Criterios de inclusión:

- a) Paciente diagnosticado con VIH. Dicho diagnóstico debió realizarlo alguna institución de salud, consultorio médico privado o laboratorio clínicos utilizando pruebas rápidas y/o western blot.
- b) No haber recibido tratamiento antirretroviral durante los 12 meses anteriores a la toma de la muestra.
- c) Responder una encuesta epidemiológica (anexo 10.2).

A cada uno de los pacientes se le tomó dos muestras de sangre periférica, una para el análisis de carga viral y otra para el análisis genético. Las muestras se almacenaron y se transportaron en red en frío al Laboratorio de Epidemiología y Ecología Molecular (LEEM) de la Escuela de Ciencias de la Salud, UABC Ensenada. Al ingresar al

laboratorio, cada tubo fue centrifugado 15 min a 5000 g, almacenándolos a 4 °C. Todas las muestras fueron procesadas antes de 24 h de haber tomado la muestra.

4.2 Análisis de carga viral

A cada uno de los pacientes se le tomó 4 mL de sangre periférica y se colocaron en tubo con anticoagulante EDTA (ácido etilendiamino tetraacético). El análisis de carga viral se realizó utilizando el método de reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (qPCR), se utilizó el reactivo COBAS Ampliprep/COBAS Taqman HIV-1 Test, v2.0 (Roche Molecular Systems, Inc.). El análisis fue realizado por el laboratorio clínico Certus, Ensenada.

4.3 Análisis genético del gen *env*

Para el análisis del gen *env* región gp120 V3-V5 se utilizó RNA viral de suero sanguíneo y DNA proviral de sangre total. Para lo cual a cada uno de los pacientes se les tomó 4 mL de sangre periférica y se colocaron en tubos sin EDTA, la cual se refrigeró hasta realizar la extracción de ácidos nucleicos.

4.3.1 Extracción de RNA

La extracción de RNA se realizó a partir de 300 µL de suero sanguíneo utilizando el High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche®) siguiendo las instrucciones del proveedor. Todo el proceso se realizó bajo condiciones de bioseguridad nivel III (BSL-

3). Del producto de la extracción se tomaron alícuotas de 10 μ L las cuales se almacenaron a -70 °C hasta su posterior análisis. Desde la extracción de RNA a la preparación de retrotranscripción se utilizaron puntas con filtro, agua y material libre de RNAsas. Los tubos fueron limpiados con 0.5 v/v DEPC (dietil pirocarbonato) (Roche®) durante 12 h a 37 °C en agitación constante, posteriormente se esterilizó a 121 °C durante 15 min con el fin de inactivar el compuesto.

Para comprobar la calidad de RNA, se realizó una electroforesis en 1% de agarosa a 80 V durante 20 min en buffer 1X TAE. El gel se tiñó con una solución 5X *Gelstar*® (Lonza, Rockland, Inc) durante 25 min para ser visualizado bajo luz ultravioleta (UV) en fotodocumentador Gel Doc™ XR (Biorad®).

4.3.2 Extracción de DNA genómico

La extracción de DNA genómico se realizó por el método CTAB/PVP (hexadecil trimetil amonio bromuro/polivinil pirrolidona) a partir de sangre periférica. Se agregó 1 mL de 1% NaCl por cada mililitro de sangre periférica, homogeneizándose. A 800 μ L de homogenizado, se agregaron 700 μ L de la solución de lisis CTAB/PVP (2% PVP, 2% CTAB, 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl, 100 mM Tris HCl pH=8.0), incubándose 1 h a 65 °C. Posteriormente se añadió 0.6 volúmenes de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1 v/v). Las muestras se centrifugaron 10 min a 10,000 rpm para separar las fases. El DNA se precipitó con 0.7 volumen de isopropanol a -20 °C durante 12 h o 15 min a -70 °C, posteriormente se centrifugó 20 min a 13,000 rpm. El precipitado que se formó se

hidrató con 30 μL de la solución 0.1X TE (5.0 mM Tris-HCl pH = 7.9 y 0.1 mM EDTA pH = 8.0) y se refrigeró a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior análisis. Para evaluar la calidad y cantidad de DNA extraído se realizó una electroforesis en gel 1.4% de agarosa, corriéndose 20 min a 100 V en buffer 0.5X TBE. El gel se tiñó con solución 5X de *Gelstar* (Lonza Rockland, Inc), se incubó 20 min en oscuridad para ser observado bajo lámpara UV en fotodocumentador Gel DocTM XR (Biorad®). De observarse una banda definida de DNA genómico se considera DNA de buena calidad.

4.3.3 Reacción de retrotranscripción

El RNA total se utilizó como molde para la polimerización de una molécula de DNA complementario (cDNA). La reacción en cadena de la polimerasa de retrotranscripción (RT-PCR) de 15 μL consistió en 2 μg de RNA, 3 μL master mix 5X iScript (Biorad®), 1.5 μL oligo dT₍₂₀₎, 1 μL de iScript Reverse Transcriptase (Biorad®). Se utilizó un termociclador Eppendorf Mastercycle (Eppendorf ®) con un perfil de temperatura para RT-PCR de $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 90 min seguido de 5 min a $85\text{ }^{\circ}\text{C}$. El producto de la reacción se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.3.4 Amplificación del gen hemoglobina (control positivo)

Para evaluar la calidad y concentración de DNA y cDNA, se realizó la amplificación del gen de hemoglobina de cada una de las muestras. Cada tubo de reacción en cadena de DNA polimerasa (PCR) consistió en 1X buffer de PCR, 0.2 mM

desoxirribonucleótidos trifosfato, (dNTPs), 0.2 μ M de cada cebador, 1.5 mM de $MgCl_2$, 1U Taq polimerasa (Biorad®). Los cebadores utilizados para la amplificación fueron PC03 (5'-ACACAACTGTGTTCACTAGC-3') y KM38 (5'-TGGTCTCCTTAAACCTGTCTTG-3') (Van Laethem, et al., 1998).

El perfil de amplificación consistió en 5 min de desnaturalización a 94 °C seguido de 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 50 °C por 30 s y 72 °C por 45 s, finalizando a 72 °C por 10 min. El producto de la reacción fue evaluado en gel 1.5% de agarosa, 90 V por 30 min. El gel se tiñó con solución 5X de *Gelstar* (Lonza Rockland, Inc), incubándose 20 min en oscuridad para ser observado bajo lámpara UV en fotodocumentador Gel Doc™ XR (Biorad ®). El tamaño del fragmento de amplificación es de 167pb. En los casos de productos negativos se repitió la extracción de DNA y/o RNA, según el caso.

4.3.5 Amplificación del gen *env* región gp120 V3-V5

La amplificación del gen *env* región gp120 V1-V5 se realizó por medio de una PCR anidada. En la primera reacción se utilizaron los cebadores ED5 (5'-ATGGGATCAAAGCCTAAAGCCATGTG-3') y ED12 (5'-AGTGCTTCCTGCTGCTCCCAAGAACCCAAG-3') (Delwart, et al., 1995, Delwart, et al., 1993). La reacción de PCR se realizó en 15 μ L de volumen que contenía: 1X buffer, 3 mM $MgCl_2$, 0.3 mM dNTP, 0.3 μ M de cada cebador y 1 U Taq polimerasa (Biorad ®). El plásmido pNL3-4 se utilizó como control positivo y agua nanopura como control negativo. El ciclo de temperatura utilizado consistió en 94 °C por 5 min, seguido de 5 ciclos de 94 °C por 1 min, 37 °C por 1 min y 72 °C por 1 min,

posteriormente se incrementó a 30 ciclos de 94 °C por 30 s, 50 °C por 45 s y 72 °C por 1 min y una extensión final de a 72 °C por 10 min.

El producto de PCR de la primera reacción se utilizó como molde para la segunda reacción, amplificando la región de gp120 V3-V5 del gen *env*. Cada reacción de 15 µL consistió en 1X buffer, 3 mM de MgCl₂, 0.3 mM dNTP, 1 U Taq polimerasa (Biorad®), 0.3 µM de cada cebador. Los cebadores utilizados fueron ENV7 (5'-CTGTTAATGGCAG TCTAGC-3') y ENV8 (5'-CACTTC TCCAATTGTCCYTYA-3') (Luo, et al., 2011). El perfil de amplificación consistió en 94 °C por 5 min , 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 55 °C por 30 s y 72 °C por 1 min, finalizando a 72 °C por 10 min (Luo, et al., 2011).

Para evaluar el producto de la reacción se realizó una electroforesis en 1.4% agarosa teñido con solución 5X de *Gelstar*® (Lonza Rockland, Inc) y observado bajo luz ultravioleta. Para evitar contaminación cruzada, la detección del producto del primer PCR se realizó únicamente después de preparar la segunda reacción de amplificación.

Es importante mencionar que además de los cebadores antes descritos se probaron otros juegos de cebadores para la amplificación del gen *env*, en el anexo 10.3 se detallan las características de éstos.

4.3.6 Amplificación del gen *gag* y del gen *pol*

Además del gen *env* se amplificaron otros genes virales, las condiciones de reacción y cebadores probados se especifican en el anexo 10.4 para el gen *gag* y en el anexo 10.5 para el gen *pol*.

4.3.7 Secuenciación de los productos amplificados

Los productos de amplificación de la región V3-V5 de gp120 del gen *env* se purificaron utilizando ExoSap-IT[®] (USB), para lo cual se agregó 2 μ L de esta solución por cada 5 μ L del producto de amplificación. Posteriormente, se colocaron en el termociclador en un ciclo de 37°C por 15 min seguido de 80°C por 15 min. Los productos purificados con ExoSAP-IT[®] se observaron en un gel 1.4% de agarosa, se secuenciaron utilizando nucleótidos terminadores de secuencia (BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems) se procesaron en un secuenciador automático ABI Prism 3100 (Automated Capillary DNA sequencer, Applied Biosystems) con la compañía SeqXcel Inc. (<http://www.seqxcel.com/>) en San Diego, California EUA.

4.3.8 Análisis de secuencias

Las secuencias obtenidas del gen *env* fueron revisadas con el programa Codon Code Aligner v.3.7.1 (Codon Code Corporation, 2006). Las secuencias nucleotídica y de aminoácidos se alinearon mediante el programa ClustalW (Thompson, 1994)

implementado en MEGA versión 5.10 (Tamura, et al., 2011). Las secuencias nucleotídicas fueron traducidas a la secuencia proteica mediante el programa Translate disponible en Los Alamos HIV Database (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/TRANSLATE/translate.html>). El número de haplotipos y diversidad haplotípica se determinó con el programa DNAsP 5.1 (Librado, et al., 2009).

4.3.8.1 Asignación de subtipos

La identificación del subtipo de VIH-1 de los haplotipos se realizó utilizando tres herramientas diferentes:

- 1) Programa REGA-HIV v.beta implementado en HIV Bioinformatics BIOAFRICA (<http://www.bioafrica.net/rega-genotype/html/subtypinghiv.html>) (Alcantara, et al., 2009, Oliveira, et al., 2005).
- 2) Programa Genotyping (Rozanov, et al., 2004) disponible en NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/formpage.cgi>).
- 3) Programa Recombinant Identification Program (RIP) (Siepel, et al., 1995) implementado en Los Alamos HIV Database (<http://www.hiv.lanl.gov/>).

El programa REGA asigna el subtipo viral al realizar primeramente un alineamiento ClustalW de la secuencia problema con secuencias de referencia de cada subtipo (anexo 10.6), posteriormente construye un árbol filogenético implementado el modelo evolutivo HKY (Hasegawa, Kishino, y Yano) con distribución gama y 100 bootstraps, para lo anterior utiliza el programa PAUP[®]. Si la secuencia problema es de

una longitud menor de 800pb el alineamiento solo se realiza con secuencias de subtipos puros (Oliveira, et al., 2005).

El programa Genotyping identifica el subtipo viral de HIV-1 al comparar la secuencia problema con secuencias de referencia (anexo 10.7) de cada subtipo y CRF por medio del programa BLAST (Morgulis, et al., 2008).

El programa RIP identifica formas recombinantes de VIH-1 al alinear la secuencia problema con una secuencia representativa para diferentes subtipos (A1,A2,B,C,D,F1,F2,G,H,J,K y CRF01_AE), éstas pueden ser secuencias consenso o secuencias de referencia de aislados pero todas cubren prácticamente todo el genoma viral, disponibles en la base de datos Los Alamos Database. Ésta herramienta permite identificar los subtipos que integran la forma recombinante y los sitios de recombinación.

4.3.9 Análisis filogenético

Se determinaron las relaciones filogenéticas entre las secuencias obtenidas y 22 secuencias de referencia del gen *env* obtenidas del GenBank, Los Alamos HIV Database y REGA HIV en donde se incluyó por lo menos dos secuencias por subtipo y cuatro CRF (anexo 10.8). Los árboles filogenéticos se realizaron bajo el modelo Kimura dos parámetros con bootstrap.

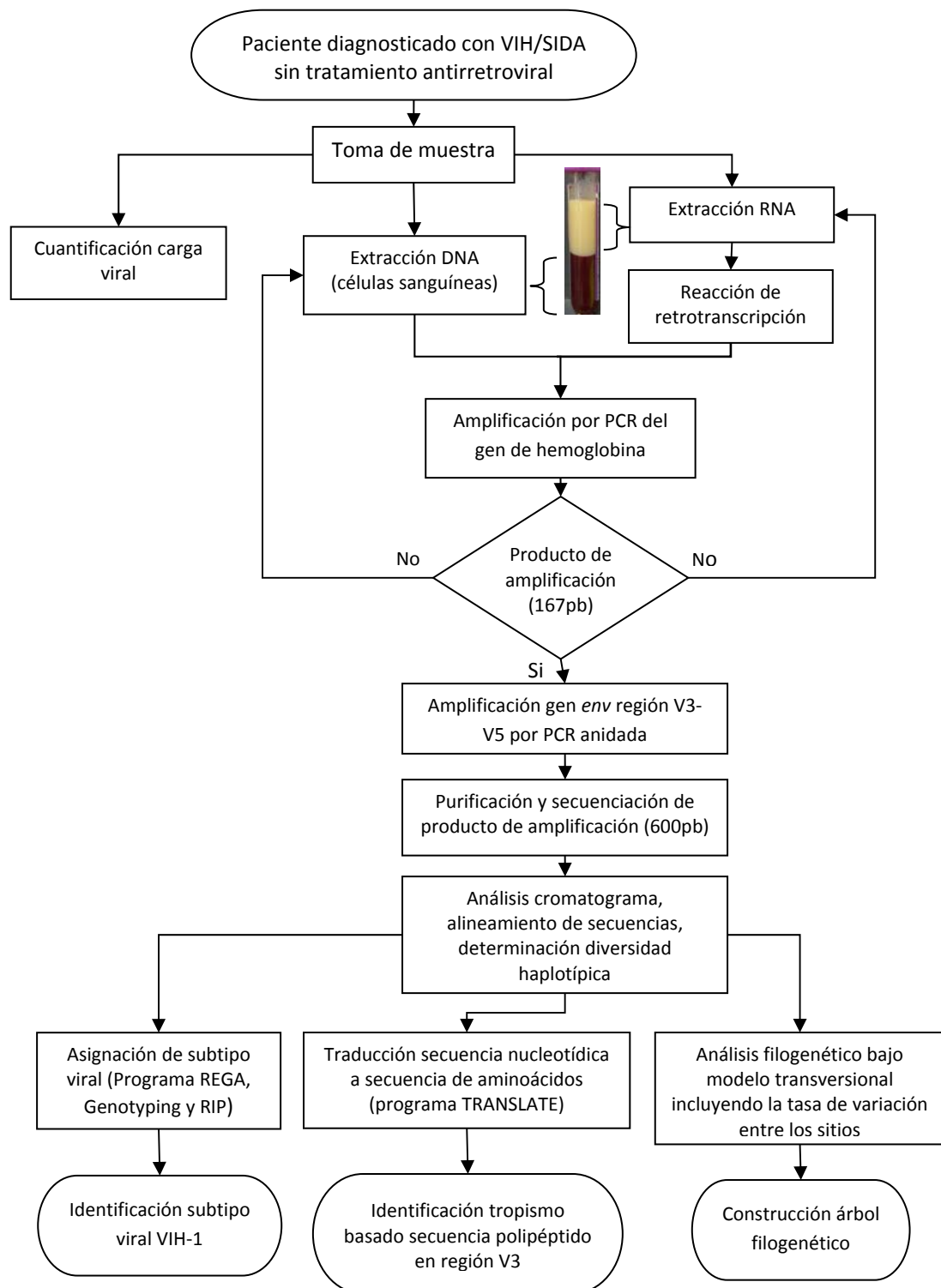


Figura 4. Diagrama de flujo de la metodología implementada. Se muestra el procedimiento a seguir desde la toma de muestra a la identificación de subtipo de VIH-1, análisis filogenético e identificación de tropismo de la cepa.

