



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

Facultad de Ciencias Químicas E Ingeniería

Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería

Protocolo de tesis de doctorado

“VARIACIÓN GENÉTICA DEL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA EN TIJUANA”

Presenta MSP José Román Chávez Méndez

Director de Tesis: Dr. José Manuel Cornejo Bravo

Co-Director: Horacio Eusebio Almanza Reyes

TIJUANA, B.C., MÉXICO NOVIEMBRE 2023

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

Folio No.360
Tijuana, B.C., a 24 de abril, 2024

C. José Román Chávez Méndez
Pasante de: Doctorado en Ciencias
Presente

El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la
Opción TESIS

Es propuesto, por los C. Dr. José Manuel Cornejo Bravo y
Dr. Horacio Eusebio Almanza Reyes.

Quienes serán los responsables de la calidad del trabajo que usted presente, referido
al tema *"Variación Genética del Virus de Inmunodeficiencia Humana en Tijuana"*.

El cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

- I. ANTECEDENTES
- II. METODOLOGÍA
- III. RESULTADOS
- IV. DISCUSIÓN
- V. CONCLUSIONES
- VI. BIBLIOGRAFIA


M.C. Roberto Alejandro Reyes Martínez
Director


Dra. Ana Alejandra Ramírez Rodríguez
Subdirectora


Dr. José Manuel Cornejo Bravo
Director De Tesis


Dr. Horacio Eusebio Almanza Reyes
Co-Director De Tesis



DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a todas las personas que han perdido la guerra en contra del VIH y a todos los que aún siguen en la lucha. Especialmente, este trabajo está dedicado a todos mis hermanos del Albergue Las Memorias.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a las personas que hicieron posible la realización de este proyecto, al Dr. Cornejo, mi director de tesis, gracias por el apoyo incondicional y la paciencia brindada, por estar siempre disponible con la mejor actitud y por haberme dado la oportunidad de convertirme en su alumno y aprendiz.

Al Dr. Horacio Almanza, gracias por darme su guía académica, profesional y personal. Gracias a su dedicación y perseverancia estos resultados son posibles, agradezco la confianza, los conocimientos y la amistad que me ha ofrecido.

Al Dr. Sanjay Metha y la Dra. Stefanie Stratdhee por haberme brindado su amistad, guía y colaboración científica en este y otros proyectos.

Agradezco al equipo médico de Albergue Las Memorias: Dra. Nydia Castillo, Dra. Karla Torres, Dr. Robert Deiss, Dr. Daniel Park, Dra. Marlet Nuño y Laila Goring, por siempre mostrarme paciencia y educarme, especialmente les agradezco por su esfuerzo en mostrarnos que la familia Memorias merece vivir con dignidad.

Agradezco a la profe Brenda Galaviz por seguir su convicción de servicio, ha sido un verdadero milagro conocerla y aprender de ella.

Agradezco también enormemente al Sr. Antonio Granillo y a todas las personas que han dado un poquito de vida para servir en Albergue Las Memorias, sin ellas esto nunca hubiera ocurrido.

Especialmente agradezco a mi madre. Gracias por haberme enseñado que a través del esfuerzo es posible llegar a cualquier parte.

Y mi más grande agradecimiento a mi esposa e hijo ya que sin ellos simplemente mi fuerza no sería suficiente para alcanzar las metas que juntos hemos logrado.

ABREVIATURAS

μl	Microlitro
3TC	Lamivudina
ABC	Abacavir
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN m	Ácido ribonucleico mensajero
ARN	Ácido ribonucleico
ARV	Antirretroviral
AZT	Zidovudina
BD	Beckton Dickinson
cADN	Ácido desoxirribonucleico complementario
CAPASITS	Centro Ambulatorio para la Prevención y Atención en SIDA e Infecciones de Transmisión Sexual
CENSIDA	Centro Nacional para la Prevención y el Control del VIH y el SIDA
d4T	Estavudina
ddC	Zalcitabina
ddl	Didanosina
DEPC	Dietilpirocarbonato
DLV	Delavirdina
dNTP	Desoxinucleósido trifosfato

DTT	Ditroteitol
EDTA	Acido etilendiamino tetraacético
EFV	Efavirenz
ENF	Enfuvirtida
ERT	Etravirina
ETC	Emtricitabina
FDA	Food and Drugs Administration
HCl	Ácido Clorhídrico
HLA	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
IN	Integrasa
Kb	Kilobase
KCl	Cloruro de Potasio
kDa	KiloDalton
LTR	Repeticiones largas terminales
MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
ml	Mililitro
mM	Milimolar
mV	Milivoltio
NNRTI	Inhibidores No Nucleósidos de la Retro Transcriptasa
NRTI	Inhibidores Nucleósidos de la Retro Transcriptasa
NVP	Neviparina

OMS	Organización Mundial de la Salud
ONUSIDA	Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/sida
pb	Pares de bases
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PI	Inhibidores de la Proteasa
PR	Proteasa
RPV	Rilpivirina
RT	Retrotranscriptasa
SALVAR	Sistema de Administración, Logística y Vigilancia de ARV
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Humana
SSA	Secretaría de Salud
TAM	Thymidin-associated mutations
TARGA	Tratamiento Antirretroviral de Gran Actividad
TARV	Tratamiento Antirretroviral
TDF	Tenofovir
Tm	Temperatura de fusión
TR	Transcriptasa reversa
UV	Ultravioleta
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana

RESUMEN

La OMS promueve que para el 2020 en el mundo se pueda tener al 90% de las personas portadoras de VIH detectadas, al 90% de las personas detectadas bajo tratamiento y que el 90% de los que estén en tratamiento contra el VIH se encuentren bajo supresión viral. Sin embargo, a pesar de que se han realizado mejoras muy importantes en torno a la epidemia del VIH, el escenario 90-90-90 es aún un logro que se encuentra lejos del alcance de muchos países, especialmente de países en los que aún no se conoce la dinámica de la distribución que ha tomado en VIH entre su población.

El conocer la dinámica de distribución del VIH entre poblaciones particulares es una herramienta importante que puede apoyar a la prevención y el control de epidemias localizadas ya que la información puede ser la base para la generación de programas de detección temprana del estatus serológico del VIH. En México, se ha estimado que aproximadamente el 50% de los portadores del VIH desconocen su estatus serológico. La comparación de secuencias que componen la estructura genética del VIH, en comparación con los métodos epidemiológicos tradicionales como el rastreo de contactos, puede evaluar con mayor eficacia su dinámica epidemiológica e informar mejor sobre los mecanismos de distribución que este organismo toma entre las poblaciones, así como algunas características relacionadas a su virulencia. Por estos rumbos, poco sabemos sobre el efecto que tiene la migración sobre la distribución global del virus.

Tijuana es reconocida mundialmente como una ciudad de migrantes y como una ruta importante para el tráfico de drogas hacia los Estados Unidos de América. Debido a la inestabilidad social que estos factores imponen sobre la población, en la ciudad se observan diversos problemas que afectan a la salud pública local. Entre estos se pueden mencionar un alto índice de adicciones, prostitución, personas sin un lugar para vivir estable, frecuencia alta de enfermedades transmisibles, entre otras.

La migración de las poblaciones trae consigo la propagación de enfermedades que repercuten inevitablemente sobre la salud en los lugares en donde los migrantes terminan su viaje. Un ejemplo común a esto es la distribución mundial de los

genotipos del VIH y los cambios genéticos que se relacionan con su farmacorresistencia

En Tijuana existe un área en la cual se encuentra un canal artificial localizado justo en el límite entre la frontera México-EUA. En esta área, conocida coloquialmente como “El Bordo”, se reúnen un gran número de adictos a drogas y población indigente, quienes buscan un lugar para vivir y/o drogarse. Allí radican un aproximado de 4000 personas entre los que se incluyen: personas deportadas desde EUA, migrantes Centroamericanos y del Caribe. El Bordo colinda con la “Zona Norte” de la ciudad de Tijuana, en donde se encuentran los bares de la ciudad que atraen a personas con un alto índice de vulnerabilidad para contraer la infección del VIH, tales como turistas, ciudadanos, hombres que tienen sexo con hombres, entre otros. Hace un par de años el Bordo se volvió inaccesible para todas las personas que solían vivir allí debido a redadas que realizó la policía, mismas que han permanecido. De un día a otro, todas las personas que radicaban o acudían al lugar se dispersaron por toda la ciudad y aparecieron nuevos lugares de reunión para el consumo de drogas (llamados picaderos) lo que potencialmente pudo haber apoyado la diseminación de variantes genéticas del VIH que se encontraban confinadas a ese lugar. Anterior a la dispersión de las personas del Bordo, también era un lugar en el que se realizaban actividades para el control y prevención de infecciones mediante varios programas existentes de ayuda social que coordinan las universidades locales, las organizaciones no gubernamentales y los ministerios de salud de la ciudad. Después de esto ha sido casi imposible realizar dichas actividades debido a la gran dispersión de esta población.

En México se han introducido variantes genéticas del VIH provenientes de otros países a través de Tijuana. Dichas variantes se distribuyen entre grupos de riesgo específicos y su distribución generalizada a la población de la ciudad se potencializa por la aplicación de políticas públicas para el orden social.

ÍNDICE

CAPITULO I.....	14
1.1 ANTECEDENTES.....	14
1.1.1. Retrovirus.....	14
1.1.2. Morfología del VIH.....	16
1.1.3. Estructura genética del VIH.....	17
1.1.4. Ciclo de Vida del VIH.....	23
1.1.5. Patogenia de la infección por VIH.....	26
1.1.6. Clasificación del VIH.....	27
1.1.7. Epidemiología del VIH.....	28
1.1.8. Tratamientos antirretrovirales.....	29
1.1.8.1 Inhibidores Nucleósidos de la Transcriptasa Reversa.....	30
1.1.8.2. Inhibidores no Nucleosidos de la Transcriptasa Reversa.....	30
1.1.8.3. Inhibidores de la Proteasa.....	31
1.1.8.4. Inhibidores de la integrasa.....	31
1.1.8.5. Inhibidores de la fusión.....	31
1.1.8.6. Combinaciones multiclase.....	32
1.1.9. Farmacorresistencia en el VIH.....	33
1.1.9.1 Cambios genéticos en el VIH que confieren farmacorresistencia.....	33
1.1.9.2. Selección del virus resistente.....	33
1.1.9.3. Mecanismos e identificación de la resistencia farmacológica en el VIH.....	35
1.1.9.4. Resistencia a los inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos (NRTI).....	35
1.1.9.5. Resistencia a los inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos (NNRTI).....	39
1.1.9.6. Resistencia a los inhibidores de la fusión.....	41
1.1.9.7 Resistencia a los Inhibidores de la Proteasa.....	43
1.1.9.8 Resistencia a los Inhibidores de la Integrasa.....	44
1.1.9.9. Interpretación de las pruebas de resistencia.....	46
1.1.9.10. Transmisión del fármaco resistencia en el VIH.....	46
1.2 JUSTIFICACIÓN.....	48
1.3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	50
1.4 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	52
1.5 OBJETIVOS.....	52
CAPITULO II.....	53

2.1 METODOLOGÍA.....	53
2.1.1 Población.....	53
2.1.4. Toma de muestra.....	57
2.1.5. Transporte de muestra.....	58
2.1.6. Aislamiento de leucocitos	59
2.1.7. Separación de plasma y precipitación viral	60
2.1.8. Extracción de ARN viral.....	60
2.1.9. Extracción de ADN de leucocitos.....	61
2.1.11. Cuantificación de ADN.....	63
2.1.12. Retro transcripción	63
2.1.13. Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	66
2.1.14. Análisis de productos en gel de agarosa.....	70
2.1.15 Extracción del producto de PCR del gel de agarosa	70
2.1.16 Purificación de los productos de PCR.....	71
2.1.17. Secuenciación Illumina Iseq100	71
2.1.18. Análisis de datos.....	75
2.1.18.1 Análisis demográfico.....	75
2.1.18.2 Análisis de farmacoresistencia	75
2.1.18.3 Análisis de subtipos	76
2.1.18.4 Análisis de Redes Filogenéticas.....	76
CAPITULO III	78
3.1 RESULTADOS	78
3.1.1 Análisis de variables demográficas.	78
3.1.2 Análisis de farmacoresistencia y subtipo.....	84
CAPITULO IV	95
4.1 DISCUSIÓN.....	95
CAPITULO V	99
5.1 CONCLUSIONES	99
CAPITULO VI	101
6.1 BIBLIOGRAFIA	101

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Estructura del VIH-1.
- Figura 2. Organización genómica del VIH-1 y procesamiento de las proteínas víricas.
- Figura 3. Ciclo replicativo del VIH.
- Figura 4. Representación esquemática del curso de la infección por VIH-1 en adultos.
- Figura 5. Mutaciones de resistencia a los inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos (NRTI).
- Figura 6. Mutaciones de resistencia a los inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos (NNRTI).
- Figura 7. Mutaciones de resistencia a los inhibidores de entrada (IE)
- Figura 8. Mutaciones de resistencia a los inhibidores de la proteasa (IP)
- Figura 9. Mutaciones de resistencia a los inhibidores de la proteasa (IP).
- Figura 10. Porcentaje de participantes distribuidos por sexo.
- Figura 11. Consumo de drogas utilizadas por los participantes
- Figura 12. Total de participantes por zona y porcentaje de VIH positivos
- Figura 13. Análisis filogenético del VIH

INDICE DE TABLAS

- Tabla I. Familia Retroviridae.
- Tabla II. Proteínas del VIH.
- Tabla III. Mezcla de hibridación de retrotranscripción.

- Tabla IV. Mezcla química de síntesis de cADN en la retrotranscripción
- Tabla V. Oligonucleótidos usados en la PCR.
- Tabla VI. Componentes de reacción para amplificación de genes.
- Tabla VII. Temperaturas y ciclos de reacción para PCR.
- Tabla VIII. Preferencias sexuales
- Tabla IX. Porcentaje de participantes según su estado de nacimiento
- Tabla X. Datos migratorios de las personas encuestadas
- Tabla XI. Porcentaje de participantes con enfermedades de transmisión sexual
- Tabla XII. Análisis de farmacorresistencia y subtipo
- Tabla XIII. Cambios genéticos asociados a la resistencia farmacológica en el VIH.