5. RESULTADOS

Se realizaron diversos experimentos para la estandarización del método de extracción de RNA, reacción de RT-PCR y amplificación del genoma viral de VIH por PCR anidada. Se realizó la extracción de RNA y DNA a partir de muestras con cargas virales indetectables (< 50 copias/mL) y/o pacientes bajo tratamiento antirretroviral, sin obtener producto de amplificación o productos inespecíficos. Se probaron pares de cebadores para el gen *gag* (anexo 10.4) sin obtenerse productos de amplificación o productos inespecíficos; además se experimentó con cebadores para el gen *pol* (anexo 10.5) obteniéndose productos inespecíficos y secuencias correspondientes a genoma humano.

Como se mencionó en el apartado de metodología, la identificación del subtipo viral y tropismo se realizó analizando la secuencia del gen *env* región V3-V5 de VIH-1 a partir de muestras sanguíneas de pacientes diagnosticados con VIH/SIDA. Se realizó la extracción de RNA de suero sanguíneo, posteriormente se efectuó la reacción de RT-PCR obteniéndose como producto cDNA. La extracción de DNA se realizó de sangre total. Como control se amplificó el gen de hemoglobina con cDNA y DNA de cada una de las muestras. La amplificación del gen *env* región V3-V5 de VIH-1 se realizó por PCR anidada únicamente de cuyas muestras se obtuvo fragmento de amplificación correspondiente al gen de hemoglobina. Los productos amplificados del gen *env* se secuenciaron y analizaron para la asignación de subtipos por medio de: programa REGA, Genotyping y RIP, además se realizó un análisis filogenético, y se identificó el

tropismo viral según la variabilidad de la región V3 del gen *env* (Fig. 4). A continuación se describen a detalle los resultados correspondientes.

5.1 Características de la población

En total se colectaron 22 muestras sanguíneas, de las cuales el 18% (4) fueron de Ensenada y 82% (18) de Tijuana. Sin embargo, solo se logró la amplificación del gen *env* en 23% (5) de las muestras (VIH-156, VIH-161, VIH-162, VIH-163, VIH-181). Por lo que el análisis de este estudio se basa en la información obtenida de éstos cinco pacientes.

La edad promedio de los cinco pacientes fue de 45 años en un rango de 41 a 50 años. El 20% fueron de sexo femenino. En el 60% (3) de los pacientes, se tomó la muestra durante el primer mes después de haber sido diagnóstico con VIH. Un paciente fue diagnosticado en 2008, pero abandonó el tratamiento de antirretrovirales por más de un año. Un paciente fue diagnosticado en 2007 pero había recibido tratamiento al momento de la toma de muestras. El 60% (3) de los pacientes se identifican con preferencias homosexuales, y el 40% (2) con preferencias heterosexuales. Ninguno de los pacientes declaró haber recibido transfusiones sanguíneas anteriormente. Solo el 20% (1) se declaró usuario de drogas inyectables (Tabla 2).

5.2 Cuantificación de carga viral

De las 22 muestras sanguíneas colectadas se obtuvo la cuantificación de carga viral del 81% (18). El promedio de copias de RNA de VIH-1 fue de 22,909 copias/mL con un intervalo de 1,950 - 1,862,087 copias/mL. Solo se muestran los resultados de cuyas muestras se obtuvo fragmentos de amplificación con el gen *env* (Tabla 2).

5.3 Análisis genético

5.3.1 Extracción de ácidos nucleicos (DNA y RNA)

Se realizó la extracción de DNA y RNA de las 22 muestras sanguíneas. La extracción de DNA solo fue exitosa en el 68 % (15) de las muestras. En cuanto a la extracción de RNA, en el gel de agarosa no se logró observar RNA viral, mensajero o ribosomal, en ninguna de las muestras excepto en VIH-163 (Fig. 5), sin embargo, aun así, se consideró que existía RNA el cual se utilizó para realizar la reacción de retrotranscripción en PCR.

Tabla.2 Información epidemiológica. Se muestran la información de pacientes de cuyas muestras se obtuvieron fragmentos de amplificación de ácidos nucleicos en el presente estudio. ND: no datos, NA: no aplica, Ho: homosexual He: heterosexual, UDI: usuario de drogas inyectables

Paciente	Sexo	Edad	Año de diagnóstico	Carga viral (log copias/mL)	Práctica sexual	UDI	Fecha de muestreo	Lugar de muestro	Lugar de nacimiento	Residencia en EUA	Tiempo residencia en EUA
VIH-156	H	30	2007	ND	Ho	No	Feb-2012	Ensenada, B.C	Tijuana, B.C	Si	>12 meses
VIH-161	F	41	2012	ND	He	No	Sep-2012	Ensenada, B.C.	Ensenada, B.C.	No	NA
VIH-162	H	46	2012	ND	He	No	Abril 2013	Ensenada, B.C.	Ensenada, B.C	No	NA
VIH-163	H	50	2013	6.27	Ho	SI	Enero 2013	Ensenada, B.C.	El Limón, Jalisco	ND	ND
VIH-181	H	43	2008	4.64	Ho	No	Oct-2012	Tijuana, B.C.	San Juan del Río, Durango	Si	>12 meses

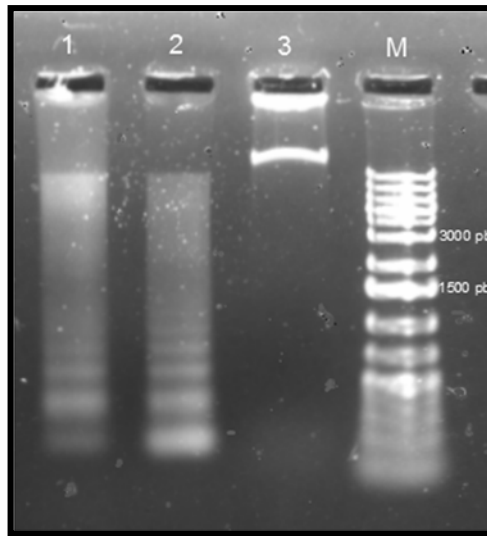


Figura 5. Extracción de RNA. Electroforesis en gel 1% de agarosa 1X buffer TAE 70V por 20 minutos. M: marcador molecular 1Kb. Línea 1: muestra VIH-163 extracción de RNA de sangre con Kit High Pure Viral Acid Nucleic. Línea 2: muestra VIH-163 extracción de RNA de suero sanguíneo con Kit High Pure Viral Acid Nucleic. Línea 3: muestra VIH-163 extracción de RNA de sangre con Trizol ®.

5.3.2 Amplificación de cDNA por RT-PCR

El producto de la extracción de RNA de 15 de las muestras se utilizó para una reacción de retrotranscripción con cebadores oligo dT para la amplificación de una cadena de cDNA a partir de mRNA total. La reacción de RT-PCR se evaluó utilizando el cDNA como molde para reacción de PCR para la amplificación del gen de hemoglobina.

5.3.3 Amplificación del gen hemoglobina (control positivo)

Se logró la amplificación del gen de hemoglobina (167pb) en 15 de las 22 muestras de DNA genómico, y en las 15 muestras con cDNA obtenido de la reacción de retrotranscripción (Fig. 6).

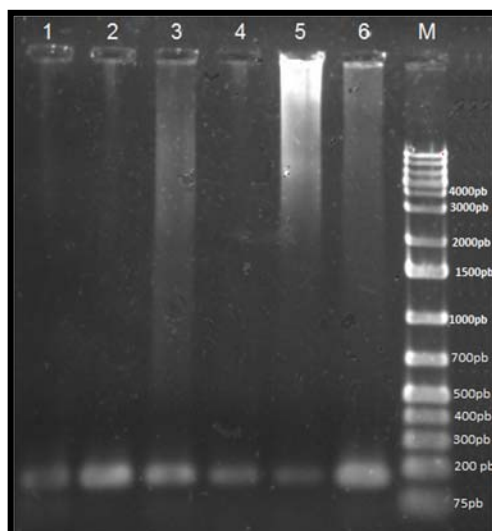


Figura 6. Producto de amplificación del gen de hemoglobina. Fragmento de amplificación de 167pb. Línea 1: Muestra VIH-156 (DNA), línea 2: muestra VIH-163 (cDNA), línea 3: muestra VIH-168 (cDNA), línea 4: VIH-170 (cDNA), línea 5: muestra VIH-162 (cDNA), línea 6: muestra VIH-181 (cDNA), línea 7: marcador molecular 1Kb. Electroforesis en 1.5% agarosa 90 V, 30 min, 0.5X buffer TBE

5.3.4 Amplificación del gen *gag* y del gen *pol*

Los resultados de los experimentos realizados para la amplificación por PCR anidada de fragmentos correspondiente al gen *gag* y al gen *pol* de VIH-1 se muestran en anexo 10.4 y anexo 10.5, respectivamente. Para ambos genes los productos de amplificación obtenidos fueron inespecíficos y no del tamaño esperado, la secuencia nucleotídica del fragmento se identificó como genoma humano.

5.3.5 Análisis de secuencias del gen *env* región V3-V5

Las muestras de DNA y cDNA que amplificaron el gen de la hemoglobina fueron seleccionadas para amplificar la región gp120 V3-V5 del gen *env* (579 pb). De todas las

muestras, solamente cinco fueron las que amplificaron dicho fragmento: VIH-156, VIH-161, VIH-162, VIH-163, VIH-181 (Fig.7).

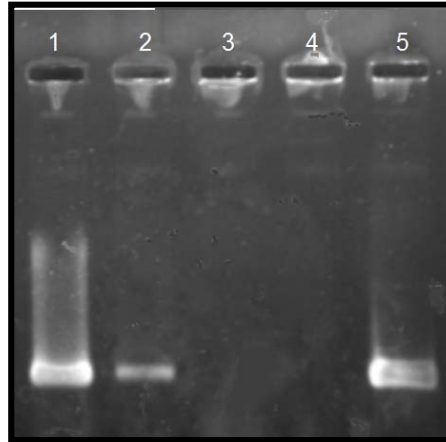


Figura 7. Producto de amplificación del gen *env*. Fragmento de amplificación de 570 pb. Línea 1: muestra VIH-162 (cDNA), línea 2: muestra VIH-163 (DNA), línea 3: control negativo de primera reacción de PCR, línea 4: control negativo segunda reacción, línea 5: marcador molecular fragmento 600pb. Electroforesis en 1.4% agarosa 90 V, 30 min, 0.5X buffer TBE

La secuencia del fragmento amplificado se alineó con secuencias de referencia VIH-1 obtenidas de GenBank, REGA y Los Alamos Database, Dicho fragmento corresponde a la región de gp120 V3-V5 del gen *env*, en la posición 7065-7634 nt del genoma de referencia HXB2(Korber, et al., 1998). Las secuencias obtenidas se ingresaron a GenBank bajo los números de acceso: KF356165-67, KF366441-42.

Entre las cinco muestras analizadas se identificaron dos haplotipos con 116 sitios variables (Tabla 3) y una diversidad haplotípica es de 0.6. El haplotipo 1 presenta dos transiciones en las posiciones 7245 y 7515, y cuatro transversiones en posiciones 7142, 7246, 7475, 7497. El haplotipo 2 presenta tres deleciones de seis nucleótidos en las posición 7151-7156 nt, 7426-7431 nt, y 7455-7460 nt, dos inserciones de tres nucleótidos en las posiciones 7194-7196 nt y 7308-7310 nt respecto a la secuencia referencia HXB2 (Korber, et al., 1998).

Tabla 3. Sitios variables entre los haplotipos identificados del gen *env*. Posición 7065-7634nt. HXB2 secuencia de referencia subtipo B (no. acceso: K03455) Haplotipo 1 correspondiente a VIH-156, VIH-161, VIH-163, VIH-181 y haplotipo 2 correspondiente a VIH-162. Haplotipo 1 presenta dos transiciones (rojo) y 4 transversiones (verde). El haplotipo 2 presenta dos inserciones (sombreado oscuro) y 3 deleciones de 6 nucleótidos (sombreado claro).

Sitio variable	6	26	28	30	31	34	35	36	73	75	78	80	84	85	86	87
HXB2	C	C	T	T	G	G	A	A	A	A	C	G	C	C	A	G
Haplotipo 1	C	C	T	T	G	G	A	A	A	T	C	G	C	C	A	G
Haplotipo 2	T	A	A	G	A	T	C	C	G	T	A	A	-	-	-	-
Sitio variable	88	89	90	109	110	112	116	120	121	127	128	129	128	141	148	161
HXB2	A	G	A	G	T	A	T	A	A	-	-	-	G	A	C	G
Haplotipo 1	A	G	G	G	T	A	T	A	A	-	-	-	G	A	C	G
Haplotipo 2	-	-	A	T	A	G	C	G	G	A	T	A	A	G	T	C
Sitio variable	164	166	167	169	171	175	177	178	179	180	181	188	193	195	196	197
HXB2	G	G	C	A	A	A	T	A	A	C	A	A	A	A	G	C
Haplotipo 1	G	G	C	A	A	A	T	G	C	C	A	A	A	A	G	C
Haplotipo 2	A	A	A	G	C	G	A	G	G	G	G	G	G	C	A	G
Sitio variable	200	201	220	222	226	228	230	233	236	240	241	242	243	247	249	253
HXB2	G	C	G	A	A	T	A	C	T	C	-	-	-	A	G	T
Haplotipo 1	G	C	G	A	A	T	A	C	T	C	-	-	-	A	G	T
Haplotipo 2	A	A	A	G	G	C	C	T	A	A	A	A	A	G	T	C
Sitio variable	256	281	285	287	298	303	322	325	331	345	349	350	354	356	359	360
HXB2	T	C	C	G	G	G	T	A	C	T	T	T	T	G	C	T
Haplotipo 1	T	C	C	G	G	G	T	A	C	T	T	T	T	G	C	T
Haplotipo 2	A	T	T	C	A	A	A	T	T	C	C	C	C	A	-	-
Sitio variable	361	362	363	364	366	369	372	373	374	375	376	378	380	388	389	390
HXB2	T	G	G	A	T	T	A	G	G	G	T	A	A	G	A	A
Haplotipo 1	T	G	G	A	T	T	A	G	G	G	T	A	A	G	A	A
Haplotipo 2	-	-	-	-	G	C	G	A	A	T	G	C	C	-	-	-
Sitio variable	391	392	393	395	399	400	401	408	409	430	432	448	456	483	488	494
HXB2	G	G	A	G	C	A	C	C	C	A	T	A	A	T	A	G
Haplotipo 1	G	G	A	G	C	A	C	A	C	T	T	G	A	T	A	G
Haplotipo 2	-	-	-	C	G	G	T	A	T	T	C	C	T	A	C	C
Sitio variable	495	499	507	513												
HXB2	A	T	T	A												
Haplotipo 1	A	T	T	T												
Haplotipo 2	T	A	C	A												

El promedio de diferencias pares de los aislados comparado con la secuencia de referencia para el subtipo B HXB2 es de 9.49% (intervalo 1.59%-17.38%). Entre el haplotipo 2 y secuencia del subtipo B aislado de Estados Unidos (no. acceso: JQ403040) presentan 0% de diferencias en la secuencia, por lo que se identifican como clones (Tabla 4).

Cabe resaltar que el haplotipo 2 se identificó en sólo una muestra, correspondiente a un paciente originaria de Ensenada quien reportó que nunca ha viajado a Estados Unidos ni a otro lugar de la República Mexicana, no es usuario de drogas inyectables y de preferencias heterosexual.

Tabla 4. Estimaciones de divergencia evolutiva entre secuencias. Debajo de la diagonal = número de diferencias de bases por secuencia entre secuencias, arriba de la diagonal= porcentaje de número de diferencias pares. Bootstrap en 100 replicas. Se eliminaron las posiciones ambiguas para cada par de secuencias. Análisis evolutivo realizado en MEGA5(Tamura, et al., 2011). Haplotipo 1 presenta 1.59% de diferencia en la secuencia respecto a HXB2 (sombreado claro), haplotipo 2 presenta 17.38% de diferencias en la secuencia respecto a HXB2 (sombreado oscuro).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1 HXB2 (K03455)		1.59	17.38	15.79	15.15	13.72	14.83	14.19	1.59	13.72	12.76	14.04	8.93
2 Haplotipo_1	10		17.22	15.95	15.31	13.56	14.19	14.51	0.00	14.04	12.76	13.72	9.09
3 Haplotipo_2	109	108		18.82	20.26	18.50	1.59	17.38	17.22	18.66	18.18	19.78	16.11
4 Y_MX (AF200917)	99	100	118		18.98	14.67	13.72	13.88	15.95	15.31	14.83	16.43	11.96
5 P_MX (AF200897)	95	96	127	119		16.43	12.76	18.02	15.31	17.07	17.54	18.82	13.72
6 NL_MX (AF200895)	86	85	116	92	103		14.04	15.31	13.56	15.15	15.31	15.15	12.60
7 NL_MX (AF200890)	93	92	115	113	108	94		15.31	14.67	15.47	17.22	16.27	13.24
8 J_MX (AF200878)	89	91	109	87	113	96	96		14.51	13.24	15.31	15.95	11.64
9 EUA (JQ403040)	10	0	108	100	96	85	92	91		14.04	12.76	13.72	9.09
10 B_EUA (AY173953)	86	88	117	96	107	95	97	83	88		15.47	14.83	11.32
11 B_Brasil (EF637053)	80	80	114	93	110	96	108	96	80	97		14.83	12.12
12 B_EUA (AY331295)	88	86	124	103	118	95	102	100	86	93	93		12.60
13 CRF_AB (AF193277)	56	57	101	75	86	79	83	73	57	71	76	79	

5.4 Identificación de subtipos VIH-1 (gen *env* región V3-V5)

El análisis con el programa REGA asignó al haplotipo 1 y haplotipo 2 como subtipo B de VIH-1, correspondientes a la posición 7065-7634nt HXB2 (Korber, et al., 1998). La longitud de los fragmentos varió de 570 nucleótidos para el haplotipo 1 (Fig. 8) a 561 nucleótidos para el haplotipo 2 (Fig. 9). La asignación del subtipo y región se confirmó 100%, agrupándose al subtipo con bootstrap <70%.

Por medio del programa Genotyping se comparó al haplotipo 1 y haplotipo 2 con las secuencias de referencia del año 2009 para VIH-1 disponibles en programa BLAST (Morgulis, et al., 2008). El haplotipo 1 se reconoció como subtipo B (Fig. 10), mientras que el haplotipo 2 se identificó como CRF03_AB (no. acceso AF193277) de los subtipos A y B con un porcentaje de asignación mayor a 95 en los primeros 300 nucleótidos (Fig.11).

No se identificaron CRF al analizar las muestras mediante el programa RIP, el haplotipo 1 y haplotipo 2 corresponden al subtipo B del grupo M, con un umbral de confianza de 0.9.(Fig. 12).

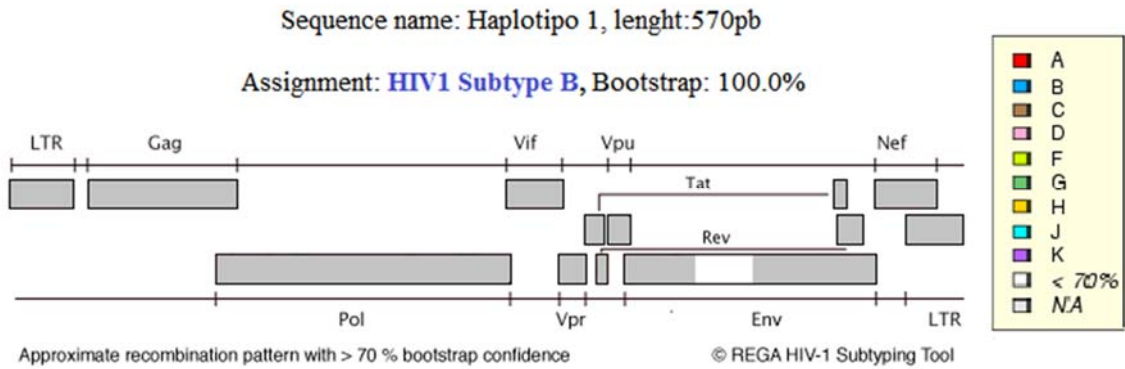


Figura 8 Asignación de subtipos por REGA subtyping tool para haplotipo 1. Fragmento de 570pb correspondiente a la forma pura del subtipo B (<70%). A: subtipo A, B: subtipo B,C: subtipo C, D: subtipo D, F: subtipo F, G: subtipo G, H,: subtipo H, J: subtipo J, K: subtipo K, NA: no aplica.

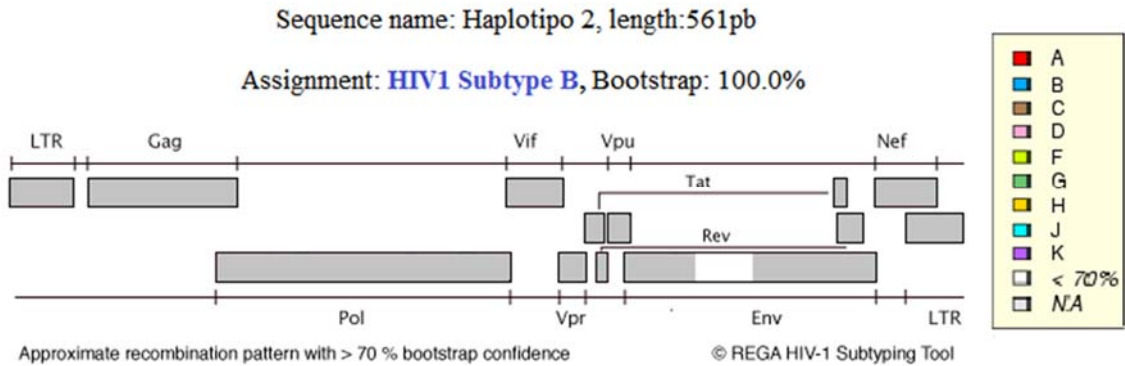


Figura 9 Asignación de subtipos por REGA subtyping tool para haplotipo 2. Fragmento de 561pb correspondiente a la forma pura del subtipo B (<70%). A: subtipo A, B: subtipo B,C: subtipo C, D: subtipo D, F: subtipo F, G: subtipo G, H,: subtipo H, J: subtipo J, K: subtipo K, NA: no aplica.

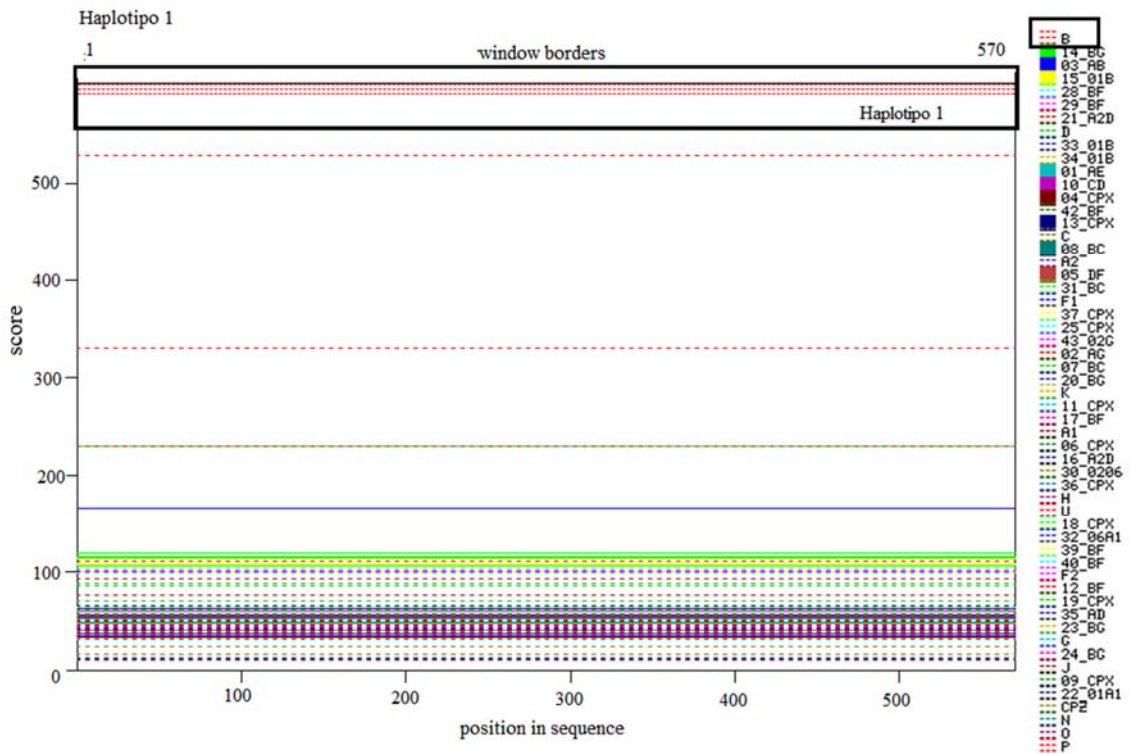


Figura 10. Identificación de subtipo para haplotipo 1 por programa Genotyping. La asignación se realizó por comparación con secuencias de referencia disponibles en BLAST. En la parte superior por código de colores se indica la secuencia con mayor similitud. El fragmento de 570pb del haplotipo 1 corresponde al subtipo B

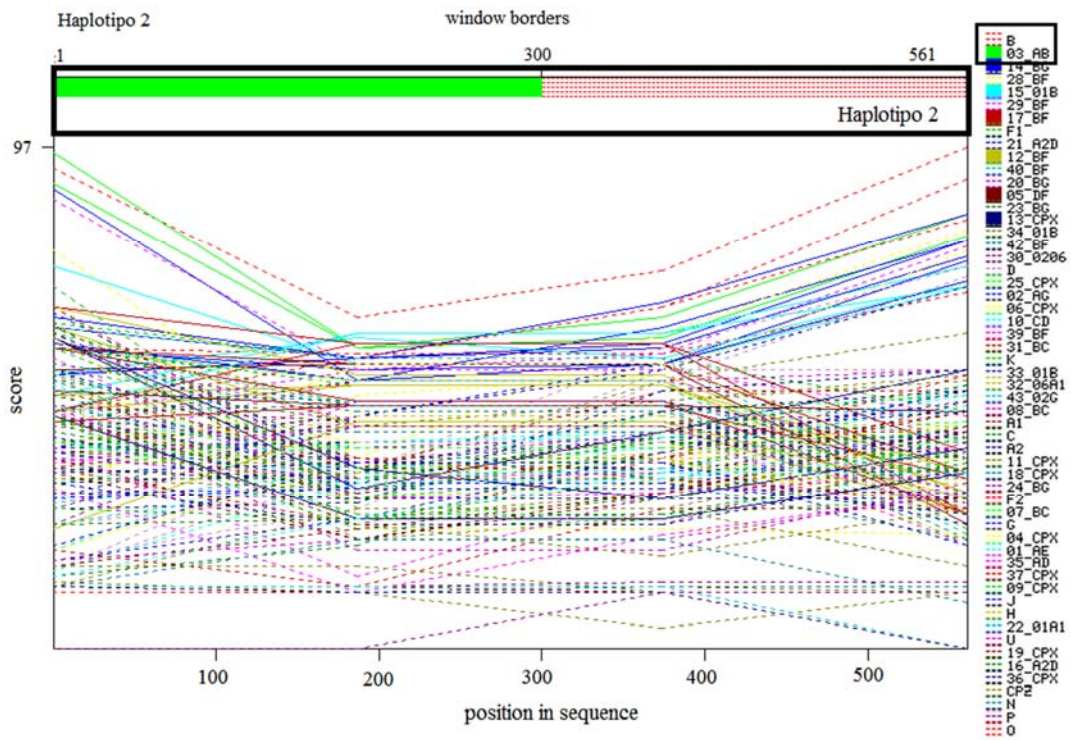


Figura 11. Identificación de subtipo para haplotipo 2 por programa Genotyping. La asignación se realizó por comparación con secuencias de referencia disponibles en BLAST. En la parte superior por código de colores se indica la secuencia con mayor similitud es la CRF_AB en las primeras 300pb y el subtipo B en las 261pb finales.

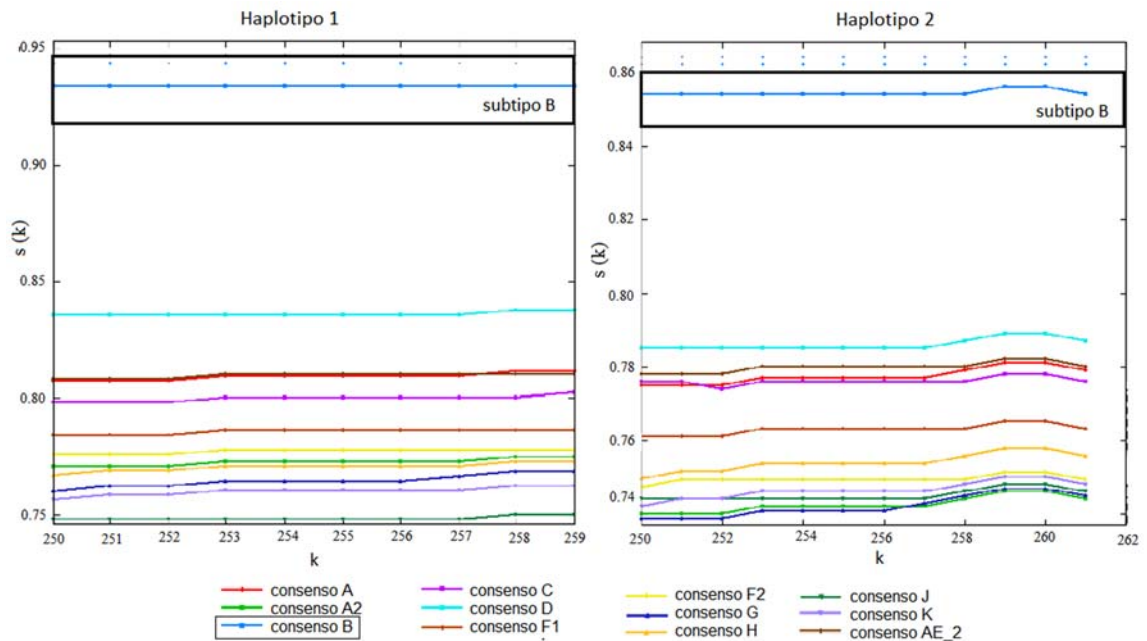


Figura 12. Identificación de subtipos por programa RIP. Tamaño de ventana 500 pb. Consenso A: subtipo A, consenso A2: subtipo A2, consenso B: subtipo B, consenso C: subtipo C, consenso D: subtipo D, consenso F1: subtipo F1, consenso F2: subtipo F2, consenso G: subtipo G, consenso H: subtipo H, consenso J: subtipo J, consenso K: subtipo K, consenso AE_2: forma recombinante circualente AB, de VIH-1. Haplotype 1 similar a subtipo B con >90% de confianza. Haplotype 2 similar a subtipo B con >85% de confianza.