CAPITULO I

1.1 ANTECEDENTES

1.1.1. Retrovirus

La familia *Retroviridae* engloba un conjunto de virus ARN. La información genética se organiza de una forma común para toda la familia *Retroviridae*: tres genes denominados gag, pol y env, codifican las proteínas estructurales, enzimáticas y de la envoltura, respectivamente. Estos tres genes están flanqueados por dos secuencias iguales de varios cientos de nucleótidos, llamadas repeticiones largas terminales o LTRs. Los Retrovirus llevan incorporado un conjunto de enzimas que les permite traducir su ARN genómico en ADN de doble cadena, e incorporarlo al ADN celular(Diehl et al., 2016). El VIH pertenece a la familia *Retroviridae*.

La familia *Retroviridae* engloba un gran número de especies virales que infectan a vertebrados (Tabla I). Esta familia, a su vez, se ha subdividido en tres géneros: *Oncovirinae*, *Lentivirinae* y *Spumavirinae*. Las dos primeras provocan numerosas enfermedades contagiosas en animales, desde tumores a enfermedades neuronales e inmunodeficiencias. El género *Oncovirinae* comprende cinco grupos, y todos presentan la propiedad de inducir la formación de tumores. El género *Spumavirinae* posee la capacidad de inducir vacuolas, y las células infectadas presentan un aspecto espumoso. El género *Lentivirinae* se caracteriza por producir infecciones de evolución lenta. Los retrovirus contienen ácido ribonucleico (ARN) de cadena sencilla y positiva como material genético. Poseen dos copias de ARN por partícula viral y son diploides(Atwood, 1993; Gallo, 1987). Una característica distintiva es que codifican una transcriptasa reversa (TR). Ésta es una enzima que sintetiza ácido desoxirribonucleico (ADN) utilizando como molde el ARN genómico(Sevilya, 2001). Otra característica del género *lentivirus* es que han desarrollado una estrategia que les permite transportar su genoma en forma de ADN

a través de la membrana nuclear de la célula huésped. Esta característica es responsable de su capacidad única para replicar eficazmente en células que no se están dividiendo(Zennou, 2000).

La Tabla I presenta los diferentes géneros, grupos, especies y patología que producen los virus que se encuentran dentro de la Familia Retroviridae.

Tabla I. Familia *Retroviridae*

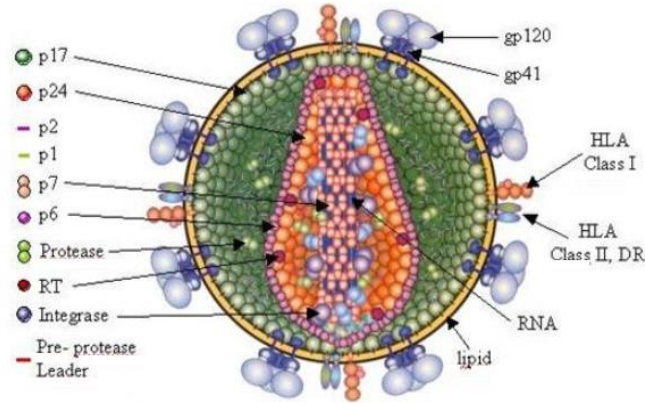
Género	Grupo	Especie Representativa	Patología
<i>Oncovirinae</i>	-Virus sarcoma de la leucosis aviar. -Virus tipo C de los mamíferos. -Virus tipo B de los mamíferos. -Virus tipo D. -Virus de la leucemia de linfocitos T humanos.	-RSV. Virus del sarcoma de Rous -ALV. Virus de la leucosis aviar -MuLV. Virus de la leucemia murina de Moloney -MMTV. Virus del tumor mamario del ratón -SRV. Retrovirus de simios -HTLV-1. Virus de la leucemia de linfocitos T humanos -HTLV-2. Virus de la leucemia de linfocitos T humanos.	-Oncogén sm Linfoma de linfocitos B -Linfoma de linfocitos T -Linfoma de linfocitos T -Linfomas de linfocitos T y trastornos neurológicos
<i>Lentivirinae</i>	Lentivirus	-VIH-1. Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1. -VIH-2. Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 2.	-Inmunodeficiencia en humanos -Inmunodeficiencia en humanos

		-VIS. Virus de la inmunodeficiencia en simios. -VIF. Virus de la inmunodeficiencia en felinos. -VIB. Virus de la inmunodeficiencia en bovinos. -VISNA. Virus de la inmunodeficiencia ovina caprina.	-Inmunodeficiencia en simios -Inmunodeficiencia felina -Inmunodeficiencia bovina -Inmunodeficiencia ovina y caprina
Spumavirinae		Virus de humanos y primates	Poco conocida

1.1.2. Morfología del VIH

El virión del VIH consiste en una partícula esférica, de aproximadamente 100 nm de diámetro, constituida por tres capas concéntricas (**Figura 1**). La capa interna (nucleoide o core), constituida por la proteína de la cápside (p24), tiene forma de cono truncado y contiene dos copias del ARN genómico formando un complejo ribonucleoproteico con las enzimas y las proteínas de la nucleocápside (Levy JA., 1993). Ésta contiene dos copias del genoma viral que están recubiertas por la proteína p9, una molécula de ARN transferente que actúa como cebador en la iniciación de las síntesis del ADN viral, la retrotranscriptasa, la proteasa y la proteína p6 (Frankel AD, 1998). La capa intermedia está constituida por la proteína matriz (p17). La capa más externa está constituida por una membrana lipídica derivada de la célula infectada, donde se insertan las glicoproteínas gp120 y gp41. En la membrana existe, además, una gran concentración de proteínas celulares íntimamente asociadas como la β -2-microglobulina y las cadenas α y β de los antígenos HLA DR, en una concentración mayor que la de gp120. Esta riqueza de proteínas celulares en la membrana viral condiciona aspectos de la patogenicidad.

Figura 1. Estructura del VIH-1.

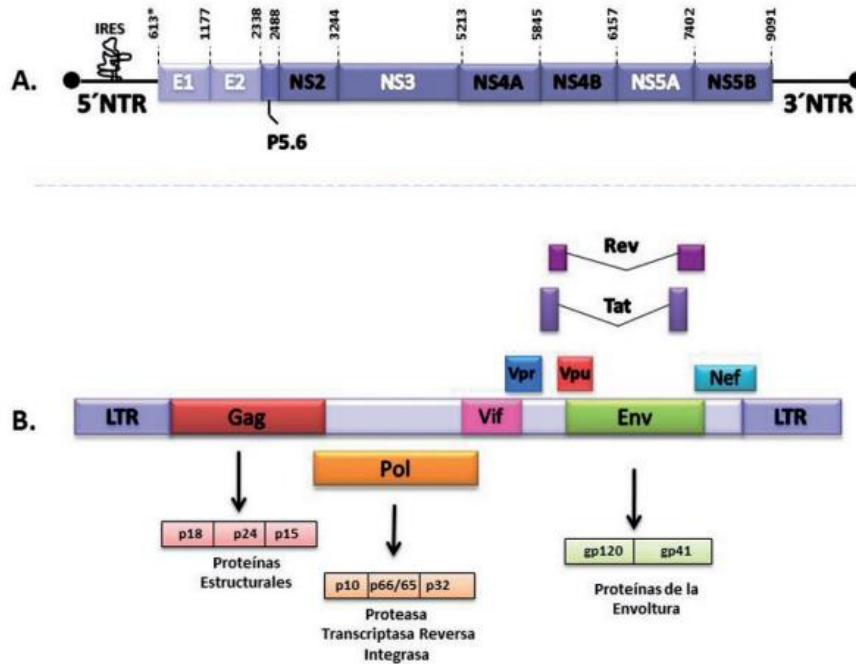


Fuente: <http://epidemiologiamolecular.com/wp-content/uploads/2009/02/clip-image0022.jpg>.

1.1.3. Estructura genética del VIH

El genoma del VIH está constituido por dos copias de ARN de cadena sencilla y polaridad positiva (Hu, 1990). Su genoma tiene una longitud de 9,8 Kb y está formado por tres genes estructurales y siete genes reguladores. Además, en su forma de provirus, el genoma viral se encuentra flanqueado por unas secuencias repetidas largas (LTR Long Terminal Repeat) que le permiten la integración en el genoma celular, y en las que se localizan los elementos reguladores de iniciación de la transcripción viral (Göttlinger, 1989b) (**Figura 2**). Los tres genes estructurales del VIH se denominan gag, pol y env, que codifican para las proteínas respectivas correspondientes a los antígenos internos, las enzimas Pro y RT y los antígenos externos (Tabla II). Los genes reguladores, entre otras funciones regulan la latencia o expresión del material genético viral integrado en el material celular (provirus) y se denominan: tat, rev, vpr, vif, vpu, nef y vif.

Figura 2. Organización genómica del VIH-1 y procesamiento de las proteínas víricas.



Fuente: Arroyave, J. C. (2013). Interacción entre el virus de la inmunodeficiencia humana y el virus GB tipo-C durante el estado de co-infección. Imagen tomada de: <https://doi.org/10.4067/S0716-10182013000100005>

Las regiones *gag* y *pol* del genoma se traducen en un precursor gag-pol (p160), procesado por la proteasa viral en un precursor de gag (Pr55^{gag}) que da origen a las cuatro proteínas que contribuyen a la formación del virión: la proteína matriz (MA, p17), la proteína de la cápside (CA, p24), y un precursor (p15) de las proteínas de la nucleocápside (NC, p7) y p6. La proteína MA procede del extremo N-terminal miristilado de Pr55^{gag} (Gaynor R., 1992). La mayoría de las moléculas MA están asociadas a la cara interna de la bicapa lipídica, estabilizando la partícula, y un pequeño porcentaje se une a la integrasa en el complejo de preintegración, facilitando la localización nuclear del ácido nucleico viral en ausencia de mitosis.

Este fenómeno le permite al VIH infectar células que no se están dividiendo, una característica inusual para un retrovirus (Temin, 1970). Las mutaciones que impiden la miristilación interfieren en la asociación estable de esta proteína a la membrana, así como en la infectividad del virión (Bryant, 1990; Lewis, 1992). La proteína de la cápside forma el *core* de las partículas virales y es el antígeno mayoritario. Su dominio N-terminal, comprendiendo los residuos 1 al 45, contiene funciones en la maduración del virión y en la incorporación de la proteína celular cyclophilina A (CypA), la cual juega un papel importante en los primeros pasos post-infección. El dominio c-terminal (residuos 151-231) incluye la secuencia encargada de la dimerización CA-CA, e interviene en las interacciones Gag-Gag. La región NC de gag juega un papel fundamental en varios pasos del ciclo viral: dimerización del ARN, ensamblaje de proteínas gag, encapsidación del ARN y en la síntesis del ADN proviral por la RT. La región p6 media las interacciones entre Pr55^{gag} y la proteína vpr, permitiendo la incorporación de vpr a los viriones. Estas proteínas son vitales para la integridad y estructura del virión (Göttlinger, 1989a).

El gen *pol* codifica las enzimas víricas proteasa (p15), retrotranscriptasa (RT) (p66/p51) e integrasa (p32). La proteasa cataliza el procesamiento postraduccional de los precursores a las proteínas estructurales y las enzimas. La RT presenta dos dominios, uno con actividad polimerasa ARN y ADN dependiente (Gelderblom, n.d.) y otro con actividad endonucleolítica de ribonucleasa H (RNasa H). La integrasa presenta las actividades enzimáticas requeridas para catalizar la reacción de integración del ADN viral en el cromosoma de la célula huésped, las mutaciones que afectan a su estructura bloquean la replicación viral afectando a la integración, pero no a la síntesis del ADN. Usando IN purificada a partir de viriones, o preparada por sistemas de expresión, se vio que poseía dos funciones enzimáticas: Primero reconoce y se une a ADN de doble cadena, en la secuencia ATT en el extremo de la LTR, catalizando la separación de dos bases en el extremo 3'; posteriormente une este sustrato por el grupo OH 3' libre al extremo 5' del ADN "diana", generando un provirus integrado flanqueado por dos secuencias repetidas de 5 pares de

bases(Goff, 1990). Las proteínas codificadas por el gen *env* se originan a partir de un precursor (gp160), que es modificado posteriormente por glicosilación.

Tras el procesamiento proteolítico por enzimas celulares se originan las dos proteínas de la envoltura, la proteína de superficie (SU, gp120) y la proteína transmembrana (TM, gp41). Estas dos proteínas se mantienen asociadas y ancladas a la membrana celular por un dominio hidrofóbico cercano al extremo C-terminal. La delección de esta secuencia hidrofóbica hace que estas proteínas sean liberadas en su forma soluble. La proteína de superficie contiene los sitios de unión a los receptores celulares y los epítomos principales de neutralización por anticuerpos. La proteína transmembrana es la responsable de la fusión de la envoltura del virus con la superficie de la célula, a través de una región hidrofóbica amino terminal, una vez que se ha producido la interacción del virus con los receptores de quimioquinas. Una diferencia fundamental de los lentivirus con respecto a otros retrovirus es la existencia de varios genes reguladores. En el caso del VIH las proteínas reguladoras son *tat*, *rev*, *nef*, *vpr*, *vif* y *vpu*. La proteína *tat* (p16/p14) se une a la región TAR, localizada en la región R de la LTR del ADN viral(Feng, 1988; Roy, 1990; Shibuya, 1992)y junto con otros transactivadores de origen celular (como SP1 y NFκβ), activa el inicio de la transcripción y la elongación de los transcritos formados durante la transcripción tempran (Gaynor, 1995; Sodroski, 1985) a. *Rev* (p19) interacciona con su secuencia diana “Rev response element” (RRE), localizada en la región *env*, y regula el transporte de los ARN mensajeros (ARNm) al citoplasma, así como su procesamiento(Malim, 1989).

Los productos de los genes *tat* y *rev* requieren localización nuclear para ejercer su función(Ruben, 1989). Nef (p27-p25) es una proteína miristilada que tiene múltiples acciones: disminución de la expresión de CD4 en la superficie celular(Garcia, 1992), perturbación de la activación de células T y estimulación de la infectividad. Se la puede considerar un factor de virulencia en la patogenia de la infección por VIH, ya que se han encontrado virus con delecciones en *nef*(Deacon,

1995) o con mutaciones puntuales (Premkumar, 1996) en pacientes no progresores (LTS). La proteína Vpr (p10-15) es incorporada al virión por la proteína p6 y facilita la localización nuclear del complejo preintegración en ausencia de mitosis (Heinzinger, 1994), bloquea a las células en fase G2 del ciclo celular (Bartz, 1996) y además, es un transactivador débil. Vif (p23) está asociada a la infectividad y vpu (p16) facilita la salida de los viriones de la célula (Klimkait, 1990). El genoma viral, en su forma de provirus, se encuentra flanqueado por secuencias denominadas LTR (repeticiones terminales largas) que le permiten la replicación e integración en el genoma celular. Las LTRs contienen sitios de unión para proteínas celulares que activan la transcripción y están a su vez bajo el control de señales virales.