5.5 Análisis filogenético

Al realizar el análisis filogenético se observa que todos los aislados identificados en el presente estudio se agrupan en el clado correspondiente al subtipo B del grupo M de VIH-1. La muestra VIH-162, correspondiente al haplotipo 2, se agrupa en un clado del grupo B junto con otras secuencias de aislados provenientes de Estados Unidos (Fig 13). No se identificaron clones para este haplotipo entre todas las muestras seleccionadas para el análisis. Las muestras correspondientes al haplotipo 1 (VIH-156, VIH-161, VIH-163, VIH-181) se identificaron como clones de otros aislados en EUA (no. acceso: JQ403040). Éstas muestras se agrupan en un clado junto la secuencia de

referencia de subtipo B aislada de Francia (no. acceso:K02013). El haplotipo 2 se agrupa en el mismo clado que otras secuencias del subtipo B correspondientes a paciente mexicanos de los estados de Jalisco, Nuevo León, Puebla y ciudad de México (Fig.13).

5.6 Variabilidad región V3 proteína gp120

La secuencia de 579 pb fue traducida a la secuencia de aminoácidos (AA) con el fin de identificar la variabilidad la proteína gp120 comparando con la secuencia consenso de VIH-1 subtipo B. En el haplotipo 1 la región corresponde a 172 aminoácidos correspondientes a la posición 282-453AA respecto a la secuencia de referencia del subtipo B HXB2 (Korber, et al., 1998) con un 97.7% de similitud. El haplotipo 2 se traduce a 168 aminoácidos, los cuales coinciden en la posición 282-453AA de HXB2(Korber, et al., 1998) con un 65.5% de similitud.

El polipéptido gp120 forma un asa correspondiente a la región variable 3 (V3) codificado por el gen *env*, en el haplotipo 1 tiene una extensión de 36 aminoácidos con un cambio de serina a arginina en la posición 11 según la secuencia consenso para el subtipo B (Milich, et al., 1993). Además presenta una delección del aminoácido 27 y una

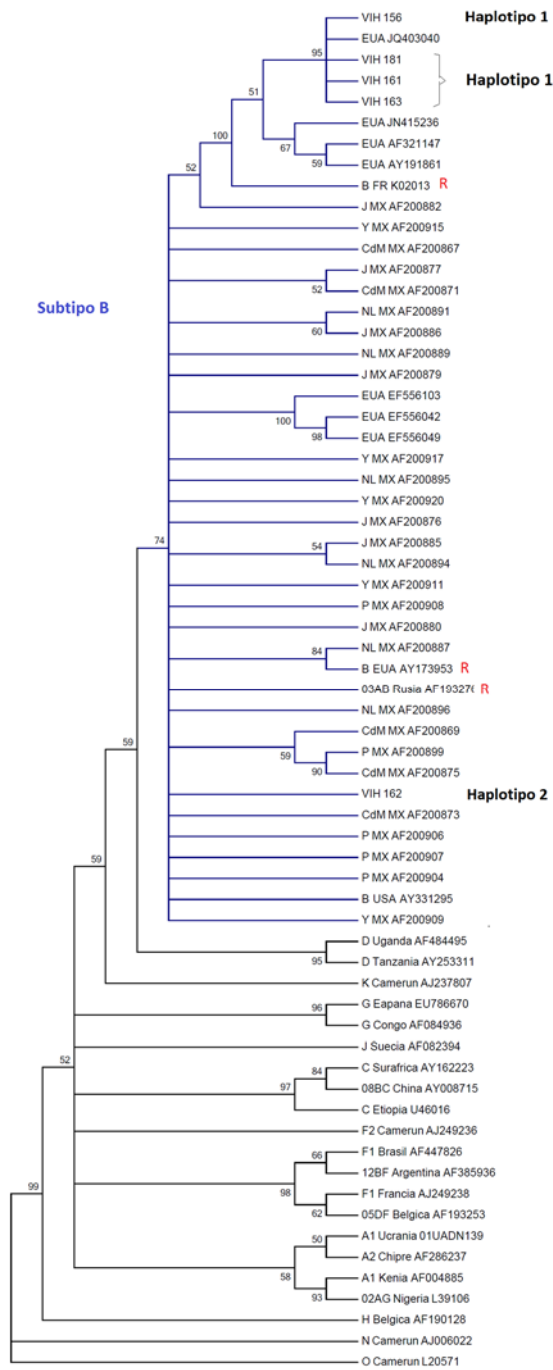


Figura 13. Relaciones filogenéticas de aislados de VIH-1 de Ensenada y Tijuana, Baja California. Para realizar el análisis se incluyeron secuencias de referencias de subtipos A-J, CRF basado en el gen *env* región gp120V3-V5. El nombre de cada rama indica país de origen y no. acceso a GenBank. Árbol Neighbor-Joining, modelo Kimura dos parámetros, 1000 bootstraps. R: secuencia de referencia para subtipo B. Las muestras VIH-156, VIH-161, VIH-163, VIH-181 corresponden a haplotipo 1 y VIH-162 es haplotipo 2.

inserción de glutamina y arginina posteriores a la posición 14 respecto a la secuencia consenso (Milich, et al., 1993), éstas modificaciones en la secuencia se relacionan con un tropismo a receptores CXCR4 (Papuashvili, et al., 2005). En el haplotipo 2 la región V3 tiene una longitud de 35 aminoácido, en el aminoácido 11 presenta un cambio de serina a glicina, el aminoácido 32 cambia a alanina y el aminoácido 34 se modifica por tirosina (Tabla 5). Éstos cambios por aminoácidos con carga positiva, indican un tropismo por receptores CCR5, específicamente a células macrófagos (Papuashvili, et al., 2005). En haplotipo 1 y haplotipo 2 el ápice del asa V3 corresponde a la forma predominante de VIH-1 subtipo B: glicina-prolina-glicina-arginina (GPGR). Se ubica entre el aminoácidos 15 y 18 (17-20 HXB2) de la secuencia consenso (Milich, et al., 1993).

Tabla 5. Patrones de cambios en la secuencia de aminoácidos de V3 gen *env*. Las secuencias se alinearon con el programa MEGA 5.10. Consenso: secuencia consenso de V3 de gen *env* (Milich, et al., 1993), HXB2 secuencia consenso subtipo B (no. acceso K03455)(Korber, et al., 1998). Haplotipo 1 presente delección de un aminoácido en posición 27(*), e inserción de glutamina y arginina de entre posición 13 y 14 (sombreado claro), un cambio a lisina en la posición 15 (azul). El haplotipo 2 presenta un cambio a glicina en la posición 11 (sombreado oscuro).

	1	2	2	3																																	
1	1	5	7	5																																	
	C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	H	I	.	.	G	P	G	R	A	F	Y	T	T	G	E	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C
HXB2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	R	-	Q	R	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	K	-	*	-	-	M	-	-	-	-
Hap 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	Q	R	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	K	-	*	-	-	M	-	-	-	-	
Hap 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	I	-	-	-	-	-	-	Y	-	

Sintetizando lo anteriormente mencionado, en Ensenada y Tijuana, Baja California se identificaron 2 haplotipos circulantes correspondiente al subtipo B de VIH-1. No se identificó una asociación entre la vía de transmisión y el haplotipo. El haplotipo 1 presenta tropismo a los receptores CCX4 y el haplotipo 2 se identifica con tropismos a receptores CCR5, los cuales se encuentran en las células macrófagos (Tabla 6).

Tabla 6. Síntesis de resultados. Se incluyen los datos de la encuesta epidemiológica y origen genético de muestras obtenidas de pacientes diagnosticados con VIH/SIDA en los municipios de Ensenada y Tijuana, Baja California. Por análisis de la región V3-V5 del gen *env* se identificaron dos haplotipos, correspondientes al subtipo B del grupo M de VIH-1, tropismo, el haplotipo 1 presenta tropismo a los receptores CCX4, es tropismo del haplotipo 2 es a los receptores CCR5.

	Haplotipo 1	Haplotipo 2
Muestras	VIH-156, VIH-161, VIH-163, VIH-181	VIH-162
Subtipo viral	Subtipo B	Subtipo B
Tropismo	Receptores CCX4	Receptores CCR5
Residencia del paciente	Ensenada y Tijuana, B.C.	Ensenada, B.C.
Comportamiento sexual	Heterosexual y homosexual	Heterosexual
UDI	SI/NO	NO
Antecedentes de los pacientes	Residencia >12 meses en EUA Nunca han viajado a EUA	Sin viajes a EUA Sin viajes fuera de Baja California
Origen genético	Similitud a subtipos B de aislados en EUA	Similitudes a subtipo B aislados del centro, sur y noreste de México

6. DISCUSIÓN

Características de la población

De los cinco pacientes a los que se les realizó el análisis genético, el 80% (4) fueron hombres, el 20% (1) de los pacientes se declaró como UDI, la edad promedio de los participantes fue de 45 años. El 80% de los pacientes hombres incluidos en éste estudio desarrolló la práctica de riesgo de relaciones sexuales con hombres sin protección. En Baja California, el grupo de mayor riesgo de infección por VIH son UDI (Mehta, et al., 2010, Strathdee, et al., 2008). Según reportes de CENSIDA (2012) el modo de transmisión por UDI corresponde al 2.6% de los casos nuevos en hombres, un menor porcentaje a la transmisión sexual (97.4%). La mayor incidencia se presenta en pacientes entre los 20 - 49 años de edad. El 73% de los pacientes infectados con VIH en México son hombres, donde la transmisión homosexual representa el 41.6% de los casos nuevos de VIH en hombres (CENSIDA, 2012). Los resultados presentados en éste estudio reflejan las características de la epidemia por VIH para México, en el modo de transmisión, grupos de riesgo y promedio de edad de los pacientes.

Calidad de la muestra y carga viral

En el presente estudio no se logró la amplificación de genes de VIH en pacientes bajo tratamiento antirretroviral y/o cargas virales indetectable (<50 copias RNA/mL), la carga mínima para obtener fragmentos de amplificación fue de 44,000 copias/mL. La extracción de RNA de VIH-1 se realizó utilizando el Kit High Pure Viral Acid Nucleic (Roche ®). Diversos autores han caracterizado a VIH partir de la amplificación de RNA viral. Por ejemplo, reportes de amplificaciones del genoma completo de VIH-1 a partir

de RNA extraído de suero sanguíneo con cargas virales entre 1,000 a 75,000 copias/mL (Nadai, et al., 2008). Vázquez Vals et al. (2010) reportó la identificación de subtipos de VIH-1 en pacientes mexicanos con una media de carga viral de 237, 543 copias/mL con tratamiento antirretroviral y 344,162 copias/mL para pacientes sin tratamiento antirretroviral. La caracterización del VIH-1 en México se ha realizado a partir de DNA provial y RNA, utilizando kits comerciales para la extracción de ácidos nucleicos (Eyzaguirre, et al., 2007, Rivera-Morales, et al., 2001). Otros autores han realizado la extracción y amplificación por PCR gel genoma viral mediante kits comerciales específicos para VIH (Vázquez-Valls, et al., 2010). Existen reportes de identificación de subtipos analizando el gen *env*, el gen *pol* y el gen *gag* a partir de DNA proviral de células mononucleadas (PBMC) (Delwart, et al., 1995, Luo, et al., 2011, Mezei, et al., 2011) y linfocitos con un límite de detección de 5 copias de DNA proviral por PCR o 50 copias de RNA viral por PCR (Van Laethem, et al., 1998). Es importante mencionar que en éstos últimos no se reporta la carga viral del paciente. Algunos autores han descartado la utilidad del Kit High Pure Viral Acid Nucleic (Roche ®) para obtener productos de amplificación por PCR de muestras con cargas virales menores a 2,137 copias/mL de VIH (Eiros, et al., 2002, Monleau, et al., 2009). Se han realizado trabajos de caracterización de VIH-1 en muestras de cargas virales indetectables de pacientes con tratamiento antirretroviral, el análisis se realizó utilizando RNA extraído de partículas virales concentradas de 8 mL de suero (Lopez, et al., 2010). Por lo anterior, se considera que la dificultad para obtener productos de amplificación de genes virales se debe a las bajas concentraciones de ácidos nucleicos (DNA proviral y RNA) causada por cargas virales bajas o indetectables (<50 copias RNA/mL) (Lopez, et al., 2010). En este

estudio se descarta que la calidad de la muestra utilizada no haya sido la adecuada, debido a que ésta se probó al amplificar el gen de hemoglobina exitosamente.

Identificación de subtipos de VIH-1

Al analizar un fragmento de 570 pb correspondiente al gen *env* V3-V5 se identificaron dos haplotipos distintos, ambos correspondientes al subtipo B del grupo M de VIH-1. Las diferentes herramientas utilizadas para la identificación de subtipo fueron consistentes, el programa REGA y RIP asignaron al haplotipo 1 y haplotipo 2 como subtipo B, el programa Genotyping indicó que el haplotipo 1 corresponde al subtipo B y el haplotipo 2 como el recombinante 03_AB. CRF. Se ha reportado la identificación de subtipo virales analizando el gen *env* con fragmentos de 149pb (Van Laethem, et al., 1998). En estudios de epidemiología molecular realizados en México se ha analizado el gen *env* (fragmento 800 pb) y gen *pol* identificando cepas circulantes correspondientes al subtipo B y recombinantes BF y BG (Eyzaguirre, et al., 2007, Rivera-Morales, et al., 2001, Vázquez-Valls, et al., 2010). Para la identificación de CRF, se recomienda utilizar la herramienta RIP, por su fidelidad en la asignación de subtipos recombinantes y sitios de recombinación (Siepel, et al., 1995). Al analizar la secuencia correspondiente al gen *env* V3-V5 del recombinante 03CRF_AB (Litsola, et al., 2004) con el programa RIP, se identifica ésta región como subtipo B. Por lo tanto, se considera al haplotipo 2 como subtipo B del grupo M como lo indican los resultados con otras herramientas de identificación.

El haplotipo 1 y haplotipo 2 fueron identificados como subtipo B de VIH-1 por el programa REGA. Éste programa requiere un fragmento de mínimo de 800 pb para la identificación de subtipos virales pero en fragmentos más pequeños, como el utilizado para éste análisis, realiza la asignación con el mismo método pero únicamente comparado con secuencias de subtipos virales y con bootstrap menor al 70% (Oliveira, et al., 2005). Debido a que los resultados generados por los distintos programas utilizados para la asignación de subtipos identifican ambos haplotipos como subtipo B, se confirma éste subtipo como predominante en la región. Pero debido al número de muestras y el tamaño del fragmento analizado, no es posible descartar que en la región existan CRF las cuales ya se han identificadas en el país (Vázquez-Valls, et al., 2010).