Tabla II. Proteínas del virus de la inmunodeficiencia humana.

Proteínas	Tamaño (Kda)	Función
Proteínas estructurales		
Precursor Gag	Pr55	Precursora de otras de menos peso molecular p17,p24,p6
MA	P17	Proteína miristilada de la matriz
CA	P24	Proteína de la cápside
NC	P7	Proteína de la unión a nucleótidos. Rica en prolinas
Precursos Gag-pol	Pr170	Maduración de nuevos viriones
Proteasa (Pro)	P14	Procesamiento postraduccional

Transcriptasa Reversa(TR) Integrasa	P66/P51 P32	Transcriptasa reversa y actividad ARNasa H Integración del ADNc Viral
Precursor Env Proteína de Superficie SU Proteína Transmembranal TM	Gp160 Gp120 Gp41	Dirige las glucoproteínas a la membrana Glucoproteína de superficie Glucoproteína transmembrana
Proteínas Reguladoras		
Tat	P15	Transactivador de transcripción de todos los ARNm del VIH
Rev	P19	Regulación del transporte y expresión del ARNm
Nef	P27	Aumenta la infectividad del virión, función pleitrópica, interacciones intracelulares. Efector Negativo.
Proteínas Accesorias		
Vif	P23	Aumenta la infectividad del virión y ayuda a la síntesis del ADN proviral y al ensamblaje
Vpr	P15	Facilita la entrada al núcleo del complejo de preintegración

Vpu	P16	Aumenta la liberación de viriones
Tev	P26	Interviene en la degradación del CD4 Activa el tat y el rev

Fuente: Modificado de Peirado, 1995; Carrasco, 1996; Medrano, Black & Black, 2012; Knipe & Howley, 2013.

1.1.4. Ciclo de Vida del VIH

El ciclo de replicación de los lentivirus se divide en dos fases: fase temprana y fase tardía. La fase temprana comienza con la unión del virus a la célula y continúa con la retrotranscripción del genoma viral y formación del provirus integrado en el genoma celular. La fase tardía comienza después de un período de latencia con la transcripción del ARN viral a partir del ADN proviral y finaliza con la liberación de los viriones al exterior de la célula. El ciclo biológico del VIH se inicia con su entrada en la célula diana mediante la interacción entre la gp120 con un receptor y un correceptor celulares. El receptor es la molécula CD4, localizada en la superficie de los linfocitos T colaboradores y en células de la estirpe monocito-macrófago, lo que determina el tropismo viral por estos tipos celulares (Dalglish AG, 1984; Klatzmann D, 1984). Además se requiere la interacción del VIH con algún receptor de quimiocinas: CXCR4, que es el receptor de la quimoquina SDF-1, y el CCR5 o receptor fusina que es el receptor de las quimoquinas RANTES, MIP-1 α y MIP-1 β (Fauci, 1996; Zhang, 1997).

Se han descrito también variantes virales capaces de unirse a CCR2, CCR3 o capaces de entrar en la célula a través de múltiples correceptores (Choe H, 1996). La unión del VIH se inicia mediante la interacción específica de la glicoproteína Gp120 de la envuelta viral y el dominio amino-terminal del receptor CD4 (Rinaldo,

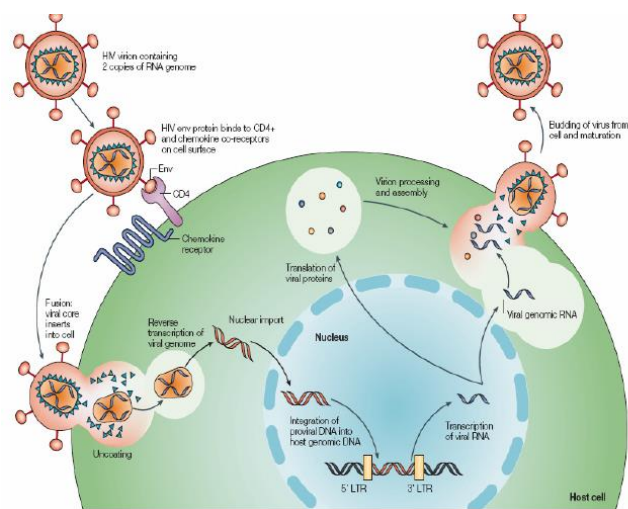
1998), provocando cambios conformacionales en la envuelta viral que permitirían la exposición del dominio de interacción de la gp120 con los receptores de quimiocinas CCR5 o CXCR4. La interacción con estos correceptores provocaría nuevos cambios conformacionales que expondrían el dominio N-terminal de la gp41, conduciendo a la fusión de membranas e internalización de la nucleocápside viral.

Después de la fusión, la nucleocápside del virus se libera al citoplasma y se inicia el proceso de transcripción inversa de una de las hebras de ARN viral por la enzima retro-transcriptasa (RT) transportada por el propio virión(Retroviruses, 1988). Durante este proceso, la enzima RT se une al ARN viral y a una molécula de ARN de transferencia (ARNt) específico del aminoácido Lisina, que se une a una secuencia complementaria en el ARN viral y es usado como cebador por la RT. Primero se sintetiza una hebra de ADN de polaridad negativa y después la hebra positiva, para formar la molécula de ADN lineal de doble cadena, debido a la actividad ADN polimerasa y RNAsa de la RT, genera una doble hebra de DNA duplicando los LTR, que se sitúan en ambos extremos del genoma viral. Este ADN es transportado al interior del núcleo de la célula, mediante un proceso activo que depende de la presencia de señales de localización celular en algunas proteínas virales que forman parte del complejo de preintegración.

Una vez en el núcleo el ADN lineal se integra de forma estable en el genoma de la célula huésped mediante la integrasa viral, y se forma el provirus. El provirus integrado en el genoma de la célula diana puede permanecer latente durante largos periodos de tiempo, puede replicarse de forma controlada, o bien experimentar una replicación masiva con el consiguiente efecto citopático sobre la célula infectada. La replicación del VIH se inicia con la síntesis del ARN mensajero a partir del ADN proviral integrado. La iniciación de la transcripción del provirus, depende de factores celulares y virales que interaccionan con las secuencias reguladoras localizadas en la región U3 de la LTR(Cellular transcription factors involved in the regulation of HIV-1 gene expression., 1992).

Estos elementos celulares se unen al promotor viral y aumentan la expresión genética del VIH-1 en respuesta a la estimulación celular por diferentes mecanismos, como citoquinas exógenas, y permiten la formación y activación del complejo transcripcional primario con la ARN polimerasa II celular. El ARN se sintetiza en forma de un único transcrito en el núcleo, y es transportado al citoplasma y procesado en transcritos de distintos tamaños, que utilizando la maquinaria celular dan lugar a la formación de las proteínas virales en un proceso en el que es necesaria la acción de la proteína viral Rev (Messenger RNA transport and HIV rev regulation., 1990). Posteriormente se produce la maduración del virión con ayuda de la proteasa viral. Estas partículas maduras son capaces de infectar nuevos linfocitos T CD4+. La mayor parte del virus ($\geq 99\%$) que se detecta en el plasma en cualquier momento de la infección procede de células T CD4+ activadas, infectadas recientemente (A. S. , E. P. , C. Y. , V. M. , H. A. , S. K. , M. M. , and H. D. D. Perelson, 1997). La vida media de estas células productivamente infectadas es muy corta (1 a 2 días) y se estima que cada día se destruyen entre 10^7 y 10^8 de estas células (A. S. , N. A. U. , M. M. , L. J. M. , and H. D. D. Perelson, 1996).

Figura 3. Ciclo replicativo del VIH



Fuente: (Tomada de Rambaut et al., 2004).

1.1.5. Patogenia de la infección por VIH

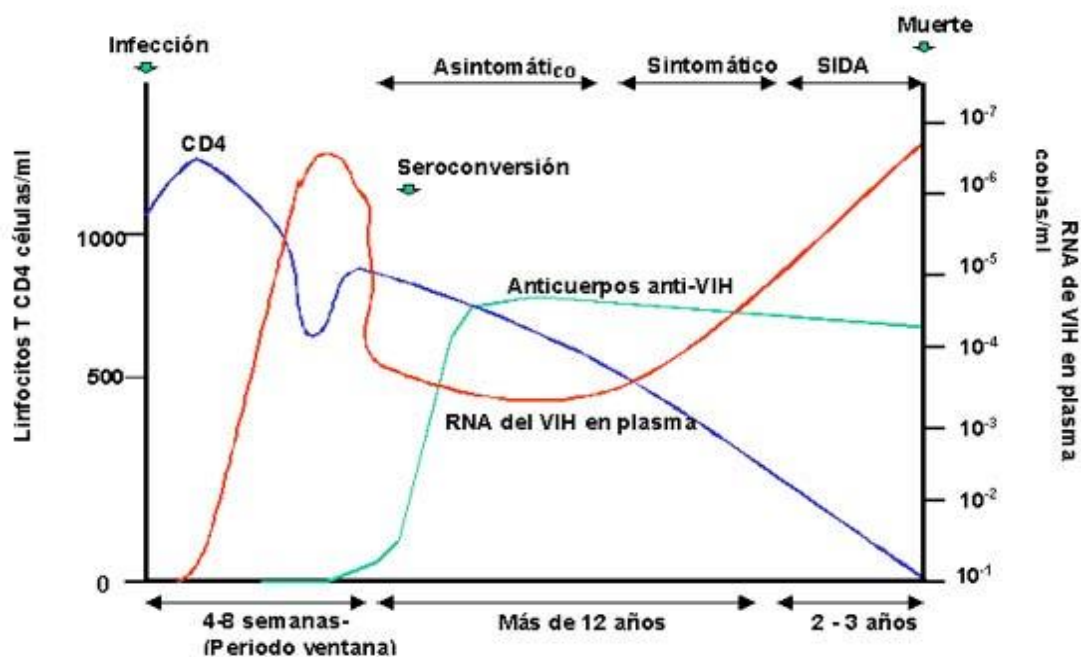
El curso clínico de la infección por el VIH incluye por lo general tres fases: a) infección primaria, b) fase asintomática, y c) la enfermedad de sida propiamente dicha. Durante la infección primaria, la alta replicación viral inicial conduce a una rápida diseminación del virus en órganos linfoides y otros tejidos del paciente infectado (Grossman, 2006), en donde aparece un síndrome similar a una mononucleosis aproximadamente de 3 a 6 semanas después de la infección (Tindall B, 1991). Entre 2 ó 3 semanas post-infección y asociado con el desarrollo de una fuerte respuesta celular T citotóxica, que precede a la aparición de anticuerpos específicos (Borrow, 1997), se produce una drástica caída en los niveles de ARN vírico en plasma y un restablecimiento del número de células T CD4+ (Gaines H, 1990). Este nivel basal de replicación viral varía de un individuo a otro constituyendo un importante marcador virológico de progresión de la enfermedad (J. W. , K. L. A. , R. J. C. R. , T. J. A. , H. B. S. , K. R. P. , and G. P. Mellors, 1995; J. W. , R. C. R. , Jr. , G. P. , W. R. M. , T. J. A. , and K. L. A. Mellors, 1996).

Después de la primoinfección, se inicia la fase clínicamente asintomática, de duración variable, entre la infección primaria y el desarrollo del SIDA. Durante el período asintomático de la infección, la replicación del virus es continua (Embretson, 1993; Pantaleo, 1993), pero el individuo mantiene una fuerte respuesta inmune frente al virus, estableciéndose un estado de equilibrio, en el cual la producción y eliminación del virus alcanza valores semejantes (Silvestri, 2003). Como resultado, los niveles de ARN vírico en plasma permanecen estables (Gange, 2001). Pero el número de células T CD4+ disminuye lentamente con una tasa media estimada de 25-60 células/ μ l/año (Lang, 1989) y el virus invariablemente escapa al control inmune.

La última etapa de la enfermedad, en ausencia de tratamiento antirretroviral, se caracteriza por un aumento de la replicación del VIH-1 y coincide clínicamente

con una marcada disminución en el número de células T CD4+ (< 300 células/ μ l) (Goudsmit, 2002; Rodes, 2004) y una profunda alteración del estado general del paciente, caracterizada por la aparición de infecciones oportunistas graves, ciertas neoplasias y alteraciones neurológicas (Fig. 4).

Figura 4. Representación esquemática del curso de la infección por VIH-1 en adultos.



Fuente: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/virologia/sida-vih.html>

1.1.6. Clasificación del VIH

El VIH se clasifica en VIH-1 y VIH-2. El VIH-1 es el causante de la pandemia mundial de SIDA mientras que el VIH-2, aunque también puede producir SIDA, se considera menos patogénico y menos transmisible. Actualmente predomina el VIH-1 en la mayor parte del mundo, mientras que el VIH-2 se ha localizado en ciertas

regiones del África occidental. El VIH-1 se ha clasificado en tres grupos según su homología genética: M, O y N; el grupo M es el que mejor se ha adaptado al humano y se ha diseminado a nivel mundial, dentro de él se han identificado 9 subtipos (A,B,C,D,F,G,H,J,K), además de numerosas cepas recombinantes, se cree que estas se cepas se formaron en África Occidental.

Según análisis de secuencias se puede establecer que la variación genética entre subtipos es de un 20 a 35%. En cambio, los grupos O y N son menos infectivos y se consideran, hasta la fecha, endémicos de Camerún y países que lo rodean, estos grupos se encuentran en 1 al 5% de las infecciones por VIH en esta región. En África coexisten prácticamente todos los subtipos con predominio del C. En Europa y en el continente americano predomina el subtipo B y en la antigua Unión Soviética el subtipo A. En el sureste de Asia predomina la forma recombinante AE, mientras que en el sur de ese continente existe preponderancia del subtipo C y formas recombinantes BC. El VIH-2 cuenta con ocho subgrupos caracterizados que van desde el A al H. Las infecciones por VIH-2 se encuentran restringidas a África occidental. En esta zona se encuentran todos los subgrupos conocidos, siendo los más comunes el A y el B(Bennett D, 2009a).