El haplotipo 1 se identificó como clon de aislados de subtipo B de Estados Unidos (JQ403040). La muestra de Estados Unidos (JQ403040) corresponde a un aislado en fase aguda o crónica con bajas cargas virales, correspondiente al subtipo B (Henn, et al., 2012). Se ha reportado que en Tijuana el 20% de UDI ha viajado a Estados Unidos durante al año anterior al reporte (Strathdee, et al., 2008), el 45% de hombres que tienen sexo con otros hombres (HSH) de Tijuana y el 75% de HSH de San Diego reportan tener parejas sexuales al otro lado de la frontera (Iñiguez-Stevens, et al., 2009). Se reportó que el 65%, de 116 VIH positivos residentes de California, EUA cruzaron la frontera a México al menos una vez al mes (Eyzaguirre, et al., 2007). Otro estudio afirma que el 22% de los migrantes que regresan voluntariamente a México son VIH positivos (Rangel, et al., 2006). Analizando el gen *pol* en pacientes infectados con VIH residentes de San Diego (EUA) y Tijuana (México) se identificaron como subtipo B las cepas

circulantes además de no observarse estructura poblacional entre las dos localidades (San Diego $F_{ST}=0.07$, $p<0.01$; Tijuana $F_{ST}=0.08$, $p<0.01$) (Mehta, et al., 2010). El constante flujo poblacional entre las ciudades fronterizas de ambos países se refleja en los resultados obtenidos donde las secuencias del haplotipo 1 se identifica como clon de aislados en Estados Unidos, por lo que se infiere que éstas relaciones filogenéticas observadas entre las secuencias de México y Estados Unidos se deben a los movimientos migratorios entre ambos países, especialmente de los grupos de riesgo, lo cual no permite que existe diferencias entre las cepas circulantes a ambos lados de la frontera.

El número de diferencias nucleotídicas los haplotipos identificados respecto a la secuencia de referencia (9.48%) es mayor a los reportado en México (8.9%) (Rivera-Morales, et al., 2001). El haplotipo 2 presenta un 17.38% de diferencias en la secuencia, un valor semejante a otras cepas del subtipo B aislados en México, ésta relación del haplotipo 2 y cepas mexicanas también se demuestra en el análisis filogenético (Fig 13), al agruparse con muestras provenientes de la Cd de México, Yucatán, Jalisco y Nuevo León (Rivera-Morales, et al., 2001). El paciente en quien se identificó la cepa correspondiente al haplotipo 2 declaró que no ha visitado Estados Unidos ni otro estado de México, ni es UDI por lo que se sospecha que su pareja lo infectó con una cepa proveniente del centro o sur de México.

En el análisis filogenético no se observó diferencia entre los haplotipos y el municipio de muestreo (Ensenada y Tijuana) ni un agrupamiento de las cepas según la vía de transmisión (He, Ho, UDI). Rivera-Morales et al. (2001) no identificó asociación entre el subtipo viral y lugar del muestreo en muestras tomadas en el centro, sur y

noreste de México. Eyzaguirre et. al (2007) reportan no haber identificado una relación entre las cepas virales (n=11) y el modo de transmisión (UDI o transmisión sexual) en Tijuana y Cd Juárez, México. Éste mismo comportamiento se observa en los datos analizados, probablemente ocurre por el constante contacto de los grupos de riesgo lo cual no permite la estructuración poblacional de las cepas virales circulante. Sin embargo, es necesario incrementar el número de muestras para poder descartar o confirmar una relación entre las cepas, distribución geográfica y vía de transmisión en la zona fronteriza.

Variabilidad de secuencia en asa V3 de la proteína gp 120

En la secuencia del polipéptido gp120 en la región V3, el haplotipo 1 y haplotipo 2 presentan modificaciones de aminoácidos en las posiciones 11 y 25, sitios donde son más comunes cambios en la secuencia (Korber, et al., 1998, Papuashvili, et al., 2005). En el haplotipo 1 tanto en la posición 11 y posición 25 se presenta sustituciones por aminoácidos básicos, éstas características en el asa V3 del polipéptido gp120 indica que el virus presenta tropismos a linfocitos y macrófagos con receptores CXCR4 (Korber, et al., 1998, Papuashvili, et al., 2005). Se ha identificado que cepas con tropismo a receptores CXCR4 tienden a formar sincitios, lo cual se relaciona con un infección más rápida y agresiva (Esbjornsson, et al., 2010, Papuashvili, et al., 2005). En el haplotipo 2 las sustituciones de aminoácidos en posiciones 11 y 25, no modifican la carga total del polipéptido debido a que en la posición 11 se presenta una sustitución de serina por glicina ambos aminoácidos polares no cargados. La secuencia y carga de aminoácidos de ésta región indica que es una cepa no formadora de sincitios (Korber, et al.,

1998, Papuashvili, et al., 2005) con tropismo hacia macrófagos con receptores CCR5 (Chesebro, et al., 1996). Se ha reportado que en pacientes infectados con cepas con tropismo a los receptores CCR5 no presentan beneficios al ser tratados con el medicamento maraviroc, (Westby, et al., 2010) un inhibidor de fusión (García-Vellejo, et al., 2003). Éste es un medicamento antirretroviral que se utiliza en pacientes con resistencia múltiple a otros medicamentos (CONASIDA, 2012a)

La información generada en estudio, permite tomar decisiones más adecuadas para el tratamiento de los pacientes. En el caso del paciente VIH-162, en caso de presentar resistencia múltiple a otros antirretrovirales, se sugiere que se evite el uso de maraviroc, una alternativa puede ser enfuvirtida un medicamento inhibidor de fusión, además se recomienda un seguimiento del paciente ya que el fenotipo que presenta la región V3 genera infecciones crónicas (Esbjornsson, et al., 2010, Milich, et al., 1993). En los pacientes VIH-156, VIH-161, VIH-163, VIH-181 se sugiere un monitoreo constante del conteo de células CD4 y tratamiento terapéutico para retrasar en lo posible el desarrollo agudo de la infección de VIH.

7. CONCLUSIONES

1. El subtipo de VIH-1 predominante en las cinco muestras analizadas de pacientes en Ensenada y Tijuana, Baja California corresponde al subtipo B. La identificación se realizó del análisis del gen *env* región gp120 V3-V5. No se identificaron CRF, pero debido al tamaño de muestra y análisis único del gen *env* no es posible descartar la prevalencia de éstas formas virales u otros subtipos virales.
2. Se identificó diferencia en el tropismo viral en cada uno de los haplotipos descritos. Basado en la secuencia del polipéptido en el asa V3 se identifica al haplotipo 1 con tropismo a los receptores CXCR4, característica relacionada con la posible formación de sincitios lo cual provoca una infección más agresiva. El haplotipo 2 presenta tropismo a los receptores CCR5.
3. El haplotipo 1 presenta mayores similitudes a secuencias aisladas y con origen en Estados Unidos, lo cual se atribuye al constante contacto poblacional entre las ciudades fronterizas, sugiriendo que esta cepa viral proviene de Estados Unidos.
4. El haplotipo 2 presenta características genéticas similares a otras cepas virales originarias del centro y sur de México.
5. No se identificó diferencias entre el haplotipo, práctica de riesgo, lugar de muestreo, origen del paciente y sexo del paciente.

8. RECOMENDACIONES

Para continuar con éste proyecto de investigación se recomienda:

1. Realizar la identificación de los subtipos de VIH-1 circulantes en la región a través de muestras que presenten las siguientes características:
 - a. Cuantificar la carga viral previo al análisis genético
 - b. Los pacientes se encuentren sin tratamiento antirretroviral y con cargas virales mínimas de 44,000 copias/mL.
 - c. Se mantenga en red de frio desde la toma y almacenaje

2. En muestras con cargas virales menores a 44,000 copias/mL se sugiere realizar la extracción de RNA con el el Kit QIAamp Viral RNA (QIAgen®), del cual se reporta alta sensibilidad, y no utilizar el kit High Pure Viral Acid Nucleic (Roche ®). Otra estrategia a seguir es realizar la extracción de RNA a partir de partículas virales concentradas por la centrifugación del suero sanguíneo.

3. Incrementar el tamaño de la secuencia del gen *env*, además de realizar la amplificación del gen *pol* y/o *gag* para confirmar o descartar la presencia de CRF y otros subtipos virales en Ensenada y Tijuana, Baja California.

9. LITERATURA CITADA

- 1 Agwale, S, Robbins, K, Odama, L, Saekhou, A, Zeh, C, Edubio, A, Njoku, O, Sani-Gwarzo, N, Gboun, M, Gao, F, Reitz, M, Hone, D, Folks, T, Pieniazek, D, Wambebe, C, Kalish, M. 2001, Development of an env gp41-Based Heteroduplex Mobility Assay for Rapid Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtyping. *Journal of clinical Microbiology* 39 (6), 2120-2114,
- 2 AIDSinfo. 2011, <http://www.unaids.org>.
- 3 Aitken, S, Kliphuis, A, Wallis, C, Chu, M, Fillekes, Q, Barth, R, Stevens, W, Rinke, T, Schuurman, R. 2012, Development and evaluation of an assay for HIV-1 protease and reverse transcriptase drug resistance genotyping of all major Journal of Clinical Virology 54 21-25,
- 4 Alcantara, JLC, Cassol, S, Libin, P, Deforche, K, Pybus, OG, Van Ranst, M, Galvão'Castro, B, Vandamme, A, de Oliveira, T. 2009, A standardized framework for accurate, high-throughput genotyping of recombinant and non-recombinant viral sequence. *Nucleic Acids Research* 1-9,
- 5 Barré-Sinoussi, F, Chermann, JC, Ret, F, Nugeyre, MT, Chamaret, S, Gruest, J, Dauguet, C, Axler-Blin, C, Vézinet-Brun, F, Rouzioux, C, Rozenbaum, W, Montagnier, L. 1983, Isolation of a T-Lymphotropic retrovirus from a patient ar risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220 (4599), 868-871,
- 6 Brodine, S, Garland, F, Mascola, J, Porke, K, Artenstein, A, Burke, D, Weiss, P, McCutchan, F. 1995, Detection of diverse HIV-1 genetic subtypes in the USA. *The Lancet* 346 (8984), 1198-1199,
- 7 Brodine, S, Starkev, M, Shaffer, R, Ito, S, Tasker, S, Barile, A, Tamminga, C, Stephan, K, Aronson, N, Frase, S, Wallace, M, Wegner, S, Mascola, J, McCutchan, F. 2003, Diverse HIV1 subtypes and clinical, laboratory and behavioral factors in a recently infected US military cohort. *AIDS* 17 (17),
- 8 Brooks, G, Butel, J, Morse, S: *Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg*, 18 ed. p. 786. Manual Moderno, 2005
- 9 Buonaguro, L, Tagliamonte, M, Tornesello, M, Buonaguro, F. 2007, Genetic and phylogenetic evolution of HIV-1 in a low subtype heterogeneity epidemic: the Italian example. *Retrovirology* 4 (34),
- 10 California, EB: *Baja California: VIH-SIDA en un problema de salud pública real?*, ed. California EB. 2009
- 11 Carr, J, Laukkanen, T, Salminenb, M, Albertc, J, Alaeusc, A, Kima, B, Sanders-Buella, E, Birxd, D, McCutchana, F. 1999, Characterization of subtype A HIV-1 from Africa by full genome sequencing. *AIDS* 13 1819-1826,
- 12 CDC. 1981a, Kaposi's Sarcoma and Pneumocytus Pnsumonia among homosexual men- New York city and California. *MMWR* 30 306-308,

- 13 CDC. 1981b, Pneumocytis Pneumonia--Los Angeles. MMWR 30 250-252,
- 14 CENSIDA: El VIH/SIDA en México 2009, ed. CENSIDA. México, D.F, 2009
- 15 CENSIDA. 2012, Vigilancia epidemiológica de casos de VIH/SIDA en México. Registro Nacional de Casos de SIDA,
- 16 Chesebro, B, Wehrly, K, Noshio, J, Perryman, S. 1996, Mapping of independent V3 envelope determinants of human immunodeficiency virus type 1 macrophage tropism and syncytium formation in lymphocytes. *Journal of Virology* 70 (12), 9055-9059,
- 17 CONASIDA: Guía de manejo antirretroviral de las personas con VIH, ed. CONASIDA, Cuarta ed., 2009
- 18 CONASIDA. 2012a, Guía de manejo antirretroviral de las personas con VIH.
- 19 CONASIDA. 2012b, Guía de manejo de antirretrovirales de las personas que viven con el VIH y lineamientos para el tratamiento en adultos para instituciones públicas del sistema nacional de salud.
- 20 Córdova, JL, S, Veldespio, J: 25 años de SIDA en México. Logros, desaciertos y retos, Primera ed. p. 406. Instituto Nacional de Salud Pública. Secretaría de Salud. CENSIDA, 2010
- 21 Delwart, E, Herring, B, Allen, R, Mullins, J. 1995, Genetic Subtyping of Human Immunodeficiency Virus Using a Heteroduplex Mobility Assay. *Genome Research* 4 S202-S216,
- 22 Delwart, E, Shpaer, E, Louwagie, J, McCutchan, F, Grez, M, Rubsamen-Waigmann, H, Mullins, J. 1993, Genetic Relationships Determined by a DNA Heteroduplex Mobility Assay: Analysis of HIV- 1 env Genes. *Science* 262 1257-1261,
- 23 Duri, K, Stray-Pedersen, B, Muller, F. 2013, HIV diversity and clasification, role in transmission. *Advances in infectious diseases* 3 146-156,
- 24 Eaterbrook, P, Smith, M, Mullen, J, O'Shea, S, Chrystie, I, Rulter, A, Tatt, I, Geretti, AM, Zuckerman, M. 2010, Impact of HIV-1 viral subtype on disease progression and response to antiretroviral therapy. *Journal of the International AIDS Society* 13 (4),
- 25 Eiros, J, Labayru, C, Hernández, B, Ortiz, R, Rodríguez, A. 2002, Comparative Study of Two Methods for RNA Extraction Prior to Detection of Resistance to Human Immunodeficiency Virus Type 1 with the Line Probe Assay. *Journal of clinical Microbiology* 40 (6), 2257-2259,
- 26 EPI, BC: Baja California: ¿VIH-SIDA en un problema de salud pública real?, ed. California EB. 2009
- 27 Esbjornsson, J, Mansson, F, Martinez-Arias, W, Vincic, E, Biague, A, da Silva, Z, Fenyó, E, Medstrand, P. 2010, Frequent CXCR4 tropism of HIV-1 subtype A and CRF02_AG during late-stage disease-indication of an evolving epidemic in West Africa. *Retrovirology* 7 (23),