1.1.7. Epidemiología del VIH

Se estima, por la Organización Mundial de la Salud (OMS), que para el final del 2022 más de 39 millones de personas vivían con VIH, 630,000 murieron debido a complicaciones relacionadas al VIH y que la transmisión del virus persiste en todos los países. La epidemia se encuentra concentrada en el África, siendo esta la zona más afectada por contar con 2/3 de los afectados viviendo dentro de ella(World Health Organization, 2023). Se estima que el número de nuevas infecciones por VIH en América Latina aumentó un 4,7% de 2010 a 2021, con aproximadamente 110.000 nuevas infecciones en 2021. La epidemia de VIH en la Región afecta

desproporcionadamente a ciertas subpoblaciones (poblaciones clave), incluidos los hombres que tienen sexo con hombres (HSH), las mujeres transgénero y las trabajadoras sexuales. En América Latina, estas tres poblaciones clave representan más de la mitad de las nuevas infecciones en 2021 (Organización Panamericana de la Salud, 2023).

En nuestro país la epidemia continúa siendo concentrada en hombres que tienen sexo con hombres, personas que usan drogas inyectables, hombres trabajadores sexuales y en menor medida en mujeres trabajadoras sexuales y personas privadas de la libertad. A nivel nacional Baja California se encuentra en el lugar número 8 en casos notificados de VIH. En este estado se han reportado aproximadamente 8,884 casos de VIH desde el primer caso diagnosticado en el país, 4.4% de casos con respecto al total nacional. De los cuales el 81% corresponde a personas del género masculino y el 19% a población femenina (Secretaría de Salud México, 2022).

1.1.8. Tratamientos antirretrovirales

A la fecha no se ha logrado establecer una terapia dirigida a pacientes infectados con VIH que sea curativa, pero el desarrollo de los antirretrovirales (ARV) a través de los años, ha brindado grandes logros en la reducción de la morbilidad y mortalidad por esta causa. En 1984 ya se disponía del primer inhibidor nucleosídico de la reverso transcriptasa (NRTI), la zidovudina. Durante una década se aceptaron para su uso nuevos fármacos de la misma familia y es hasta 1996 cuando se comercializa el primer inhibidor de la proteasa (PI) y se instaura el tratamiento de combinación con tres fármacos, Tratamiento Antirretroviral de Gran Actividad (TARGA). Es hasta 1997 cuando se implementan a la terapia los Inhibidores no nucleosídicos de la reverso transcriptasa (NNRTI). Actualmente hay más de 30 fármacos que han sido aprobados por la FDA (Food and Drug Administration por sus

siglas en inglés) dirigidos a cinco de los pasos de replicación del virus, acoplamiento, fusión, transcripción reversa, integración y maduración mediada por proteasa. Los propósitos de la terapia antirretroviral son lograr y mantener la supresión viral en pacientes infectados, reducir la morbilidad y mortalidad asociadas al VIH y disminuir el riesgo de nuevas infecciones por vía sexual(US Food and Drug Administration, 2008).

1.1.8.1 Inhibidores Nucleósidos de la Transcriptasa Reversa

Los NRTI, como su nombre lo dice, alteran la función de la enzima reverso transcriptasa del VIH evitando la inserción del material genético viral al de la célula huésped. Los NRTI, requieren de un proceso de fosforilación previo a competir con los nucleósidos naturales en su incorporación a la cadena de ADN naciente generada por la reverso transcriptasa, de esta forma detienen elongación de la cadena de ADN, de esta forma terminando la cadena. Existen ocho antivirales de esta clase aprobados por la FDA: abacavir, didanosina, emtricitabina, lamivudina, stavudina, zalcitabina, zidovudina y tenofovir(Adams J, 2010).

1.1.8.2. Inhibidores no Nucleosidos de la Transcriptasa Reversa

Los NNRTI no necesitan de ningún cambio metabólico para realizar su acción actúan directamente uniéndose a una zona cercana al sitio catalítico de la retro transcriptasa formando un complejo hidrofóbico. Esta unión cambia la conformación espacial del sitio de unión al sustrato y reduce la actividad de la enzima. A diferencia de los NRTI esta familia de antivirales solo es activo contra el VIH-1, ya que no inhibe a la transcriptasa reversa de otros lentivirus como el VIH-2 o en virus de inmunodeficiencia de los simios. Actualmente existen cuatro NNRTI aprobados para su uso: neviraparina, efavirenz, delavirdina y etravirina(Anta L, 2012).

1.1.8.3. Inhibidores de la Proteasa

La proteasa es una enzima del virus encargada de la escisión de las poliproteínas Gag y Gag-Pol que dan lugar a la producción de proteínas funcionales indispensables para la maduración de los nuevos viriones. El rompimiento de Gag origina tres importantes proteínas: p24, p17 y p7 que conforman parte del centro del virus, y otras tres pequeñas proteínas: p6, p2 y p1 funcionales en el proceso de exportación viral. La poliproteína Gag-Pol da origen a las enzimas: transcriptasa reversa, integrasa y proteasa. Los inhibidores de la proteasa son diseñados para unirse al sitio activo de esta enzima y se consideran los fármacos antivirales más potentes hasta el momento. Son diez los fármacos aprobados para su uso dentro de esta clase: amprenavir, atazanavir, darunavir, fosamprenavir, indinavir, lopinavir, nelfinavir, ritonavir, saquinavir y tipranavir(Novak, 2005; Wensing, 2005).

1.1.8.4. Inhibidores de la integrasa

La integrasa es la enzima encargada de integrar el ADN sintetizado por la transcriptasa reversa al material genético de la célula hospedera. La acción de los inhibidores de la integrasa es posible por dos mecanismos de acción distintos: la unión al complejo entre la integrasa y el ADN viral, o interactuando con los cofactores de ion magnesio en el sitio de acción de la integrasa y también en el ADN. Raltegravir es el primer medicamento de este grupo aprobado para su administración(Betancor G, 2012).

1.1.8.5. Inhibidores de la fusión

Son tres los mecanismos que permiten la entrada del VIH a la célula huésped: la unión del virus con el receptor CD4, la unión a correceptores y la fusión. Los inhibidores de fusión actúan sobre el último paso de entrada del virus a la célula. Enfuvirtida es el primer antirretroviral que ha sido aprobado, es un péptido de 36 aminoácidos que se une a un sitio específico de la glicoproteína transmembrana gp41 evitando los cambios conformacionales necesarios para la entrada del virus a la célula huésped(Asahchop E, 2011; Bennett D, 2009b; Geretti A M., 2006; A. S. , N. A. U. , M. M. , L. J. M. , H. D. D. Perelson, 1996)

1.1.8.6. Combinaciones multiclase

El esquema de tratamiento antirretroviral combinado o TARGA consiste en la administración de tres ARV simultáneamente, con dos mecanismos de acción distintos. Inicialmente la terapia utilizaba dos NRTI y un PI, sin embargo, actualmente los esquemas evolucionan combinando fármacos de cualquiera de las clases antes descritas. El principal objetivo de esta estrategia es reducir la carga viral de los pacientes a niveles indetectables y reestablecer su sistema inmunológico, gracias a ello se disminuye la probabilidad de infecciones oportunistas o padecimientos asociado a inmunosupresión. La calidad y expectativa de vida también se ve beneficiada ya que a diferencia de la época en los inicios del descubrimiento del SIDA, la mayoría de las personas infectadas morían en cortos periodos de tiempo y en condiciones deplorables, este tipo de tratamiento ha permitido tratar la enfermedad como una infección crónica, generalmente asintomática, con una expectativa de vida similar a la de una persona no infectada. Con el paso de los años se han desarrollado formulaciones farmacéuticas que combinan varios ARV de una misma o de distinta clase en una sola píldora, lo que facilita su administración y mejora el apego a la terapia, ya que en el mejor de los casos la persona solo tiene que tomar una capsula diariamente. Ejemplos de esas presentaciones son: Atripla (tenofovir+emtricitabina+efavirenz), Combivir (zidovudina+lamivudina), Kivexa

(lamivudina+abacavir), Truvada (tenofovir+emtricitabina), entre otras(Clavel F, 2004; Johnson V A, 2010).

1.1.9. Farmacorresistencia en el VIH

1.1.9.1 Cambios genéticos en el VIH que confieren farmacorresistencia

El tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA) ha permitido disminuir la progresión a SIDA y aumentar la supervivencia de los pacientes infectados con VIH, pero estos beneficios pueden verse comprometidos por el desarrollo de una pérdida de susceptibilidad a los antirretrovirales(Bennett D, 2009a). La resistencia es consecuencia del desarrollo de mutaciones que aparecen en los genes del VIH que codifican las proteínas virales ya que son la diana de los antirretrovirales. Como resultado, se produce una pérdida total o parcial de la susceptibilidad al inhibidor, invalidando su empleo con fines terapéuticos.

Se detectan virus con mutaciones de resistencia en al menos una familia de fármacos en alrededor del el 50% de los pacientes que están tomando tratamiento antirretroviral y presentan viremia detectable. Puesto que los virus con estas mutaciones a menudo muestran resistencia a más de un fármaco, la resistencia cruzada entre familias es muy elevado(Adams J, 2010; US Food and Drug Administration, 2008) y la aparición de resistencias compromete la respuesta a muchas opciones futuras de tratamiento.

1.1.9.2. Selección del virus resistente

El VIH, al igual que otros virus con genoma ARN, presenta una gran variabilidad genética, que se debe fundamentalmente a que la retrotranscriptasa (RT), enzima clave en la replicación del material genético viral, carece de actividad exonucleasa 3'→5', correctora de errores (Anta L, 2012). Por otra parte, puesto que la tasa de replicación del VIH es extraordinaria, del orden de 10×10^{10} partículas virales nuevas cada día, el resultado combinado de ambos fenómenos, junto con la elevada tasa de recombinación de estos virus, hacen posible que en un determinado momento puedan existir en cada sujeto infectado todas y cada una de las posibles variantes del virus, lo que se conoce como estructura genética de cuasiespecies. Entre el espectro de mutantes presentes de manera natural se encuentran aquellas que causan resistencia a los fármacos antivirales, y su proporción respecto al total de la población viral (del orden de 10×10^{12} partículas virales en cada sujeto infectado) dependerá del grado relativo de capacidad de replicación (fitness) que cada variante tenga en ese ambiente y momento concretos.

Cuando se administra un fármaco, tiene lugar la selección de la variante con una menor susceptibilidad al mismo, que con el tiempo podrá llegar a constituirse como población mayoritaria en el huésped. Cada antirretroviral muestra un mayor o menor grado de susceptibilidad para desarrollar mutaciones de resistencia. De este modo, algunos se definen como fármacos de barrera genética baja para la resistencia, puesto que la presencia de una o dos mutaciones confiere resistencia de alto grado a dicho fármaco, mientras que otros requieren la acumulación de varias mutaciones para presentar cierto grado de resistencia. A estos últimos se les denomina fármacos de barrera genética alta. La TARGA, puede prevenir la aparición de virus resistentes, debido a que logra ser lo suficientemente potente para suprimir hasta niveles indetectables la replicación del virus (Novak, 2005). Por tal motivo su administración previene la acumulación de mutaciones y el desarrollo de resistencias.

1.1.9.3. Mecanismos e identificación de la resistencia farmacológica en el VIH

La mayoría de las mutaciones de resistencia son simples sustituciones de aminoácidos, pero otras se caracterizan por la inserción o delección de uno o más aminoácidos en la secuencia normal de las proteínas virales (Betancor G, 2012; Wensing, 2005). Normalmente, las mutaciones de resistencia alteran la forma y las propiedades bioquímicas de las proteínas virales y son capaces de reducir su actividad farmacológica mediante distintos mecanismos. Éstos varían según la familia de antirretrovirales o incluso según fármacos concretos.

La magnitud de la reducción de la susceptibilidad, conferido por mutaciones de resistencia a los medicamentos, varía ampliamente y está modulado por el área genética de la secuencia del VIH en la que se produce la mutación. A pesar de que las mutaciones dan como resultado un espectro de grados de resistencia, las mutaciones han sido arbitrariamente designado como mayor o menor. Los definidos como mayores tienden a ocurrir más temprano durante el fracaso del tratamiento y generalmente confieren mayores reducciones en la susceptibilidad. La identificación de mutaciones asociadas a la resistencia farmacológica en el VIH se ha realizado mediante los siguientes criterios. Mediante secuenciación de nucleótidos de virus de pacientes en quienes el fármaco está fallando, experimentos de mutagénesis dirigida, pruebas de susceptibilidad en aislados clínicos, asociación de genotipo con la respuesta virológica del paciente (A. S. , N. A. U. , M. M. , L. J. M. , H. D. D. Perelson, 1996).

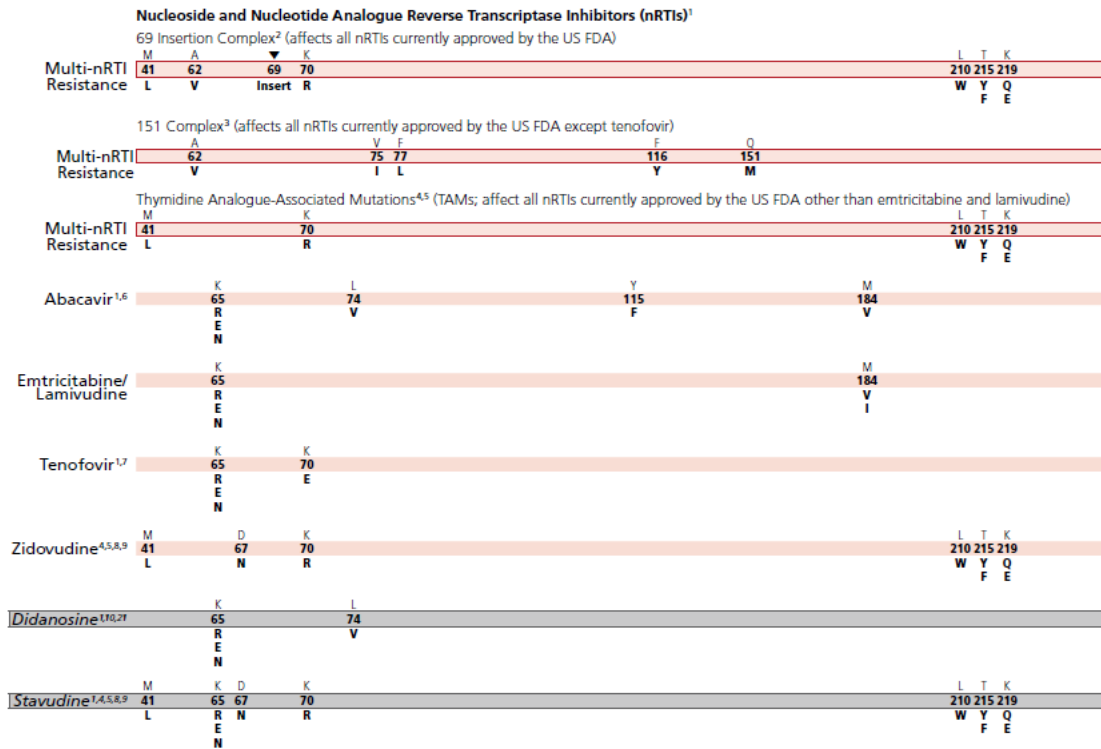
1.1.9.4. Resistencia a los inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos (NRTI)

Los NRTI necesitan ser fosforilados por las enzimas celulares, y de esta forma compiten con los dideoxinucleósidos naturales en su incorporación para la síntesis de la nueva cadena de ADN pro viral, provocando su terminación anticipadamente.

Existen varias mutaciones individuales o grupos de ellas involucradas en la resistencia a los análogos de nucleósidos, y que originan resistencia principalmente a través de dos mecanismos. El primero está producido por mutaciones que aumentan el grado de retirada de los terminadores de cadena (p. ej. pirofosforólisis), permitiendo así que continúe la síntesis de la cadena de ADN. El segundo está mediado por mutaciones que permiten a la RT discriminar entre nucleósidos naturales y sintéticos, impidiendo la incorporación del inhibidor (A. S. , N. A. U. , M. M. , L. J. M. , H. D. D. Perelson, 1996). Cada uno de ellos actúa con combinaciones de mutaciones diferentes. Las mutaciones más frecuentes que aparecen en muestras clínicas de pacientes en tratamiento con NRTI son aquellas implicadas en la resistencia al AZT. Aparecen en seis codones (M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y/F y K219Q/E). Aunque inicialmente se pensó que eran específicas del AZT, posteriormente se observaron en pacientes que fracasaban en primera línea al d4T65. Son responsables del mecanismo de resistencia mediado por la pirofosforólisis, y comprometen no sólo la actividad de AZT y d4T sino, en grado diverso, la de otros NRTI, como ddI, TDF, ABC e incluso 3TC (Asahchop E, 2011; Betancor G, 2012; A. S. , N. A. U. , M. M. , L. J. M. , H. D. D. Perelson, 1996).

Figura 5 Mutaciones de resistencia a los inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos (NRTI).

MUTATIONS IN THE REVERSE TRANSCRIPTASE GENE ASSOCIATED WITH RESISTANCE TO REVERSE TRANSCRIPTASE INHIBITORS



En la Figura 5 se puede observar la posición del aminoácido dentro de la secuencia de la proteína transcriptasa reversa anotada mediante un número, el mismo número de posición contiene una letra arriba y abajo. Las letras son el código de cada aminoácido asignado según la nomenclatura común de los aminoácidos. La letra sobre el número indica el aminoácido de la cepa silvestre y el que se encuentra por debajo indica el aminoácido adquirido debido a la mutación. Los aminoácidos de sustitución que se encuentran en negritas son mutaciones que confieren una resistencia mayor en el VIH. **Fuente:** Wensing, A. M., Calvez, V., Ceccherini-Silberstein, F., Charpentier, C., Günthard, H. F., Paredes, R., Shafer, R. W., & Richman, D. D. (2022). 2022 update of the drug resistance mutations in HIV-1. *Topics in antiviral medicine*, 30(4), 559–574.

Aunque estas mutaciones (TAM, thymidin-associated mutations) no se seleccionan apenas durante la monoterapia con ddl o ABC, si están presentes disminuyen la sensibilidad a estos inhibidores. Excepto para AZT, ninguna TAM

individual basta para producir resistencia significativa a otros análogos de nucleósidos. Por lo tanto, la resistencia a través de las TAM requiere la acumulación gradual de las mutaciones que conducen a niveles crecientes de resistencia y a la producción de resistencia cruzada a más análogos de nucleósidos. El cambio M184V en la posición 184 de la RT produce alto nivel de resistencia (> 100 veces) al 3TC (barrera genética baja)(Geretti A M., 2006). Ésta es la mutación que se selecciona prioritariamente en pacientes que reciben una terapia insuficiente con 3TC o FTC. Aunque M184V puede participar en la resistencia al ABC, no induce una resistencia cruzada significativa a otros nucleósidos. Además, M184V revierte parcialmente el efecto de las mutaciones del AZT, es decir, los aislados que presentan una pérdida de sensibilidad al AZT por la presencia de M41L + T215Y (u otras) muestran una recuperación parcial de la sensibilidad al AZT cuando está presente M184V. Este mismo efecto puede observarse para d4T y TDF. Por el contrario, la presencia de M184V incrementa el nivel de resistencia al ABC, ddl, ddC adquirido con las TAM.

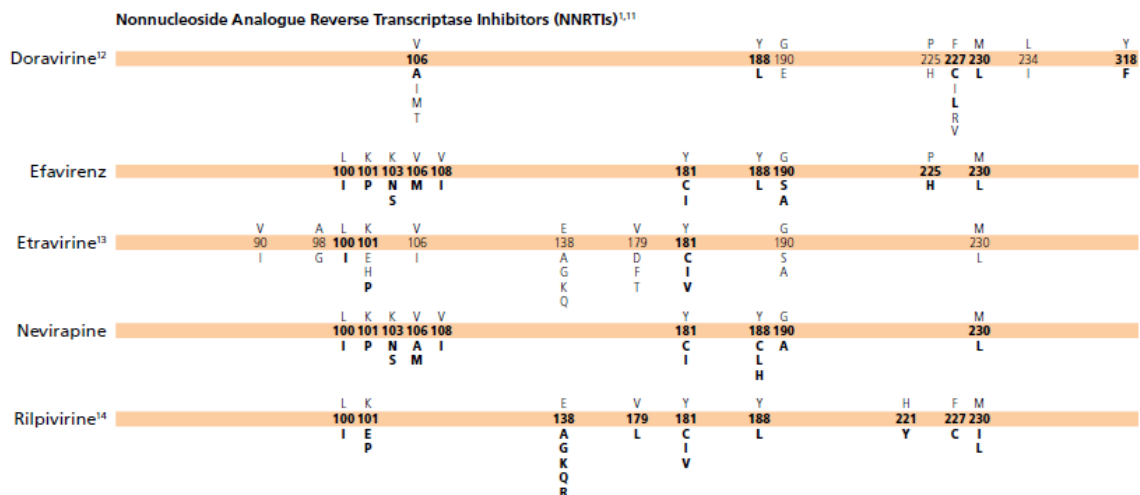
Las mutaciones K65R y L74V se han descrito también en casos de fracaso a tratamientos de primera línea con ddl y ddC. La mutación L74V es particularmente frecuente en pacientes con fracaso a ddl en monoterapia, pero se observa ocasionalmente en pacientes que han recibido este fármaco junto con otros análogos de nucleósidos(Clavel F, 2004). Por otra parte, la principal mutación de resistencia en caso de fracaso de regímenes de primera línea con TDF es K65R(Bennett D, 2009b). En pacientes pretratados, la aparición de esta mutación en el fracaso con TDF es < 3%, aunque su prevalencia va en aumento(Johnson V A, 2010; Llibre M J, 2010). Por una parte, la presencia previa de TAM compromete la respuesta al TDF y, por otra, la mutación K65R y las TAM son mutaciones antagónicas, por lo que es difícil encontrarlas simultáneamente. En regímenes que incluyen combinaciones de tres nucleósidos, entre los que se encuentran TDF y 3TC, alrededor de un 66% de los fracasos desarrollan las mutaciones K65R + M184V(Johnson V A, 2010). La presencia de estas dos mutaciones de manera conjunta compromete la respuesta a todos los nucleósidos, excepto al AZT(Llibre M J, 2010).

Existen, además, diferentes mecanismos de multirresistencia a nucleósidos. El primero de ellos está mediado por el complejo Q151M junto con una serie de mutaciones secundarias: F116Y, A62V, V75I, F77L. Las mutaciones secundarias compensan la pérdida de capacidad de replicación viral que induce la presencia de Q151M(Llibre M J, 2010). Este complejo puede conferir un elevado grado de resistencia a varios análogos de nucleósidos, salvo al 3TC y al TDF. El segundo genotipo de multirresistencia consiste en la inserción de dos cerinas en la posición 69 de la transcriptasa reversa. Estas inserciones nunca se observan solas, siempre aparecen tras la acumulación de TAM, disparando a niveles muy altos la resistencia a NRTI. La presencia de estos genotipos de multirresistencia en la población pretratada es < 5%. Sin embargo, entre los genotipos que confieren resistencia cruzada a los NRTI, la combinación de M184V junto con K65R, L74V o más de tres TAM (incluyendo siempre T215Y/F) son los más frecuentes(Paredes Roger and Buenaventura C., 2010; Vingerhoets J, 2010).

1.1.9.5. Resistencia a los inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos (NNRTI)

Los NNRTI se unen a un lugar próximo al centro catalítico de la enzima RT, inhibiendo la replicación del VIH por un desplazamiento de los residuos aspárticos relacionados con el sitio de unión de la polimerasa. Las mutaciones responsables de resistencia a los NNRTI se producen en el bolsillo hidrofóbico (pocket) de unión. Una única mutación puede producir un alto nivel de resistencia a uno o más fármacos de esta familia (barrera genética baja) La resistencia aparece rápidamente cuando uno de los NNRTI es administrado en monoterapia, o si la supresión viral no es completa. En la mayoría de los ensayos fenotípicos la pérdida de sensibilidad para cada uno de los inhibidores comercializados es de varias decenas a cientos de veces(Sitges, 2008).

Figura 6. Mutaciones de resistencia a los inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos (NNRTI).



En la Figura 6 se puede observar la posición del aminoácido dentro de la secuencia de la proteína transcriptasa reversa anotada mediante un número, el mismo número de posición contiene una letra arriba y abajo. Las letras son el código de cada aminoácido asignado según la nomenclatura común de los aminoácidos. La letra sobre el número indica el aminoácido de la cepa silvestre y el que se encuentra por debajo indica el aminoácido adquirido debido a la mutación. Los aminoácidos de sustitución que se encuentran en negritas son mutaciones que confieren una resistencia mayor en el VIH. **Fuente:** Wensing, A. M., Calvez, V., Ceccherini-Silberstein, F., Charpentier, C., Günthard, H. F., Paredes, R., Shafer, R. W., & Richman, D. D. (2022). 2022 update of the drug resistance mutations in HIV-1. *Topics in antiviral medicine*, 30(4), 559–574.

Las mutaciones que confieren resistencia a NNRTI comprometen en mayor o menor grado la respuesta a todos ellos. El cambio K103N es el más frecuente y produce una pérdida de sensibilidad de 20-50 veces a los tres NNRTI. El cambio en el codón 181 compromete, sobre todo, la sensibilidad a NVR otra mutación

importante es M230L, que disminuye la sensibilidad a EFZ alrededor de 20 veces, 40 a NVP y 60 a DLV3. Actualmente se encuentran en fases avanzadas de estudio nuevos NNRTI que presentan actividad frente a aislados altamente resistentes a NVP y EFZ. El TMC125 es un nuevo NNRTI que ha sido diseñado con una elevada barrera genética y es activo frente a virus que contienen hasta tres mutaciones asociadas con resistencia a NNRTI incluyendo Y181C/I33(Perno C F, 2006).

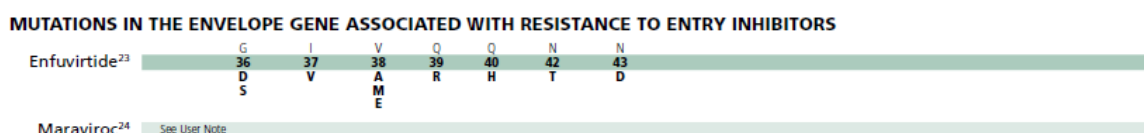
1.1.9.6. Resistencia a los inhibidores de la fusión

La entrada del virus en la célula es un proceso que requiere varios pasos. Cada uno de ellos representa una nueva diana para el diseño de antirretrovirales. Así, pues, tendremos inhibidores de la unión del virus al CD4, antagonistas de CCR5 o CXCR4, e inhibidores de la fusión del virus con la membrana celular. Los únicos comercializados hasta el momento son los inhibidores de fusión. Los antagonistas de CCR5 se encuentran en fases avanzadas de estudio en ensayos clínicos(Á. M. B. C. et al. García F, 2011). Nuestro conocimiento sobre la resistencia clínica de los inhibidores de la fusión se limita a la enfuvirtida (ENF), el único fármaco de este tipo utilizado en la actualidad. ENF se ha administrado a pacientes con fracaso a casi todos los antirretrovirales. En estos pacientes, ejerce una fuerte actividad antiviral, pero dado que el resto de los antirretrovirales empleados en la misma combinación suelen haber perdido una parte importante de su actividad, la respuesta al fármaco es a menudo transitoria(Á. M. F. Z. et al. García F, 2011).

Las mutaciones de resistencia a ENF surgen en la subunidad gp41 de la glicoproteína de la envoltura. Las principales mutaciones de resistencia a ENF abarcan del aminoácido 36 al 45 de la gp41, en el dominio HR1, pero conforme avanza la investigación en este campo se están descubriendo nuevas mutaciones. Concretamente, es de esperar que las mutaciones en HR1 se acompañen de otras en HR2 para compensar la reducción de la eficacia del plegamiento HR1/HR2 que

se produce como consecuencia de las mutaciones en HR1. Se ha observado un amplio rango de susceptibilidad a ENF en aislados virales de pacientes *naive* (personas sin historial de tratamiento). Los determinantes de esta variabilidad parecen ser independientes de polimorfismos en la región HR143. Estudios in vitro sugieren que la afinidad de la envuelta del virus por el correceptor, así como el nivel de expresión de los correceptores en la célula diana son, respectivamente, determinantes virales y celulares de la eficacia de los inhibidores de la entrada (Sterrantino G, 2012).

Figura 7. Mutaciones de resistencia a los inhibidores de entrada (IE)



En la Figura 7 se puede observar la posición del aminoácido dentro de la secuencia del gen de la envoltura del VIH anotada mediante un número, el mismo número de posición contiene una letra arriba y abajo. Las letras son el código de cada aminoácido asignado según la nomenclatura común de los aminoácidos. La letra sobre el número indica el aminoácido de la cepa silvestre y el que se encuentra por debajo indica el aminoácido adquirido debido a la mutación. Los aminoácidos de sustitución que se encuentran en negritas son mutaciones que confieren una resistencia mayor en el VIH. **Fuente:** Wensing, A. M., Calvez, V., Ceccherini-Silberstein, F., Charpentier, C., Günthard, H. F., Paredes, R., Shafer, R. W., & Richman, D. D. (2022). 2022 update of the drug resistance mutations in HIV-1. *Topics in antiviral medicine*, 30(4), 559–574.