- 28 Eyzaguirre, L, Brouwer, KC, Nadai, Y, Patterson, TL, Ramos, R, Firestone, C, Orozovich, P, Strathdee, SA, Carr, JK. 2007, First molecular surveillance report of HIV type 1 in injecting drug user and female sex workers along the U.S- Mexico border. *AIDS Res Hum Retroviruses* 23 (2), 331-334,
- 29 Freitas, A, Figueirêdo, E, Guernica, J, Fiorini, A, Geessien, E, Peregrino, P. 1999, Genetic variability of HIV-1 isolates from Minas Gerais, Brazil. *Revista de Microbiología* 30 141-143,
- 30 García-Vellejo, F, Domínguez, M. 2003, La genotipificación y fenotipificación de la resistencia del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) a los fármacos antirretrovirales. *Colombia Médica* 34 (3), 143-154,
- 31 Gómez, M, Salomon, H, Pando, M, Kijak, G, Avila, M. 2001, Distribución de subtipos y recombinantes del HIV, situación en la Argentina. *Medicina* 61 (6), 881-889,
- 32 Henn, M, Boutwell, C, Charlebois, P, Lennon, N, Power, K, Macalalad, A, Berlin, A, Malboeuf, C, Ryan, E, Gnerre, S. 2012, Whole genome deep sequencing of HIV-1 reveals the impact of early minor variants upon immune recognition during acute infection. *PLOS Pathogens*,
- 33 Holguín, A, Ramírez de Arrellano, E, Rivas, P, Soriano, V. 2006, Efficacy of antiretroviral therapy in individuals infected with HIV-1 non-B sybtypes. *AIDS Reviews* 8 98-107,
- 34 Holguín, A, Soriano, V. 1998, ¿Cuántos VIH existen? . *Medicina Clínica* 110 (17), 657-661,
- 35 Iñiguez-Stevens, E, Brouwer, KC, Hogg, RS, Patterson, TL, Lozada, R, Magis-Rodríguez, C, Elder, J, Viani, RM, Strathdee, S. 2009, Estimaciones de prevalencia del VIH por género y grupode riesgo en Tijuana, México:2006. *Gaceta Médica de México* 145 (3), 189-195,
- 36 Kanki, PJ, Hamel, DJ, Sankalé, J-L, Hsieh, C-c, Thior, I, Barin, F, Woodcock, S, Guéye-Ndiaye, A, Zhang, E, Montano, M, Siby, T, Marlink, R, NDoye, I, Essex, M, MBroup, S. 1999, Human Immunodeficiency Virus type 1 subtypes differ in disease progression. *The Journal of Infectious Diseases* 179 68-73,
- 37 Korber, BI, Foley, BT, Pillai, SK, Sodroski, JG. 1998, Numbering positions in HIV relative to HXB2CG. 102-111,
- 38 Kostense, S, Raaphorst, FN, D, Joling, J, Hooibrink, B, Pakker, N, Danner, ST, J, Miedema, F. 1998, Diversity of the T-cell receptor BV repertoire in HIV-1-infected patients reflects the biphasic CD4+ T-cell repopulation kinetics during highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 12 (18), F235-F240,
- 39 Laguna-Torres, A, Olson, J, Sánchez, J, Montano, S, Chauca, G, Carrion, G, Romero, A, Ríos, A, Ríos, J, Gamero, M, Sovero, M, Pérez-Bao, J, Carr, J. 2005, Distribución de los Subtipos del VIH-1 en nueve países de América del Sur, 1995-2002. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 22 (1), 12-18,

- 40 Librado, P, Rozas, J. 2009, DnaSP v5 a software for comprehensive analysis od DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25 1454-1452,
- 41 Litsola, K, Holm, K, Bobkov, A, Pokrovsky, V, Smolskaya, T, Leinikki, P, Osmovov, S. 2004, An AB recombinant and Its parental HIV type 1 strains in the area of the former Soviet Union: low requirements for sequence identity in recombination. *AIDS Research and Human Retroviruses* 16 (11),
- 42 Llano, A: Factores del Huésped que afectan a la progresión de la Infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana del tipo 1 (VIH-1) p. 126. Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, 2004
- 43 Lopez, CA, Vazquez, M, Hiil, MD, Colon, M, Porrata'Doria, T, Johnston, I, Lorenzo, E. 2010, Characterization of HIV'1 RNA forms in the plasma of patients undergoing successful HAART. *Archives of Virology* 155 895-903,
- 44 Luo, H, Su, QS, YM, Xing, H, Chen, J, Liu, W, Zhang, ZZ, N, Xiao, XL, H. 2011, Rapid identification fo human immunodeficiency virus type 1 CRF01_AE and BC recombinants by subtype-specific PCR. *Journal of Virological Methods* 171 339-344,
- 45 Mehta, SR, Delport, W, Brouwer, K, Espitia, S, Patterson, T, Kosakovsky, S, Strathdee, S, Smith, D. 2010, The relatedness of HIV epidemics in the United States-Mexico border region. *AIDS Research and Human Retroviruses* 26 (12), 1273-1277,
- 46 Mezei, M, Áy, E, Koroknai, A, Tóth, R, Balázs, A, Bakos, A, Gyóri, ZB, F Marschalkó, M, Kárpáti, SM, J. 2011, Molecular epidemiological analysis of env and pol sequences in Newly diagnosed HIV type 1-infected, untreated patients in Hungary. *AIDS Research and Human Retroviruses* 27 (00),
- 47 Milich, L, Margolin, B, Swanstrom, R. 1993, V3 loop of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 env protein: interpreting sequence variability. *Journal of Clinical Virology* 67 5623-5634,
- 48 Monleau, M, Montavon, C, Laurent, C, Segondy, M, Montes, B, Delaporte, E, Boillot, F, Peeters, M. 2009, Evaluation of different RNA extraction methods and storage conditions of dried plasma or blood spots for Human Immunodeficiency Virus type 1 RNA quantification and PCR amplication for drug resistance testing. *Journal of clinical Microbiology* 47 (4), 1107-1118,
- 49 Montagnier, L, Chermann, JC, Barré-Sinoussi, F, Chamaret, S, Gruest, J, Nugeyre, MT, Rey, F, Dauguet, C, Axler-Blin, C, Vezinet-Brun, F, Rouzioux, C, Saimot, GA, Rozenbaum, W, Gluckman, JC, Vilmer, E, Griscelli, C, Foyer-Gazengel, C, Brunet, JB. 1984, A new human T-lymphotropic retrovirus: characterization and possible role in lymphadenopathy and acquired immune deficiency syndromes. *Human T cell leukemia/lymphoma viruses* 363-379,
- 50 Monzón, M, Weissenbacher, M: Virus de la Inmunodeficiencia Humana. *In: Mibrobiología biomédica. Bacteriología, Micología, Virología, Parasitología, Inmunología.* , eds. Basualdo J, Coto CTorres R, pp. 935-953. Editorial Atlante, 2006

- 51 Morgulis, A, Coulouris, G, Raytselis, Y, Medden, T, Agarwala, R, Schaffer, A. 2008, Database indexing for production MegaBLAST Searches. *Bioinformatics* 24 1757-1764,
- 52 Nadai, Y, Eyzaguirre, L, Constantine, N, Sill, A, Cleghorn, F, Blattner, W, Carr, J. 2008, Protocol for Nearly Full-Length Sequencing of HIV-1 RNA from Plasma. *PLoS ONE* 3 (1), e1420,
- 53 Oliveira, T, Deforche, K, Cassol, S, Salminen, M, Paraskevis, D, Seebregts, C, Snoeck, J, Rensburg, E, Wensing, A, Vijver, D, Boucher, C, Camacho, R, Vandamme, A. 2005, An automated genotyping system for analysis of HIV-1 and others microbial sequences. *Bioinformatics* 21 (19), 3797-3800,
- 54 ONUSIDA: Situación de la epidemia de SIDA. 2009
- 55 ONUSIDA. 2012, Hoja Informativa regional 2012: America Latina.
- 56 Papuashvili, M, Novokhatsky, A, Shcherbakova, T. 2005, Characteristics of HIV-1 env1 V3 loop sequences for subtype A1 variant spread in Eastern Europe. *Infection, Genetics and Evolution* 5 45-53,
- 57 Pérez, L. 2000, Biología molecular del virus de la inmunodeficiencia humana y los recientes progresos en el tratamiento del SIDA. *Revista Chilena de Pediatría* 71 (2),
- 58 Posada, D, Crandall, K. 1998, Modeltest testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14 (9), 817-818,
- 59 Rangel, MG, Martínez-Donate, AP, Hovell, MF, Santibáñez, J, Sipan, CL, Izazola-Licea, JA. 2006, Prevalence of risk factors for HIV infection among Mexican migrants and immigrants: probability survey in the north border of Mexico. *Salud Pública de México* 48 (1),
- 60 Resino, S, Bellón, J, Jiménez, J, Gurbindo, D, Muñoz-Fernández, M. 2000, Manifestaciones clínicas y marcadores biológicos en la historia natural de la infección por el VIH-1 en niños infectado verticalmente. Estudio longitudinal. *An Pediatr* 52 (2), 138-147,
- 61 Rivas, P, Holguín, A, Ramirez, E, Muñoz-Almagro, C, Delgado, R, Ortiz, R, Soriano, V. 2006, Tratamiento antirretroviral según tipos y subtipos del virus de la inmunodeficiencia humana. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 24 (2), 29-33,
- 62 Rivera-Morales, L, Novitsky, V, Trujillo, R, Lavallo-Montalvo, C, Cano-Dominguez, C, Ramos-Jimenez, J, Jimenez-Rios, E, Flores-Flores, L, Lopez-Guillen, P, Gilbert, P, Vannberg, F, Tamez-Guerra, R, Rodriguez-Padilla, C, Essex, M. 2001, The Molecular Epidemiology of HIV Type 1 of Men in Mexico. *AIDS Research and Human Retroviruses* 17 (1), 87-92,
- 63 Rozanov, M, Plikat, U, Chappey, C, Kochergin, A, Talusova, T. 2004, A web based genotyping resource for viral sequence. *Nucleic Acids Research* 32 (W654-W659),

- 64 Salgado, N, González, T, Bojórquez, I, Infante, C: Migración México-Estados Unidos consecuencias para la salud, Primera ed. Morelos, México, 2007
- 65 Siepel, A, Halpern, A, Macken, C, Kprber, B. 1995, A computer program designed to screen rapidly for HIV type I intersubtype recombinant sequence. *AIDS Research and Human Retroviruses* 11 1413-1416,
- 66 Sierra, J. 2004, Taxonomía y Virus de la Inmunodeficiencia Humana. *Rev Mex Patol Clin* 51 (1), 37-41,
- 67 Sola, J, Urtasun, I, Repáraz, J, Castiello, J. 1999, Variabilidad Genética del VIH-1 en Navarra. *ANALES Sis San Navarra* 22 (3), 181-187,
- 68 Strathdee, S, Lozada, R, Pollini, RA, Brouwer, K, Mantsios, A, Abramovitz, D, Rhodes, T, Latkin, C, Loza, O, Alvelais, J, Magis-Rodriguez, C, Patterson, T. 2008, Individual, social and environmental influences associated with HIV infection among injection drug users in Tijuana, Mexico. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 47 (3), 369-376,
- 69 Swofford, DL: PAUP* Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods), 4 ed. Sinauer Associates Sunderland, Massachusetts, 1998
- 70 Takebe, Y, Uenishi, R, Li, X. 2008, Global Molecular Epidemiology of HIV: Understanding the Genesis of AIDS Pandemic. *Advances in Pharmacology* 56 1-25,
- 71 Tamura, K, Peterson, D, Pedersen, N, Stecher, G, Nei, M, Kumar, S. 2011, MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*,
- 72 Taylor, B, Sobieszczyk, M, McCuthan, F, Hammer, S. 2008, The Challenge of HIV-1 subtype diversity. *The New England Journal of Medicine* 358 (15), 1590-1602,
- 73 Van Laethem, K, Beusalinck, K, Van Dooren, S, De Clercq, E, Desmyter, J, Vandamme, A. 1998, Diagnosis of human immunodeficiency virus infection by a polymerase chain reaction assay evaluated in patients harbouring strains of diverse geogepical origin. *Journal of Virological Methods* 70 153-166,
- 74 Vázquez-Valls, E, Escoto-Delgadillo, M, López-Márquez, FC-M, M, Echegaray-Guerrero, E, Bitzer-Quintero, O, Kobayashi-Gutiérrez, A, Torres-Mendoza, B. 2010, Molecular Epidemiology of HIV Type 1 in Mexico: Emergence of BG and BF Intersubtype Recombinants. *AIDS Research and Human Retroviruses* 26 (7), 777-781,
- 75 Wain-Hobson, S, Sonigo, P, Danos, O, Cole, S, Alizon, M. 1985, Nucleotide sequence of the AIDS Virus, LAV. *Cell* 40 8-17,
- 76 Westby, M, Ryst, E, Evid. 2010, CCR5 antagonists: host-targeted antiviral agents for the treatment of HIV infection, 4 years on. *Antiviral Chemistry El Chemotherapy* 20 179-192,

10. ANEXOS

10.1 Consentimiento informado



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
ESCUELA DE CIENCIAS DE LA SALUD
UNIDAD VALLE DORADO, CAMPUS ENSENADA**



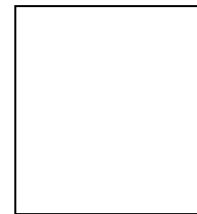
CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

Por este conducto hago constar que de forma voluntaria consiento en que el (la) doctor (a) _____ de la Escuela de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma de Baja California procese las muestras clínicas obtenidas de mi persona para el diagnóstico, caracterización o transformación necesarias para que se cubran los protocolos de investigación actuales y futuros en los que sean requeridos, en el entendido de que lo obtenido será manejado con absoluta discreción y podrá ser compartido o publicado mientras se me mantenga en el anonimato, evitando utilizar mi nombre, iniciales o folios que me relacionen de alguna manera.

Entiendo que el análisis de dichas muestras, se enfocará a la infección por Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) y que el laboratorio donde serán procesadas estas muestras es de investigación y no de referencia, lo que podría implicar un retardo en la entrega de resultados.

Nombre del Paciente _____

Firma del paciente _____




Índice derecho

NOMBRE Y FIRMA DE QUIEN TOMÓ LA MUESTRA

Expedida en la ciudad de Ensenada, Baja California, México a los _____ días del mes de _____ de 20____.