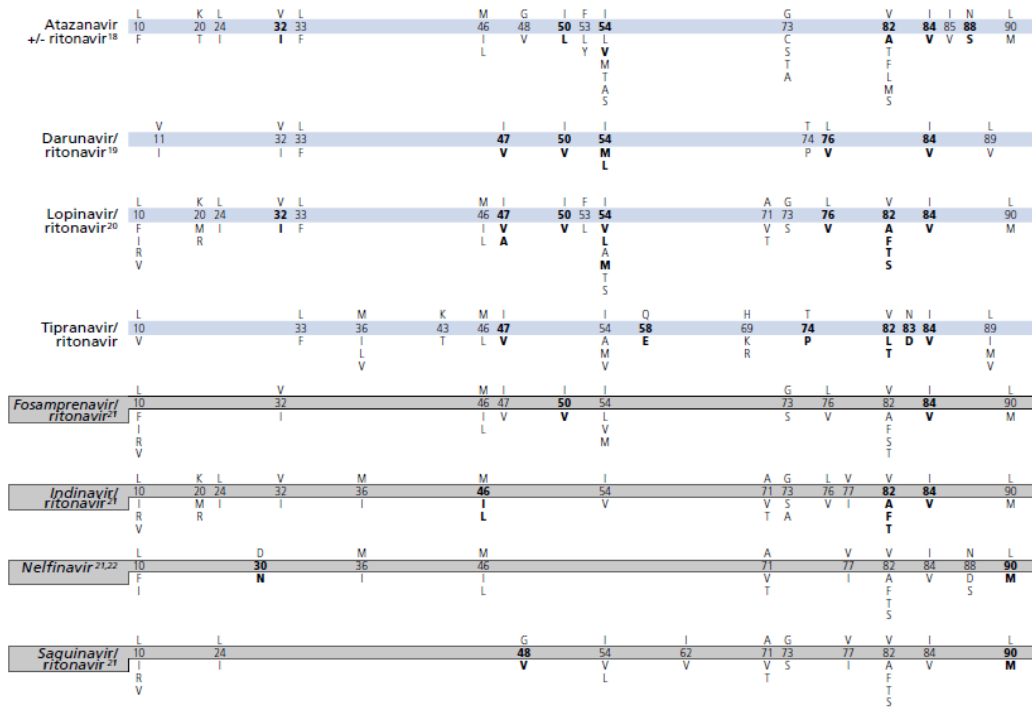
De este modo, altos niveles de expresión del correceptor CCR5 en la célula pueden inducir un mayor grado de resistencia a ENF. En cuanto a los antagonistas de CCR5, poco conocemos de la aparición de resistencias a los mismos. Se han propuesto dos mecanismos posibles: 1) desarrollo de mutaciones en el loop V3 del gen de la envuelta, y 2) cambios en el tropismo del virus de CCR5 a CXCR4. Sin embargo, los estudios in vitro llevados a cabo sugieren que la aparición de resistencias en la región V3 podría ser el mecanismo más frecuente sin observarse hasta ahora resistencia cruzada entre los distintos antagonistas en estudio(Wei X, 2002). En cuanto al cambio de tropismo, estaría más bien mediado por la presencia de poblaciones minoritarias de virus con tropismo CXCR4 en el conjunto de las cuasiespecies. Éstas emergerían tras la administración de los antagonistas de CCR5 y no por un cambio en el tropismo de los virus que son R5 trópicos(Urdaneta A, 2006; Westby M., 2007a).

1.1.9.7 Resistencia a los Inhibidores de la Proteasa

La resistencia a los inhibidores de la Proteasa está mediada por cambios estructurales que producen una reducción de la afinidad en el sitio activo de la enzima. Las mutaciones en sitios no relacionados al sitio activo de la proteasa son menos obvias y parecen involucrar mecanismos de alteración en la catálisis enzimática, estabilidad del dímero enzima-sustrato, alteraciones en la cinética enzimática o perturbaciones estructurales mayores. La resistencia a los IP en general se desarrolla lentamente, ya que requiere acumulación de mutaciones. Las mutaciones en los codones 10, 20, 36, 63,71, 77 y 93 se encuentran fuera del sitio activo de la enzima y no se asocian a altos niveles de resistencia; sin embargo, contribuyen a ella al asociarse a las otras mutaciones(Briz V, 2006).

Figura 8. Mutaciones de resistencia a los inhibidores de la proteasa (IP)

MUTATIONS IN THE PROTEASE GENE ASSOCIATED WITH RESISTANCE TO PROTEASE INHIBITORS (PIs)^{15,16,17}

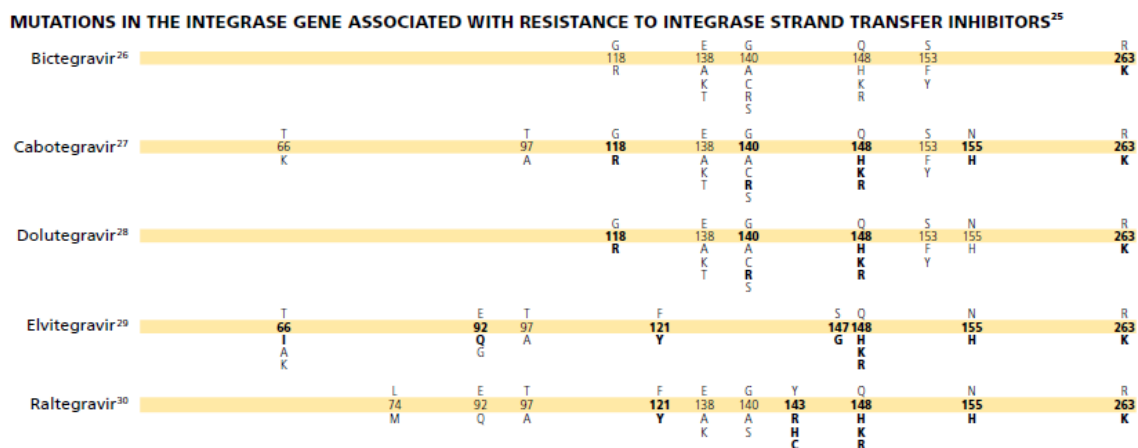


En la Figura 8 se puede observar la posición del aminoácido dentro de la secuencia del gen de la proteasa del VIH anotada mediante un número, el mismo número de posición contiene una letra arriba y abajo. Las letras son el código de cada aminoácido asignado según la nomenclatura común de los aminoácidos. La letra sobre el número indica el aminoácido de la cepa silvestre y el que se encuentra por debajo indica el aminoácido adquirido debido a la mutación. Los aminoácidos de sustitución que se encuentran en negritas son mutaciones que confieren una resistencia mayor en el VIH. **Fuente:** Wensing, A. M., Calvez, V., Ceccherini-Silberstein, F., Charpentier, C., Günthard, H. F., Paredes, R., Shafer, R. W., & Richman, D. D. (2022). 2022 update of the drug resistance mutations in HIV-1. *Topics in antiviral medicine*, 30(4), 559–574.

1.1.9.8 Resistencia a los Inhibidores de la Integrasa

La integrasa del VIH es una enzima formada por 288 aminoácidos y es altamente conservada. Está codificada por el gen pol al igual que la transcriptasa reversa y la proteasa. Las mutaciones que confieren un alto nivel de resistencia farmacológica se encuentran fundamentalmente próximas al centro catalítico de la enzima, entre las posiciones 60 y 155. la resistencia a raltegravir se produce principalmente por las siguientes vías: selección de una histidina (H) en la posición 155, selección de diversas mutaciones en la posición 148 y cambios en la posición 143. Los sujetos que han seleccionado la mutación N155H de forma aislada, al continuar la presión farmacológica, seleccionan gradualmente otras mutaciones que incrementan el grado de resistencia al fármaco(Westby M., 2007b).

Figura 9. Mutaciones de resistencia a los inhibidores de la proteasa (IP).



En la Figura 9 se puede observar la posición del aminoácido dentro de la secuencia del gen de la proteasa del VIH anotada mediante un número, el mismo número de posición contiene una letra arriba y abajo. Las letras son el código de cada aminoácido asignado según la nomenclatura común de los aminoácidos. La letra sobre el número indica el aminoácido de la cepa silvestre y el que se encuentra por debajo indica el aminoácido adquirido debido a la mutación. Los aminoácidos de sustitución que se encuentran en negritas son mutaciones que confieren una resistencia mayor en el VIH. **Fuente:** Wensing, A. M., Calvez, V., Ceccherini-

Silberstein, F., Charpentier, C., Günthard, H. F., Paredes, R., Shafer, R. W., & Richman, D. D. (2022). 2022 update of the drug resistance mutations in HIV-1. *Topics in antiviral medicine*, 30(4), 559–574.

1.1.9.9. Interpretación de las pruebas de resistencia

Para que las pruebas genotípicas y fenotípicas orienten sobre el tratamiento idóneo en las personas VIH+, sus resultados deben ser sometidos a interpretación. Uno de los principales retos a los que se enfrentan los investigadores en este campo es el desarrollo de sistemas de interpretación con significado clínico. Un virus definido in vitro como susceptible a un fármaco puede no responder al mismo in vivo, donde muchos otros factores, tales como la concentración e interacciones farmacológicas y la eventual toxicidad, pueden comprometer su eficacia. Asimismo, el hecho de que se evidencie in vitro una reducción de susceptibilidad al mismo no significa necesariamente que se producirá un fracaso. Por último, debemos recordar que los ensayos de resistencias nos proporcionan información sobre las poblaciones virales mayoritarias al momento de practicar el estudio, que desde luego estarán influenciadas por el tratamiento antirretroviral al cual se ha presentado el fracaso, por lo que el hecho de no encontrar una mutación presente no debe interpretarse como que la misma no pueda hallarse en una cuasiespecies minoritaria y no documentada en el estudio.

1.1.9.10. Transmisión del fármaco resistencia en el VIH

La transmisión de cepas resistentes a una o más clases de fármacos antirretrovirales es conocida como farmacoresistencia transmitida o resistencia primaria, y frecuentemente es el resultado de un mal control de la medicación del paciente VIH positivo (abandono o mal manejo de TARV) y una fallida campaña de

prevención de nuevas infecciones. La OMS clasifica la resistencia transmitida a las clases farmacológicas como baja (<5%), intermedia (5-15%) y alta (>15%), obtenida de un número definido de sujetos con no más de tres años de haber contraído VIH y que no presenten antecedentes de haber recibido tratamiento antirretrovírico(World Health Organization, n.d.).

1.1.9.11. Redes Filogenéticas

A pesar de los grandes e importantes avances que se han realizado en el mundo para tratar de prevenir y controlar la distribución del VIH el objetivo es aún lejano, especialmente en países en los que aún se continúa con un rezago en la detección de casos y tratamiento de estos. Durante la búsqueda de un mejor entendimiento de como el VIH se distribuye entre la población se han desarrollado herramientas de análisis con un enfoque integral entre las que se encuentra el estudio de las redes filogenéticas de infección y la filogeografía. Este tipo de metodologías han descubierto que la distribución del VIH se ha dado mediante sub-epidemias ligadas a las características socio-clínico-demográficas de la población. Entender la dinámica en la cual se desarrollan las sub-epidemias se ha convertido en una herramienta útil para los sistemas de control y prevención del VIH en los países en donde estas se practican. Estudios realizados en el Congo han encontrado que la diseminación interna del VIH en su país se ha dado de forma aislada entre tres de sus principales ciudades y que las infecciones de cada ciudad se encuentran ligadas con las cepas de VIH de países colindantes con los cuales comparten sistemas de transporte(Paraskevis D, 2009). Mientras que investigaciones en Europa han correlacionado la distribución del VIH a los flujos poblacionales que recientemente se han dado debido a migraciones masivas en países de África y Arabia(Gray RR, 2009).

La región Tijuana-San Diego es una de las fronteras más transitadas a nivel mundial con un registro de 5-6 millones de cruces hacia el norte al mes. En esta región se ha encontrado que las redes de infección del VIH se encuentran filogenéticamente asociadas a grupos migratorios(W. D. K. C. B. S. E. T. P. S. K. P. S. A. S. and D. M. Smith. Sanjay R. Mehta, 2010) y recientemente nuestro grupo de trabajo ha encontrado asociaciones filogenéticas entre personas que usan drogas intravenosas y mujeres que ejercen la prostitución(A. C. T. L. G. P. E. G.-Z. J. K. S. H. A.-R. J. R. C. A. V. K. D. W. T. L. P. B. S. D. M. S. S. A. S. Sanjay R Mehta, 2018). La maduración de la vigilancia genómica en la última década ha permitido rastrear la aparición y propagación de epidemias a un nivel sin precedentes. Durante la pandemia de COVID-19, por ejemplo, los datos genómicos revelaron que las epidemias locales variaron considerablemente en la frecuencia de la importación de variantes del coronavirus 2 (SARS-CoV-2), impulsadas por la transmisión geográfica, incluso a través de fronteras internacionales produciéndose una transmisión importante entre ubicaciones adyacentes y distantes, respaldada por patrones de movilidad dinámicos(Matteson et al., 2023).

1.2 JUSTIFICACIÓN

La OMS promueve que para el 2020 en el mundo se pueda tener al 90% de las personas portadoras de VIH detectadas, al 90% de las personas detectadas bajo tratamiento y que el 90% de los que estén en tratamiento contra el VIH se encuentren bajo supresión viral. Sin embargo, a pesar de que se han realizado mejoras muy importantes en torno a la epidemia del VIH, el escenario 90-90-90 es aún un logro que se encuentra lejos del alcance de muchos países, especialmente de países en los que aún no se conoce la dinámica de la distribución que ha tomado en VIH entre su población.

El conocer la dinámica de distribución del VIH entre poblaciones particulares es una herramienta importante que puede apoyar a la prevención y el control de epidemias localizadas ya que la información puede ser la base para la generación de programas de detección temprana del estatus serológico del VIH. En México, se ha estimado que aproximadamente el 50% de los portadores del VIH desconocen su estatus serológico.