10.2 Encuesta epidemiológica

		*CÉDULA DE MONITOREO 2013 PROGRAMA DE ACCIÓN VIH/ITS CENSIDA		Código Laboratorio Epidemiología molecular	
*Modificaciones para el proyecto "Identificación subtipo VIH" Escuela Ciencias de la Salud UABC					
1.- INSTITUCIÓN NOTIFICANTE					
Jurisdicción Sanitaria					
Localidad		Municipio		Entidad Federativa	
IR2 Lugar de aplicación de la cédula y toma de muestra:					
CAPASITS <input type="checkbox"/>		"Picadero" <input type="checkbox"/>		SAI <input type="checkbox"/>	
Centro tratamiento por consumo de drogas/alcohol <input type="checkbox"/>		Zona de Trabajo sexual <input type="checkbox"/>		Centro de Salud/Hospital <input type="checkbox"/>	
Feria de Salud/semana o día mundial <input type="checkbox"/>		Antro, Bar, Disco, Centro nocturno <input type="checkbox"/>		Intalación OSC <input type="checkbox"/>	
Albergue temporal <input type="checkbox"/>		Cárceles/prisiones <input type="checkbox"/>			
Otra Especificar: _____ <input type="checkbox"/>					
2.- DATOS SOCIODEMOGRÁFICOS					
DS1 Edad en años cumplidos: / / años					
DS2 Sexo de nacimiento: Femenino <input type="checkbox"/> Masculino <input type="checkbox"/>					
DS3 Escolaridad: Primaria <input type="checkbox"/> Secundaria <input type="checkbox"/> Bachillerato <input type="checkbox"/> Carrera técnica <input type="checkbox"/>					
Profesional/Licenciatura <input type="checkbox"/> Postgrado <input type="checkbox"/> No sabe leer ni escribir <input type="checkbox"/>					
DS3.1 Concluyó el grado académico que nos mencionó: Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>					
DSa1 Oficio o profesión: Empleado <input type="checkbox"/> Profesor <input type="checkbox"/> Desempleado <input type="checkbox"/>					
Otro(especifique) _____ <input type="checkbox"/> Negocio propio <input type="checkbox"/> Ama de casa <input type="checkbox"/> Comerciante <input type="checkbox"/>					
DS4 Estado Civil: Soltero <input type="checkbox"/> Casado <input type="checkbox"/> Viudo <input type="checkbox"/> Divorciado <input type="checkbox"/> Unión libre <input type="checkbox"/>					
DSa2. Lugar de residencia (municipio, estado) _____					
DSa2.1 Lugar de nacimiento (municipio, estado) _____ Tiempo de residencia _____					
DSa2.2 Mencione los lugares de residencia después del lugar de nacimiento					
Lugar _____ Estado _____ Tiempo de residencia _____ Año de llegada _____ Año de partida _____					
Lugar _____ Estado _____ Tiempo de residencia _____ Año de llegada _____ Año de partida _____					
Lugar _____ Estado _____ Tiempo de residencia _____ Año de llegada _____ Año de partida _____					
DS5 De las siguientes opciones ¿Con cuál de los siguientes grupos de personas se identifica más? (Puede leer las opciones. Aunque no son excluyentes, sólo se marca una sola, como se considere el entrevistado o entrevistada.)					
Travestí <input type="checkbox"/>		Lesbiana <input type="checkbox"/>		Bisexual <input type="checkbox"/>	
Transgénero <input type="checkbox"/>		Transexual <input type="checkbox"/>		Heterosexual <input type="checkbox"/>	
Homosexual (Gay) <input type="checkbox"/>					
DS6 ¿Alguna vez ha estado en los Estados Unidos? Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>					
DS6.1 En caso afirmativo. ¿Por que motivo viajó a Estados Unidos?:					
Estudio <input type="checkbox"/>		Paseo/Vacaciones/Visita familiar <input type="checkbox"/>			
Trabajo <input type="checkbox"/>		Otro (Especifique) _____ <input type="checkbox"/>			
DS7 ¿Cuánto tiempo ha estado en Estados Unidos?					
Menos de 3 meses <input type="checkbox"/>		De 3 a 6 meses <input type="checkbox"/>		Más de 6 a 12 meses <input type="checkbox"/>	
Más de 12 meses <input type="checkbox"/>					
DSa3 ¿Cuándo viajó a Estados Unidos?					
Hace 3 a 6 meses <input type="checkbox"/>		Hace 6 a 12 meses <input type="checkbox"/>		Más de 12 meses <input type="checkbox"/>	
Otro _____ <input type="checkbox"/>					
DS8 ¿Ha estado en la cárcel, privado de su libertad? Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>					
DS9 ¿Habla alguna lengua indígena? Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>					
Aplica a todo entrevistado.					
DS10 ¿Pertenece a un grupo indígena? Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>					
Aplica a todo entrevistado.					
3.- ACCESO A SERVICIOS					
AS1 ¿Sabe dónde acudir si desea hacerse una prueba de detección del VIH? Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>					
AS2 ¿Ha recibido preservativos en los últimos doce meses? Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>					
(p.ej: a través de un servicio de difusión, una clínica de salud general o sexual)					
AS3 ¿Sabe usted que el tratamiento antirretroviral para SIDA en México es gratuito? Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>					
AS4 ¿Sabe usted a dónde acudir en caso de requerir tratamiento para el VIH? Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>					

4.- COMPORTAMIENTO SEXUAL Y FACTORES DE RIESGO			
CSa1 ¿Ha recibido transfusiones sanguíneas?	Si <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	¿Cuándo? día/mes/año ____/____/____
CSa2 ¿Alguna vez a bebido alcohol?	Si <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	
CSa2.1 En caso afirmativo. ¿Con qué frecuencia bebe alcohol?			
Diario <input type="checkbox"/>	Cada fin de semana <input type="checkbox"/>	Una vez al mes <input type="checkbox"/>	Otro(especifique) _____ <input type="checkbox"/>
CS1 ¿Usted tiene relaciones sexuales con...?			
Únicamente con mujeres <input type="checkbox"/>	Únicamente con Hombres <input type="checkbox"/>	Con hombres y mujeres <input type="checkbox"/>	No ha tenido <input type="checkbox"/>
CS2 Ha tenido relaciones sexuales en el último mes?	Si <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	
CS3 En su última relación sexual. ¿Usó condón?	Si <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	
CS4 En su última relación sexual con penetración anal. ¿Usó condón?	Si <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	
CS5 En general: ¿Con cuántas personas tuvo relaciones sexuales en los últimos 12 meses?:	____/____/____/PERSONAS	No tuvo sexo En los últimos 12 meses <input type="checkbox"/>	
CS6 ¿Hace cuántos meses tuvo relaciones sexuales con un hombre con penetración anal?	____/____/____/MESES	No tiene sexo con hombres <input type="checkbox"/>	
En los últimos 12 meses:			
CS7 ¿Ha cobrado dinero a cambio de tener relaciones sexuales?	Si <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	
CS8 ¿Usó condón la última vez que cobró dinero a cambio de tener relaciones sexuales?	Si <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	
CS9 ¿Ha pagado dinero para tener relaciones sexuales?	Si <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	
CS10 ¿Usó condón la última vez que pagó dinero a cambio de tener relaciones sexuales?	Si <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	
5.- USO DE DROGAS INYECTABLES.			
UDI1 Se ha inyectado drogas durante el último mes	Si <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	
UDI2 Se ha inyectado drogas en los últimos 12 meses	Si <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	
UDI3 La última vez que se inyectó droga, ¿se inyectó con agujas/jeringas nuevas?	Si <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	
9.- OTRAS ENFERMEDADES			
OT1. ¿Se le ha diagnosticado con...?			
Diabetes <input type="checkbox"/>	Tuberculosis <input type="checkbox"/>	Hipertensión <input type="checkbox"/>	Hepatitis C <input type="checkbox"/>
Obesidad <input type="checkbox"/>	Neumonía <input type="checkbox"/>	Hepatitis B <input type="checkbox"/>	Cáncer <input type="checkbox"/>
Sarcoma de Kaposi <input type="checkbox"/>	Otro _____	Candidiasis <input type="checkbox"/>	Desnutrición <input type="checkbox"/>
6.- DISCRIMINACIÓN			
D1 ¿Ha sido objeto de discriminación, maltrato o abusos por parte del personal de salud?	Si <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	
7.- DETECCIÓN DE VIH			
DV1.- Alguna vez. ¿Se ha realizado la prueba de detección de VIH?	SI <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	
DV2.- En los últimos 12 meses ¿Se ha realizado la prueba para detección del VIH?	SI <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	
DVa1.-¿Se le ha diagnosticado como portador de VIH?	SI <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	
DVa1.1 En caso afirmativo. ¿Cuándo fué diagnosticado?(día/mes/año)	____/____/____	¿Dónde? _____	
DVa1.2 ¿Con qué tipo de prueba le han diagnosticado como portador de VIH?			
Prueba rápida <input type="checkbox"/>	ELISA <input type="checkbox"/>	Confrimatoria Western Blot <input type="checkbox"/>	
DVa1.3 ¿Le han realizado las siguientes análisis? De conocer y proporcionar voluntariamente el resultado, anotarlo			
Conteo de células CD4 <input type="checkbox"/>	Resultado _____	Cuantificación de carg viral <input type="checkbox"/>	Resultado _____
DVa2 ¿Se encuentra bajo tratamiento antirretroviral para VIH?	SI <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	
Aplicación de tamizaje para VIH			
DV4.- Resultado de primera prueba de tamizaje (convencional o rápida)	Reactivo <input type="checkbox"/>	No reactivo <input type="checkbox"/>	
<i>NOTA: En caso de resultar "inválida" ésta PRIMERA prueba se repite hasta obtener un resultado "Reactivo" o "No reactivo".</i>			
<i>NOTA: Se aplica SEGUNDA prueba únicamente a quienes hayan tenido resultado "Reactivo" en la primera. Ver D4</i>			
DV5.- Resultado de esta segunda prueba de tamizaje (convencional o rápida)	Reactivo <input type="checkbox"/>	No reactivo <input type="checkbox"/>	
<i>NOTA: En caso de resultar "inválida" está SEGUNDA prueba se repite hasta obtener un resultado "Reactivo" o "No reactivo".</i>			
8.- RESPONSABLE DEL LLENADO DEL FORMATO			
Nombre completo de la persona que llenó éste formato:			
			Firma de la persona que llenó éste formato:
Fecha de elaboración	Día	Mes	Año
Muchas Gracias			

10.3 Cebadores para amplificación del gen *env* por PCR

Para la amplificación del gen *env* se probaron varios juegos de cebadores adicionales a los reportados en éste trabajo (Tabla A1).

Tabla A1. Cebadores utilizados para la amplificación de gen *env*

Cebador	Secuencia (5'-3')	Tamaño fragmento	Aplicación	Referencia
ED3-F	TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAGCGG	1900pb	Amplificación región externa	(Delwart, et al., 1993)
ED14-R	TCTTGCTGGAGCTGTTTGATGCCCCAGAC			
AV18	GCACCCACCAAGGCAAAGAGAAGAGTGGTG	264pb	Amplificación región externa	(Van Laethem, et al., 1998)
AV21	TTCCACAGCCAGGACTCTTGCTGGAGCTG			
AV19	AGGAAGCACTATGGGC	149pb	Amplificación región interna	(Van Laethem, et al., 1998)
AV20	GCTGCTTGATGCCCA			
ED31-F	CCTCAGCCATTACACAGGCCTGTCCAAAG	500pb	Amplificación región interna	(Delwart, et al., 1993)
ED33-R	TTACAGTAGAAAAATTCCCCTC			
ES7-F	TGTAACACGACGGCCAGTCTGTAAATGGCAGTCTAGC	800pb	Amplificación región interna	(Delwart, et al., 1993)
ES8-R	CAGGAAACAGCTATGACCCACTTCTCCAATTGTCCCTCA			

10.4 Experimentos de amplificación del gen *gag* por PCR

Para la amplificación del gen *gag* se probaron varios juegos de cebadores correspondientes a la región de interés (Tabla A2). Se probaron distintas condiciones de amplificación (Tabla A3) por PCR anidado para cada par de cebadores, pero al secuenciar el fragmento no corresponde al genoma de VIH-1.

Tabla A2. Cebadores utilizados para la amplificación de gen *gag* VIH-1

Cebador	Secuencia 5'-3'	Tamaño fragmento	Aplicación	Referencia
Gag F2-F	ATGGGTGCGAGAGCGTCARTATTAA	1242pb	Amplificación región externa	(Luo, et al., 2011)
Gag e2	TCCAACAGCCCTTTTTCCTAGG			
AV10	TGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGA	351pb	Amplificación región externa	(Van Laethem, et al., 1998)
AV13	CTGCGAATCGTTCTAGCTCCCTGCTTGCCC			
Gag-bc 1-F	ACACTATATGCTAAAACACC	1079pb	Amplificación región interna	(Luo, et al., 2011)
Gag bc2-R	CATTAACAATTCTTTTAGAG			
AV11	TCTAGCAGTGGCGCC	178pb	Amplificación región interna	(Van Laethem, et al., 1998)
AV12	GACGCTCTCGCACCC			

Tabla A3. Condiciones de amplificación por PCR anidado para el gen *gag*. Para la reacción de amplificación con los cebadores internos se utilizó 1µL de una dilución 1:10 del producto de la primera reacción de PCR. (*): se utilizó buffer de PCR con amonio, (+): fragmentos inespecíficos, (X) no amplificación,

Cebador	Condiciones de amplificación	MgCl₂	Resultado
Gag F2-F Gag e2	10 ciclos: 94 °C 1 min, 37 °C 1 min, 72 °C 1 min 25 ciclos: 94 °C 30 s, alineación (48 °C, 51 °C, 54 °C) 30 s, 72 °C 30 s	2 mM	X
	10 ciclos: 94 °C 1 min, 37 °C 1 min, 72 °C 1 min 25 ciclos: 94 °C 30 s, alineación (48 °C, 51 °C, 54 °C) 30 s, 72 °C 30 s	3 mM	X
Gag-bc 1-F Gag bc2-R	35 ciclos: 94 °C 30 s, 51 °C 30 s, 72 °C 1 min	3 mM	X
	10 ciclos: 94 °C 1 min, 37 °C 1 min, 72 °C 1 min 25 ciclos: 94 °C 30 s, alineación (53 °C, 56 °C, 58 °C) 30 s, 72 °C 30 s	3 mM	X
	10 ciclos: 94 °C 1 min, 37 °C 1 min, 72 °C 1 min 25 ciclos: 94 °C 30 s, alineación (53 °C, 56 °C, 58 °C) 30 s, 72 °C 30 s	3 mM*	+
	10 ciclos: 94 °C 45 s, 60 °C (reduce 0.5 °C cada ciclo) 45 s, 72 °C 45 s 25 ciclos: 94 °C 30 s, 50 °C 45 s, 72 °C 1 min	3 mM	X
AV10-AV13°	35 ciclos: 94 °C 30 s, 65 °C 30 s, 72 °C 45 s	2 mM	X
	35 ciclos: 94 °C 30 s, 65 °C 30 s, 72 °C 45 s	1.5 mM*	X
AV11° AV12	25 ciclos: 94 °C 30 s, 45 °C 30 s, 72 °C 30 s	2 mM	X
	25 ciclos: 94 °C 30 s, 45 °C 30 s, 72 °C 30 s	2 mM*	+

10.5 Experimentos de amplificación del gen *pol* por PCR

Para la amplificación de DNA y cDNA del gen *pol* región de la proteasa y transcriptasa reversa se utilizó PCR anidado. Se experimentó con 12 juegos de cebadores. Para la región externa se utilizaron los cebadores Pro5F (5'-AGAAATTGCAGGGCCCCTA GGAA-3') y RT3474R (5'-GAATCTCTCTGTTTTCTGCCAG-3') (Carr, et al., 1999, Eyzaguirre, et al., 2007), H₁POL4235 (5'-CCCTACAATCCCCAAAGTCAAGG-3') y H₁POL4538 (5'-TACTGCCCCTTCACCTTTCCA -3') (Van Laethem, et al., 1998), UNI-KS-1-F (5'-TAGARGARATGATGACAGCATGTCAGGG-3') y UNI-KS-T (5'-GGYTCTTGRTAA ATTTGATATGTCCAYTG-3') (Aitken, et al., 2012). Para la región interna se utilizaron los cebadores Pro3F (5'-AGAICAGAGCCAACAGCCCCA CCA-3') y ProRT (5'-TTTCCCCACTAACTTCTGTATGTCATTGACA-3') (Carr, et al., 1999, Eyzaguirre, et al., 2007), H₁POL4327 (5'-TAAGACAGCAGTACAAATGGCAG-3') y H₁POL4481 (5'-GCTGTCCCTGTAATAAACCCG-3') (Van Laethem, et al., 1998), Prot-1 (5'-AGGCTAATTTTTTAG GGAAGATCTGGCCTTCC-3') y UNI-KS-A/G (5'-GCTATTAADTCTTTTGATGGRTCA-3') (Aitken, et al., 2012). Se realizaron amplificaciones de PCR bajo diferentes condiciones (Tabla A4) los fragmentos obtenidos se secuenciaron e identificaron como DNA humano.