Recientemente, estudios sobre las relaciones filogenéticas del VIH han permitido descifrar ampliamente la dinámica de distribución del virus respecto al entorno geográfico y social en el que se dan las infecciones. Esto ha permitido reconocer factores asociados a la dinámica de distribución del VIH que anteriormente eran desconocidos lo que ha apoyado a generar y sugerir políticas públicas que apoyan a la mejora de los sistemas de prevención. Un ejemplo a esto ha sido el descubrimiento de focos de infección que hemos encontrado entre personas usuarios de drogas inyectables, mujeres que ejercen el trabajo sexual y personas que se han encontrado como migrantes ilegales en el vecino país de EUA. La variación genética en el VIH que circula en nuestra ciudad se atribuye a nuestra posición geográfica dentro de una de las áreas más visitadas por todo el mundo, la frontera Tijuana-San Diego. El análisis de la red filogenética que envuelve a la epidemia del VIH en nuestra región nos permite agrupar, rastrear, comparar y crear un común denominador en la evolución del virus. El rastreo permite una agrupación geográfica entre personas infectadas, agrupar y detectar los grupos de vulnerabilidad con el fin de canalizar y orientar campañas preventivas masivas enfocadas a estos grupos de manera objetiva.

Sumado a esto, el conocer la estructura filogenética de las cepas circulantes de un organismo como el VIH posibilita la monitorización de la farmacorresistencia y brinda información importante para la generación de conocimiento que potencialmente podría ser el paso inicial en la búsqueda de nuevos modelos de inhibición de la replicación viral mediante experimentación *in vitro* e *in vivo*.

1.3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Tijuana es reconocida mundialmente como una ciudad de migrantes y como una ruta importante para el tráfico de drogas hacia los Estados Unidos de América. Debido a la inestabilidad social que estos factores imponen sobre la población, en la ciudad se observan diversos problemas que afectan a la salud pública local. Entre estos se pueden mencionar un alto índice de adicciones, prostitución, personas sin un lugar para vivir estable, frecuencia alta de enfermedades transmisibles, entre otras.

En la ciudad un número muy grande de la población es considerada migrante. La gran mayoría de quienes la habitan provienen de otras ciudades de la República Mexicana, Centro y Sudamérica, el Caribe y Estados Unidos (EUA). Así mismo, un número significativo de personas que han sido migrantes viviendo en el vecino país de EUA han quedado truncados en la ciudad tras haber vuelto a México de forma voluntaria o a través de una deportación.

La migración de las poblaciones trae consigo la propagación de enfermedades que repercuten inevitablemente sobre la salud en los lugares en donde los migrantes terminan su viaje. Un ejemplo común a esto es la distribución mundial de los genotipos del VIH y los cambios genéticos que se relacionan con su farmacorresistencia. La distribución mundial de las variantes genéticas de este organismo inicio de forma localizada para luego mostrar una distribución más uniforme de tal forma que en estos días casi en cualquier parte del mundo se encuentran todas las variantes genéticas del virus. Debido a esto, la transmisión de la farmacorresistencia en el VIH, y en otros organismos, se ha vuelto un problema para la salud pública global.

La comparación de secuencias que componen la estructura genética del VIH, en comparación con los métodos epidemiológicos tradicionales como el rastreo de contactos, puede evaluar con mayor eficacia su dinámica epidemiológica e informar mejor sobre los mecanismos de distribución que este organismo toma entre las poblaciones, así como algunas características relacionadas a su virulencia. Por estos rumbos, poco sabemos sobre el efecto que tiene la migración sobre la distribución global del virus.

En Tijuana existe un área en la cual se encuentra un canal artificial localizado justo en el límite entre la frontera México-EUA. En esta área, conocida coloquialmente como “El Bordo”, se reúnen un gran número de adictos a drogas y población indigente, quienes buscan un lugar para vivir y/o drogarse. Allí radican un aproximado de 4000 personas entre los que se incluyen: personas deportadas desde EUA, migrantes Centroamericanos y del Caribe.

El Bordo colinda con la “Zona Norte” de la ciudad de Tijuana, en donde se encuentran los bares de la ciudad que atraen a personas con un alto índice de vulnerabilidad para contraer la infección del VIH, tales como turistas, ciudadanos, hombres que tienen sexo con hombres, entre otros.

Hace un par de años el Bordo se volvió inaccesible para todas las personas que solían vivir allí debido a redadas que realizó la policía, mismas que han permanecido. De un día a otro, todas las personas que radicaban o acudían al lugar se dispersaron por toda la ciudad y aparecieron nuevos lugares de reunión para el consumo de drogas (llamados picaderos) lo que potencialmente pudo haber apoyado la diseminación de variantes genéticas del VIH que se encontraban confinadas a ese lugar. Anterior a la dispersión de las personas del Bordo, también era un lugar en el que se realizaban actividades para el control y prevención de infecciones mediante varios programas existentes de ayuda social que coordinan las universidades

locales, las organizaciones no gubernamentales y los ministerios de salud de la ciudad. Después de esto ha sido casi imposible realizar dichas actividades debido a la gran dispersión de esta población.

Nuestra hipótesis es que se han introducido variantes genéticas del VIH a México a través de Tijuana, provenientes de otras partes del mundo y que se distribuyen entre grupos de riesgo específicos y que su distribución generalizada a la población de la ciudad se potencializa por la aplicación de políticas públicas para el orden social.

1.4 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existen en Tijuana variantes genéticas del VIH que provengan de países que no sean México y que se asocien a la resistencia farmacológica?

1.5 OBJETIVOS

1.5.1. Objetivo General:

1. Analizar la variación genética del VIH en Tijuana.

1.5.2. Objetivos Específicos:

1. Determinar las similitudes genéticas entre las cepas de VIH que circulan en Tijuana.
2. Determinar la presencia de cambios genéticos asociados a la farmacorresistencia en las cepas de VIH que circulan en Tijuana.
3. Determinar los subtipos de VIH que circulan en Tijuana.

CAPITULO II

2.1 METODOLOGÍA

2.1.1 Población

Se incluyeron a usuarios de drogas que realizan su consumo en la ciudad de Tijuana. Se acudió a los lugares en los que comúnmente se utilizan drogas y se les realizó una invitación a participar dentro del estudio. Quienes aceptaron participar se les realizó una encuesta, consentimiento informado y se le realizó prueba rápida diagnóstica de VIH. Se proporcionó una sesión de pre y post consejería sobre el VIH a todos los participantes. El estudio reclutó participantes durante los periodos del 2019 y 2020. Se excluyó del estudio a todas las personas que se negaron a consentir su participación. Durante este periodo se reclutaron 442 participantes.

En la operacionalización de las variables designamos como foráneos a todos los participantes que nacieron fuera de Tijuana, y locales a los participantes que sí nacieron en esta ciudad. Como emigrantes a los que residieron en EUA y deportados a quienes legalmente fueron retornados a México por el departamento de inmigración de EUA.

Dentro de los estados del norte de México se incluyeron a: Baja California, Sonora, Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, Baja California Sur, Sinaloa, Nayarit, Durango y Zacatecas.

Los estados incluidos en la zona centro se encuentran Guanajuato, Querétaro, Hidalgo, Estado de México, Ciudad de México, Morelos, Tlaxcala y Puebla. Y los estados que se incluyeron en la zona sur fueron: Guerrero, Oaxaca, Chiapas, Veracruz, Tabasco, Campeche, Yucatán y Quintana Roo

El equipo de investigación realizó las intervenciones en tres áreas geográficas de Tijuana. Cada área fue visitada dos veces al mes y se realizó de 15-20 entrevistas en cada visita. La selección de días de visita se basó en las distancias encontradas entre las áreas seleccionadas.

Lugar A (Las Palmitas). Este lugar es el más cercano a los servicios de reducción de daños relacionados al VIH, ya que se encuentra en el perímetro de la Zona Norte, zona en la cual se han realizado la mayoría de los programas intencionados a reducir el daño ocasionado por las conductas de riesgo y la infección de VIH. Dentro de esta área de la ciudad de Tijuana se han realizado diversos esfuerzos para reducir el daño ocasionado por la epidemia del VIH como lo son los programas: SHIELD (Safety and Health Integration in the Enforcement of Laws on Drugs) programa dedicado a ayudar en la educación de las fuerzas del orden público para mejorar las interacciones con los usuarios de drogas (Baker et al., 2021), Proyecto “El Cuete IV” programa dedicado a analizar y disminuir el consumo de drogas inyectables entre las personas VIH positivas (Horyniak et al., 2018), “Mujer Mas Segura” programa implementado para disminuir el consumo y compartimiento de jeringas en el consumo de drogas inyectables en mujeres trabajadoras sexuales (Vera et al., 2012), entre otros programas que cuentan con datos no

publicados y que han sido implementados por organizaciones de la sociedad civil como lo son Albergue Las Memorias AC y su campaña permanente de concientización y distribución de insumos para la prevención del VIH, la Fundación AIDS Health Care Foundation (AHF) y su filial Latin Outreach and Understanding Division (LOUD) con su campaña permanente de detección y consejería para las personas que viven con VIH.

El lugar es visitado por más de 500 usuarios de drogas por mes. La población de usuarios está compuesta principalmente por deportados de EUA, 80% hombres y 20% mujeres, con edades comprendidas entre 15 y 60 años.

Alrededor del 30% de los usuarios en este lugar son visitantes de EUA que vienen a Tijuana a comprar drogas, algunos de los cuales permanecen meses o años. Se sabe que algunos visitantes de EUA son VIH positivos. La población de usuarios aquí comúnmente comparte sus agujas independientemente de los esfuerzos de reducción de daños, incluso con personas que se sabe que son VIH positivas. Aproximadamente 20-25 usuarios mueren al año debido a una sobredosis y/o enfermedad grave desconocida. Este lugar está compuesto por visitantes usuarios de todas partes de Tijuana. Hay unos 30 usuarios en el lugar en cualquier momento.

Lugar B (Las Vías). Este lugar está a unos 3 kilómetros de distancia del lugar A y el centro de Tijuana, lejos de las instalaciones de reducción de daños contra el VIH. El lugar es visitado por unos 400 usuarios por mes, su población está compuesta por un 15% de deportados en EUA. Un 90% de los usuarios son hombres y un 10% mujeres, con edades comprendidas entre los 17 y los 50 años. Puede haber un 5% de visitantes de usuarios de EUA que vienen a Tijuana a comprar drogas. Compartir agujas es una práctica común en esta población, probablemente debido al acceso mínimo a la reducción de daños. La mayoría de la población de Personas que usan Drogas Inyectables de este lugar está compuesta por personas que viven en la parte noreste de Tijuana (Libertad, Buena Vista, Río, etc.) que vienen

al lugar para comprar y consumir drogas. Hay unos 60 usuarios que viven en este lugar en cualquier momento. Unos 10-15 usuarios mueren al año en este lugar debido a una sobredosis y/o enfermedades desconocidas. (datos provenientes de investigaciones aun no publicadas)

Lugar C (El Parque - La Morita). Este lugar se encuentra a aproximadamente 25 kilómetros del lugar A y a 20 kilómetros del lugar B. El lugar es visitado por unos 250 adictos por mes. La población está compuesta por un 10% de deportados de EUA, un 80% de los usuarios son hombres y un 20% mujeres con edades comprendidas entre los 15 y los 45 años. Solo un número muy pequeño de visitantes provienen de los EUA Que vienen a este lugar para comprar y consumir drogas. La mayor parte de la población de usuarios de este lugar está compuesta por personas que viven en la parte este de Tijuana (la sección más pobre de la ciudad). Este lugar es solo un área de reunión, no hay adictos que vivan en el sitio. Las muertes por sobredosis y/o enfermedad rara vez se ven en el área, pero hay muertes violentas.

- **Criterios de inclusión:**

Pacientes VIH positivos de ambos sexos, mayores de 18 años que dieron por escrito el consentimiento informado y que fueron confirmados por infección del VIH mediante PCR, Western blot o prueba rápida de detección de 4ta generación.

- **Criterios de exclusión:**

Pacientes que no consintieron a su participación en el estudio.

- **Criterios de eliminación:**

Pacientes VIH positivos a los cuales no se les pudo realizar la toma de muestra y/o realizar la amplificación del genoma del VIH.

2.1.2. Diseño del estudio

Estudio transversal que analiza las características sociodemográficas de usuarios a drogas y la variación genética del Virus de Inmunodeficiencia Humana en tres áreas de consumo de drogas (picaderos) de la ciudad de Tijuana. La batería de cuestionarios y pruebas de detección del VIH aplicadas fueron: datos sociodemográficos, uso de drogas, historial migratorio e historial médico, así como la detección de la infección por el VIH mediante la prueba rápida de 4ta generación de Abbot. Los datos fueron recolectados mediante entrevistas. Se solicitó el consentimiento informado de las personas reclutadas y el estudio fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación de la Universidad Autónoma de Baja en Tijuana.

2.1.3. Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el software Microsoft Excel. Se realizó un análisis descriptivo de las frecuencias.

2.1.4. Toma de muestra

La toma de muestra sanguínea se realizó en un lugar perfectamente iluminado, privado y sin tránsito de personas para evitar estrés en los pacientes. Se localizó una vena adecuada en alguno de los brazos y se desinfectó el área con un algodón humedecido con alcohol al 70%, se colocó el torniquete, y posteriormente se realizó la punción con uso de agujas de toma múltiple con broche de seguridad BD Vacutainer®.

Se recolectaron 4 ml de sangre total en tubos con anticoagulante EDTA, al completar el volumen requerido de muestra se retiró la aguja y se colocó una torunda con alcohol sobre el sitio de punción ejerciendo presión para detener la hemorragia. Las muestras se identificaron con un número clave consecutivo, iniciales del paciente y fecha. Para asegurar su viabilidad las muestras se transportaron y almacenaron hasta su proceso en hieleras a 4°C.

2.1.5. Transporte de muestra

Las formas y procedimientos de embalaje, transporte y disposición final del material utilizado (muestras y desechos) en los procesos del análisis del estudio se elaboró tomando como referencia los siguientes documentos y normas oficiales mexicanas.

1. Organización Mundial de la Salud. Guía para el transporte seguro de sustancias infecciosas y especímenes diagnósticos de la OMS-División para la Vigilancia y el Control de Enfermedades Emergentes y otras Enfermedades Transmisibles, Ginebra, 1997.

2. Norma Oficial Mexicana NOM-051-SCT2/1995, Especificaciones especiales y adicionales para los envases y embalajes de las sustancias peligrosas de la división 6.2 agentes infecciosos.
3. Norma Oficial Mexicana NOM-003-SCT/2000, Características de las etiquetas de envases y embalajes destinadas al transporte de sustancias, materiales y residuos peligrosos.
4. Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.