Tabla A4. Condiciones de amplificación para gen *pol* VIH-1. Para la reacción de amplificación con los cebadores internos se utilizó 1µL de una dilución 1:10 del producto de la primera reacción de PCR. (*): se utilizó buffer de PCR con amonio, (+): fragmentos inespecíficos, (X) no amplificación, ✓: producto específico y tamaño esperado (sombreado)

Región externa (Pro5F-RT3474R)	Condiciones amplificación	35 ciclos 94 °C 30 s, alineación 30 s, 72 °C 1 min				10 ciclos: 94 °C 1 min, 37 °C 1min, 72 °C 1 min 15 ciclos: 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s			
	Temperatura de alineación	50 °C	51 °C	53 °C	55 °C	55 °C			
	MgCl ₂	2mM	2mM	2mM	2mM	1.5mM	2mM		
	Resultado	+	+	+	+	+	+		
Región interna (H ₁ POL4235-H ₁ POL4538)	Condiciones amplificación	Touchdown PCR 30 ciclos 67 °C 30 s, -0.5 °C cada ciclo		35 ciclos 94 °C 30 s, alineación 30 s, 72 °C 1 min					
	Temperatura de alineación			51 °C		53 °C		58 °C	
	MgCl ₂	2mM	1.5mM	1.75mM	2mM	1.5mM	1.75mM	2mM	2mM
	Resultado	X	X	+	+	✓	X	+	X
Región externa (UNI-KS-1-F/ UNI-KS-T)	Condiciones amplificación	10 ciclos 94 °C 1 min, 37 °C 1 min, 72 °C 1 min 25 ciclos 94 °C 30 s, alineación 30 s, 72 °C 30 s							
	Temperatura de alineación	48 °C		50 °C		52 °C		54 °C	
	Resultado	X		X		X		X	
Región interna* (Prot-1- UNI-KS-A/G)	Condiciones amplificación	10 ciclos: 94 °C por 1 min, 37 °C por 1 min, 72 °C por 1 min 25 ciclos: 94 °C por 30 s, alineación 30 s, 72 °C por 30 s				10 ciclos: 94 °C por 1 min, 37 °C por 1 min, 72 °C por 1 min 25 ciclos: 94 °C por 30 s, alineación 45 s, 72 °C por 2 min			
	Temperatura de alineación	54 °C				54 °C			
	Resultado	+				+			

10.6 . Secuencias de referencias utilizadas por el programa REGA para la asignación de subtipos

Subtipo o CRF	Nombre de la secuencia	
A1	A1_UG85U455	A1_UG9292UG037
A2	A2_CD9797CDKTB48	A2_CY9494CY01741
B	B_NL0067100T36	B_US90WEAU160
C	C_BR9292BR025	C_BW9696BW0502
D	D_CM0101CM4412HAL	D_TZ01A280
F1	F1_BE93VI850	F1_FR96MP411
F2	F2_CM195MP255	F2_CM95MP257
G	G_FI93HH8793121	G_NG9292NG083
H	H_BE93VI991	H_CF9090CF056
J	J_SE93SE7887	J_SE94SE7022
K	K_CD97EQTBI1C	K_CM96MP535
CRF01_AE	01_AECF19090CF11697	01_AETH90CM240
CRF02_AG	02_AGCM9797CMP807	02_AGFR91DJ264
CRF03_AB	03_ABRU97KAL153	03_ABRU98RU98001
CRF04_CPX	04_CPXG1R9197PVCH	04_CPXGR9797PVMY
CRF05_DF	05_DFBEVI1310	05_DFBE93VI961
CRF06_CPX	06_CPXAU96BFP90	06_CPXML9595ML84
CRF07_BC	07_BCC1N9797CN001	07_BCCN9898CN009
CRF08_BC	08_BCCN19797CNGX7F	08_BCCN9898CN006
CRF10_CD	10_CDTZ19696TZBF071	10_CDTZ9696TZBF110
CRF11_CPX	11_CPXF1R99MP1298	11_CPXGRGR17
CRF12_BF	12_BFAR97A32989	12_BFU1Y99URTR23
CRF13_CPX	13_CPXC1M961849	13_CPXCM964164
CRF14_BG	14_BGE1S00X477	14_BGES99X397

10.7 Secuencias de referencia utilizadas para el alineamiento por el programa Genotyping

Subtipo o CRF	no. acceso	Longitud (pb)	Subtipo	no. acceso	Longitud (pb)
CRF01_AE	U54771	9203	25_CPX	AY371169	8425
	U51188	9843		DQ826726	8882
	AF197340	9628	CRF28_BF	DQ085873	8886
	AF197341	9597		DQ085874	8890
CRF02_AG	L39106	9201	CRF29_BF	AY455778	8767
	AF063224	8961		DQ085876	8979
	AF107770	9063	30_0206	AJ508595	9794
	AJ286133	8801		AB286854	9682
CRF03_AB	AF193276	8808	CRF31_BC	AY727526	8795
	AF193277	8961		AY727527	9057
04_CPX	AF049337	9050		EF091932	8908
	AF119819	9699		32_06A1	AY535660
	AF119820	9548	DQ167215		8404
CRF05_DF	AF076998	8990	33_01B	DQ366659	9081
	AF193253	9083		DQ366660	9062
06_CPX	AF064699	9775		DQ366661	9129
	AJ245481	9715		DQ366662	9153
	AJ288981	9808	34_01B	EF165539	8668
	AJ288982	9719		EF165540	8728
CRF07_BC	AF286226	8978	EF165541	8650	
	AF286230	8978	CRF35_AD	EF158040	8775
	AX149771	9078		EF158041	8703
	AF503396	8957		EF158042	8730
CRF08_BC	AY008715	8802		EF158043	8727
	AY008716	8796	EF087995	8412	
	AY008717	8784	37_CPX	AF377957	8896
	AF286229	9013		CRF39_BF	EU735534
09_CPX	AY093603	8803	EU735535		9057
	AY093604	8777	CRF 40_BF	EU735537	9042
	AY093605	9039		EU735538	9123
	AY093607	8389		EU735539	9105
CRF10_CD	AF289548	8976	CRF42_BF	EU170136	9055
	AF289549	9023		EU170137	7479
	AF289550	8992		EU170138	8882
11_CPX	AF179368	8935		EU170139	9122
	AJ291719	9737	EU170141	8503	

11_CPX	AJ291718	9711
	AJ291720	9769
	AF492623	8819
	AF492624	9017
	AY371149	8409
	AY371150	8414
	AY371151	8384
	AY371152	8394
AY371153	8396	
CRF12_BF	AF385934	9770
	AF385935	9762
	AF385936	9704
	AF408629	9192
	AF408630	9174
	AY037279	8760
13_CPX	AF460972	8916
	AF460974	8854
	AY371154	8448
CR14_BG	AF450096	8989
	AF450097	8983
	AF423756	8997
	AF423757	8980
	AF423758	8945
	AF423759	8901
CRF15_01B	AF516184	8999
	AF529573	8867
	AF529572	8842
	AF530576	9017
CRF16_A2D	AF286239	9064
	AF457060	8806
CRF17_BF	AY037281	8808
	EU581825	8775
	EU581826	8855
	EU581827	8795
	EU581828	8818
18_CPX	AF377959	8828
	AY586540	8945
	AY586541	8866
19_CPX	AY588970	8693
CRF20_BG	AY586544	9071

CRF42_BF	EU170142	9098
43_02G	EU697904	9085
	EU697905	9093
	EU697907	9126
Subtipo A1	M62320	9178
	U51190	8999
	AF069670	8813
	DQ676872	8667
	AB253421	9643
Subtipo A2	AF286237	9060
	AF286238	8972
	AF286240	5100
	AF286241	5323
Subtipo B	M17451	9128
	U63632	8896
	U21135	9720
Subtipo C	U46016	9031
	U52953	8959
	AF067155	9002
	AF110967	9056
Subtipo: CPZ	X52154	9811
	AJ271369	9261
	U42720	9068
	AF447763	9326
	M27323	9143
	U88822	8975
Subtipo F1	U88824	8952
	AF005494	8968
	AF077336	8903
Subtipo F2	AJ249238	8614
	AJ249236	8555
Subtipo G	AJ249237	8589
	U88826	8987
	AF061641	9047
	AF061642	9074
	AF084936	9707
Subtipo H	AF005496	8953
	AF190127	9056
Subtipo J	AF190128	8955
	AF082394	8943

CRF20_BG	AY586545	8935
	DQ020274	8944
CRF21_A2D	AF457051	8816
	AF457072	8790
CRF22_01A1	AY037284	5191
	AY371159	8372
CRF 23_BG	AY900571	8964
	AY900572	8945
CRF24_BG	AY900577	7622
	AY900581	7581
	AY900574	9025
	AY900575	8987
	AY900576	9037

Subtipo J	AF082395	8953
Subtipo K	AJ249235	8600
	AJ249239	8604
Subtipo N	AJ006022	9182
	AJ271370	9045
	AY532635	8938
Subtipo O	L20587	9754
	L20571	9793
	AJ302647	9829
	AY169812	9110

10.8 Secuencias utilizadas en la alineación y análisis filogenético del gen *env* región gp120 V3-V5 de VIH-1

Muestra	País de origen	no. acceso	Virus	Grupo	Subtipo	Referencia
CdM MX	México	AF200875	VIH-1	Grupo M	B	Rivera-Morales <i>et al</i> (2001)
CdM MX	México	AF200873	VIH-1	Grupo M	B	Rivera-Morales <i>et al</i> (2001)
CdM MX	México	AF200871	VIH-1	Grupo M	B	Rivera-Morales <i>et al</i> (2001)
CdM MX	México	AF200869	VIH-1	Grupo M	B	Rivera-Morales <i>et al</i> (2001)
CdM MX	México	AF200867	VIH-1	Grupo M	B	Rivera-Morales <i>et al</i> (2001)
J MX	México	AF200885	VIH-1	Grupo M	B	Rivera-Morales <i>et al</i> (2001)
J MX	México	AF200879	VIH-1	Grupo M	B	Rivera-Morales <i>et al</i> (2001)
J MX	México	AF200877	VIH-1	Grupo M	B	Rivera-Morales <i>et al</i> (2001)
J MX	México	AF200886	VIH-1	Grupo M	B	Rivera-Morales <i>et al</i> (2001)
J MX	México	AF200882	VIH-1	Grupo M	B	Rivera-Morales <i>et al</i> (2001)
J MX	México	AF200880	VIH-1	Grupo M	B	Rivera-Morales <i>et al</i> (2001)
J MX	México	AF200876	VIH-1	Grupo M	B	Rivera-Morales <i>et al</i> (2001)
NL MX	México	AF200891	VIH-1	Grupo M	B	Rivera-Morales <i>et al</i> (2001)
NL MX	México	AF200889	VIH-1	Grupo M	B	Rivera-Morales <i>et al</i> (2001)
NL MX	México	AF200887	VIH-1	Grupo M	B	Rivera-Morales <i>et al</i> (2001)

NL MX	México	AF200896	VIH-1	Grupo M	B	Rivera-Morales <i>et al</i> (2001)
NL MX	México	AF200894	VIH-1	Grupo M	B	Rivera-Morales <i>et al</i> (2001)
NL MX	México	AF200895	VIH-1	Grupo M	B	Rivera-Morales <i>et al</i> (2001)
P MX	México	AF200899	VIH-1	Grupo M	B	Rivera-Morales <i>et al</i> (2001)
P MX	México	AF200906	VIH-1	Grupo M	B	Rivera-Morales <i>et al</i> (2001)
P MX	México	AF200907	VIH-1	Grupo M	B	Rivera-Morales <i>et al</i> (2001)
P MX	México	AF200904	VIH-1	Grupo M	B	Rivera-Morales <i>et al</i> (2001)
P MX	México	AF200908	VIH-1	Grupo M	B	Rivera-Morales <i>et al</i> (2001)
Y MX	México	AF200917	VIH-1	Grupo M	B	Rivera-Morales <i>et al</i> (2001)
Y MX	México	AF200915	VIH-1	Grupo M	B	Rivera-Morales <i>et al</i> (2001)
Y MX	México	AF200911	VIH-1	Grupo M	B	Rivera-Morales <i>et al</i> (2001)
Y MX	México	AF200909	VIH-1	Grupo M	B	Rivera-Morales <i>et al</i> (2001)
Y MX	México	AF200920	VIH-1	Grupo M	B	Rivera-Morales <i>et al</i> (2001)
EUA	Estados Unidos	JQ403040	VIH-1	Grupo M	B	Henn <i>et al.</i> (2012)
EUA	Estados Unidos	JN415236	VIH-1	Grupo M	B	Shen <i>et al</i> (2012)
EUA	Estados Unidos	AF321147	VIH-1	Grupo M	B	D'Costa <i>et al</i> (2001)
EUA	Estados Unidos	AY191861	VIH-1	Grupo M	B	McDonald, R (2007)

EUA	Estados Unidos	EF556042	VIH-1	Grupo M	B	Diem <i>et al</i> (2008)
EUA	Estados Unidos	EF556103	VIH-1	Grupo M	B	Diem <i>et al</i> (2008)
EUA	Estados Unidos	EF556049	VIH-1	Grupo M	B	Diem <i>et al</i> (2008)
FR	Francia	K02013	VIH-1	Grupo M	B	Wain-Hobson, <i>et al</i> (1985)
02AG	Nigeria	L39106	VIH-1	Grupo M	CRF02_AG	Howard, <i>et al</i> (1985)
03AB	Rusia	AF193276	VIH-1	Grupo M	CRF03_AB	Liitsola, <i>et al</i> (2000)
05DF	Bélgica	AF193253	VIH-1	Grupo M	CRF05_DF	Laukkanen, <i>et al</i> (2000)
12BF	Argentina	AF385936	VIH-1	Grupo M	CRF12_BF	Carr, <i>et al</i> (2001)
A1 KN	Kenia	AF004885	VIH-1	Grupo M	A1	Neilson, <i>et al</i> (1999)
A2 Chipre	Chipre	AF286237	VIH-1	Grupo M	A2	Gao, <i>et al</i> (2001)
B EUA	Estados Unidos	AY173953	VIH-1	Grupo M	B	Hierholzer, <i>et al</i> (2002)
B USA	Estados Unidos	AY331295	VIH-1	Grupo M	B	Bernardin, <i>et al</i> (2005)
C Surafrica	Surafrica	AY162223	VIH-1	Grupo M	C	Megede, <i>et al</i> (2002)
D Tn	Tanzania	AY253311	VIH-1	Grupo M	D	Arroyo, <i>et al</i> (2004)
D UG	Uganda	AF484495	VIH-1	Grupo M	D	Harris, <i>et al</i> (2002)
F1	Francia	AJ249238	VIH-1	Grupo M	F1	Triques, <i>et al</i> (2000)
F1 BR	Brasil	AF447826	VIH-1	Grupo M	F1	Huang, <i>et al</i> (2003)

F2	Camerún	AJ249236	VIH-1	Grupo M	F2	Triques, <i>et al</i> (2000)
G	República del Congo	AF084936	VIH-1	Grupo M	G	Oelrichs, <i>et al</i> (1999)
G ES	España	EU786670	VIH-1	Grupo M	G	Fernandez-García, <i>et al</i> (2009)
H	Bélgica	AF190128	VIH-1	Grupo M	H	Janssens, <i>et al</i> (2000)
J	Suecia	AF082394	VIH-1	Grupo M	J	Laukkanen, <i>et al</i> (1999)
K Camerun	Camerún	AJ237807	VIH-1	Grupo M	K	Triques, <i>et al</i> (1999)
N	Camerún	AJ006022	VIH-1	Grupo N		Simon, <i>et al</i> (1998)
O	Camerún	L20571	VIH-1	Grupo O		Gurtler, <i>et al</i> (1994)
Muestra	País de origen	no. acceso	Virus	Grupo	Subtipo	Referencia
CdM MX	México	AF200875	VIH-1	Grupo M	B	Rivera-Morales <i>et al</i> (2001)
CdM MX	México	AF200873	VIH-1	Grupo M	B	Rivera-Morales <i>et al</i> (2001)
CdM MX	México	AF200871	VIH-1	Grupo M	B	Rivera-Morales <i>et al</i> (2001)
CdM MX	México	AF200869	VIH-1	Grupo M	B	Rivera-Morales <i>et al</i> (2001)
CdM MX	México	AF200867	VIH-1	Grupo M	B	Rivera-Morales <i>et al</i> (2001)