2.1.6. Aislamiento de leucocitos

El mismo día de la toma las muestras se centrifugan a 1500 rpm por 10 min para el aislamiento de glóbulos blancos y plasma. En un tubo Falcon® estéril de 15mL se vertió la banda de células blancas y el tubo se rellenó hasta 15mL con solución de lisis de eritrocitos (cloruro de amonio), el plasma se separó para la precipitación viral que se describe más adelante. Se dejó reposar por 10 minutos a temperatura ambiente, mezclando unas dos a tres veces durante ese reposo, y se centrifugó por 10 minutos a 1500 rpm. El sobrenadante se desechó absorbiendo con una pipeta transfer desechable y el pellet de leucocitos se lavó 2 veces con PBS a temperatura ambiente. Para los lavados se suspendió el pellet celular en 15 ml de PBS y se centrifugó de nuevo a temperatura ambiente por 10 minutos a 2,000 rpm. Después de la última lavada el pellet se suspendió en 1000 µL de PBS. La extracción de ADN se realizó con 500 µL de la suspensión final de leucocitos (el restante se congeló a -80°C para usos posteriores)

2.1.7. Separación de plasma y precipitación viral

El plasma separado por centrifugación en el paso anterior se transfirió a tubos Eppendorf® de 1.5 ml y se centrifugó a 4°C a una velocidad de 15000 rpm por un lapso de 40 minutos. Se formó un pellet en el que se encuentra el VIH concentrado. El pellet es directamente usado para la extracción de ARN viral.

2.1.8. Extracción de ARN viral

En los casos en que se concentró el pellet en más de un tubo se combinó en un solo. La combinación se realizó decantando el plasma y solo dejando 200 µL en cada uno de los tubos con una pipeta Pasteur de plástico estéril. Se homogenizó el pellet con el plasma y se pasó lo de todos los tubos de un mismo paciente a un solo tubo. Con los concentrados virales en un solo tubo se le agregó 900 µL de solución de lisis viral y 40 µL de sílica (captador viral) se mezcló el tubo en el agitador vortex por 15 minutos, y se dejó reposar por 10 minutos. Después del periodo de reposo el tubo se centrifugó a 4°C por 2 minutos a 15000 rpm, el sobrenadante se decantó y el pellet de sílica con ARN viral se lavó dos veces con solución de lavado de ARN. El lavado se realizó adicionando 800 µL de la solución y resuspendiendo el pellet para luego centrifugar a 4°C por 1 minuto a 15000 rpm. Posteriormente se lavó otras dos veces con etanol al 75% usando el mismo procedimiento. Tras las lavadas alcohólicas se lavó una última vez con acetona usando el mismo procedimiento. Después de decantar la acetona se dejó secar por 10 minutos incubando del tubo con la tapa abierta a 56°C, la sílica no debe durar más de 1 minuto en incubación después de haberse secado. El pellet de sílica se disolvió en 60 µL de agua tratada con DEPC e incubada por 10 minutos a 56°C (tubo tapado) tras la incubación se centrifugó el tubo por 2 minutos a 14000 rpm en temperatura de 4°C. Usando una micropipeta de 100 µL se extrae la fase acuosa y se pasa a un tubo eppendorf®

estéril. El ARN extraído se congeló a -80°C o directamente se usó para la retrotranscripción.

2.1.9. Extracción de ADN de leucocitos

A) Digestión proteica

A 500 μL del aislado de leucocitos se añadieron 100 μL de solución de lisis celular y 30 μL de proteínasa K. El tubo se mezcló muy bien con el vórtex y se incubó a 37°C con agitación por 1 hora.

B) Purificación de ADN

Al tubo de digestión se añadieron 500 μL de solución fenol:cloroformo:alcohol isoamílico. Se agitó con el vórtex y se centrifugó a 4°C por 15 minutos a 14000 rpm. Se traspasó cuidadosamente la fase acuosa superior a un tubo nuevo de 1.5 mL y se repitió el paso usando únicamente 400 μL de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico. Se añadió un volumen de cloroformo y se agitó manualmente. Posteriormente se centrifugó a 4°C durante 15 minutos a 14000 rpm. Se traspasó cuidadosamente la fase superior a otro tubo, poniendo atención en no llevarse por aspiración las fases intermedia e inferior.

C) Precipitación de ADN

Se añadieron 2 volúmenes de etanol absoluto. Se agitó suavemente hasta observar la aparición del ADN y se almacenó a -20°C por 15 minutos. Se centrifugó a 14000 rpm por 8 minutos a 4°C. Se decantó el etanol absoluto y el pellet se lava con etanol al 75% resuspendiendo el pellet en 1 ml de alcohol al 75% y centrifugando de nuevo a 4°C por 8 minutos a 14000 rpm. Se decantó por ultima vez el etanol y se dejó secar el pellet por espacio de 10 minutos con la tapa abierta dentro de la cámara de flujo laminar.

D) Elución de ADN

El pellet se eluyó en 100 µL de agua libre de DNAsas adicionando el agua y dejando reposar por 4 horas a 4°C.

2.1.10. Cuantificación de ARN

El ARN extraído se cuantificó mediante el uso del kit comercial RiboGreen® (Invitrogen) el cual permitió la cuantificación del ARN mediante una reacción que emite fluorescencia y la correlación con los datos de emisión de una curva de calibración previamente generada usando concentraciones de ARN establecidas. Se diluyeron 5 µL del ARN extraído en 95 µL de buffer TE (libre de nucleasas), al mismo tiempo se diluyó 1 µL del reactivo Ribogreen en 199 µL de buffer TE para usarse como blanco. Ambas soluciones se mezclaron y se dejaron incubar por 5 minutos a temperatura ambiente protegiendo la reacción de la luz, para luego detectar la fluorescencia emitida en el fluorospectrofotometro nanodrop usando 2 µL de la solución final en la microcelda con una excitación a 500 nm y emisión a 525 nm.

2.1.11. Cuantificación de ADN

La cuantificación y comprobación de la calidad del ADN se realizó mediante la absorbancia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro de luz UV/Vis. Se mezclaron 20 µL del ADN extraído con 980 µL de agua libre de nucleasas y se realizó la lectura de absorbancia a ambas longitudes de onda. Se calculó la relación 260/280 para ver la presencia de contaminantes en la extracción y se utilizó la absorbancia a 260 nm para calcular la concentración del ADN usando los factores de dilución correspondientes.

2.1.12. Retro transcripción

La retro transcripción es una reacción química que permite la síntesis de una cadena complementaria de ADN (llamada cADN) para una muestra de ARN. El objetivo de este procedimiento es generar una cadena molde de cADN viral para hacer posible la amplificación del genoma completo del VIH mediante la reacción en cadena de la polimerasa o PCR. Para la retro transcripción se usó el kit comercial de Invitrogen, Super Script III®. El procedimiento constó de dos pasos. El primer paso es la hibridación de los oligonucleótidos (cadena polimérica de Timinas, 22 nucleótidos, que se hibridan a la cola poli Adenilada en la terminación 3' del ARN viral) a la cadena blanco de ARN del VIH. La mezcla de reactivos que se utilizó para el paso de hibridación se presenta en la Tabla III.

Tabla III. Mezcla de hibridación de retro transcripción.

Reactivo	Volumen
ARN	8.8 μ L
dNTP's 10 mM	1 μ L
dT 10 μ M	1 μ L
VOLUMEN FINAL	10.8 μ L

Descripción. La mezcla de hibridación para la reacción de retro transcripción utiliza los siguientes reactivos. ARN: ácido ribonucleico del VIH extraído del plasma de cada paciente y diluido en agua DEPC, doble destilada, esterilizada y filtrada con membrana de 0.2 μ m (DEPC: el dietilpirocarbonato es usado para inhibir la acción de las ARNasas, proteínas capaces de degradar al ARN). dNTP's: los deoxiribonucleotidos son las moléculas usadas para la síntesis del cADN (ADN complementario). Oligonucleótidos: cadena de 22 timinas, se hibridan a la cola 3' del ARN viral lo que permite la amplificación de los 9kb del genoma del VIH.

La mezcla de reactivos que se muestra en la Tabla III se incubó en un termociclador a 75°C por un lapso de 5 minutos. Después, el tubo de reacción se incubó en hielo por 1 minuto. Tras la incubación en hielo, se realizó el segundo paso de la reacción de retro transcripción, la síntesis del cADN. Durante este paso se le adicionan los componentes químicos necesarios para que la enzima retro transcriptasa sintetice una cadena molde de cADN por cada cadena de ARN presente en la muestra. La mezcla química de síntesis se presenta en la Tabla IV.

Tabla IV. Mezcla química de síntesis de cADN en la retro transcripción

Reactivo	Volumen
Buffer 10X	2 μ L
25 mM MgCl ₂	4 μ L
0.1 M DTT	2 μ L
RNasa OUT	1 μ L
Retrotranscriptasa	0.2 μ L
VOLUMEN FINAL	9.8 μ L

Descripción. Buffer 10X: este compuesto es un amortiguador salino que consta de 200 mM Tris HCl pH 8.4 y 500 mM KCl y es usado para amortiguar el pH durante la reacción. MgCl₂: el cloruro de magnesio a una concentración final de 5 mM es necesaria para estabilizar los componentes de la reacción. DTT: el ditioneitol es usado para inhibir las ARnasas. RNasa OUT: este compuesto es un inhibidor recombinante que elimina la acción de las ribonucleasas.

La mezcla de síntesis que se muestra en la Tabla IV se realizó y mantuvo en hielo todo el tiempo. Después de adicionada la mezcla química de síntesis de cADN el tubo se incubó en un termociclador a 25°C por 10 minutos, seguidos de 50 minutos a 55°C y 5 minutos más a 80°C. Después de este ciclo de temperaturas la reacción se congeló a -20°C o se prosiguió directamente a la PCR.

2.1.13. Reacción en Cadena de la Polimerasa

El último tercio de la Proteasa y los dos primeros tercios de la Retro transcriptasa se amplificaron mediante el uso de los oligonucleótidos 3RT, 5RT y CIPOL1. Los parámetros bioquímicos y diseño de los oligonucleótidos se encuentran en la Tabla V. Se utilizó la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa estandarizada para su funcionamiento óptimo.

Tabla V. Oligonucleótidos usados en la PCR.

Nombre	Dirección	Longitud	Tm	Secuencia	Producto de PCR
3RT	R3242-3222	21	60.6	acc cat cca aag gaa tgg agg	3RT+5RT=534 3RT+CIPOL1=734
5RT	F2708-2729	21	53.3	aaa tcc ata caa tact cca gta	
CIPOL1	F2508-2528	21	58.8	gga aga aat ctg ttg act cag	

Descripción. Los oligonucleótidos con una R o F dentro la columna de dirección tiene un significado en el sentido de amplificación izquierdo o derecho respectivamente. Los oligonucleótidos fueron diseñados usando la secuencia completa del VIH Human immunodeficiency virus type 1 (HXB2), complete genome; HIV1/HTLV-III/LAV reference genome GenBank: K03455.1. datos del diseño y análisis en ANEXO 1

Para la PCR se utilizó el kit comercial Q5 High-Fidelity DNA Polymerase® (cat. no. M0491S, New England Biolabs, USA) El reactivo requiere una cadena de ADN molde, los cebadores, ADN Polimerasa, desoxiribonucleótidos trifosfato (dNTPs) y una solución buffer conteniendo iones de magnesio. El volumen final de la reacción fue de 12.5 μ L. Las temperaturas y las concentraciones para las reacciones de amplificación son estandarizadas y las condiciones finales son las presentadas en la Tabla VI y Tabla VII. Los segmentos se amplificaron mediante una reacción semi-anidada que usa 1 μ L de una dilución en proporción 1:100 de la PCR en la primera ronda sobre una segunda ronda con oligonucleótidos internos complementarios al segmento amplificado en la primera ronda.

Tabla VI. Componentes de reacción para la amplificación de genes.

Componente	25 μ l	50 μ l	Concentración final
5X Q5 Buffer de reacción	5 μ l	10 μ l	1X
10 mM dNTPs	0.5 μ l	1 μ l	200 μ M
10 μ M Oligonucleótido derecho	1.25 μ l	2.5 μ l	0.5 μ M
10 μ M Oligonucleótido izquierdo	1.25 μ l	2.5 μ l	0.5 μ M
ADN	variable	variable	< 1,000 ng

Componente	25 μ l	50 μ l	Concentración final
Q5 High-Fidelity Polimerasa	0.25 μ l	0.5 μ l	0.02 U/ μ l
5X Q5 High GC Enhancer (opcional)	(5 μ l)	(10 μ l)	(1X)
H ₂ O	a 25 μ l	a 50 μ l	

Descripción. La mezcla de PCR utiliza los siguientes reactivos. cADN: las cadenas de ADN complementario sintetizadas durante la RT-PCR son utilizadas como molde para amplificar las secciones genéticas de interés en el VIH. dNTP's: los deoxiribonucleotidos son las moléculas usadas para la síntesis del ADN durante la PCR. Oligonucleótidos: los F son los derechos y los R son los reversos o izquierdos, se utilizan los oligonucleótidos descritos en la tabla V que son específicos para las regiones del genoma del VIH. Buffer 5X: este compuesto es un amortiguador salino que consta de 200 mM Tris HCl pH 8.4 y 500 mM KCl y es usado para amortiguar el pH durante la PCR. 5x enhancer: necesario para estabilizar los componentes de la reacción.

Tabla VII. Temperaturas y ciclos de reacción de la PCR.

Temperatura	Tiempo	Ciclos
-------------	--------	--------

98°C	30 seg	1 ciclo
98°C	10 seg	35 ciclos
50°C	30 seg	
72°C	1 min	
72°C	7 min	1 ciclo
4°C	alfa	

Descripción: La PCR consta de un paso de desnaturalización inicial que permite la deshibridación de la doble cadena de ADN presente en la muestra, un paso de hibridación que permite la unión de los oligonucleótidos específicos a las regiones de interés del genoma del VIH y por último un paso elongación que permite a la polimerasa la síntesis de cadenas complementarias al ADN del VIH.

Las condiciones sobre las temperaturas y ciclos que se usan para la PCR se estandarizaron usando el termociclador ABI 7300 real-time PCR detection system® (Applied Biosystems). En el primer paso de la PCR, la mezcla de los componentes de la reacción se incubó a temperatura alta (98°C) permitiendo la desnaturalización de las cadenas de cADN molde por 30 segundos, en el segundo paso, se realizaron 35 ciclos de la reacción que se incubaron a temperatura alta (98°C), se enfriaron hasta la temperatura de hibridación, la cual normalmente está cercana a los 50°C y los cebadores se unen al extremo 5' de cada una de las dos cadenas separadas del cADN molde; en el tercer paso, la temperatura se elevó a 72°C y los cebadores unidos a la cadena de ADN molde sirven como punto de inicio de la síntesis de las

nuevas cadenas de ADN esta etapa de incubación toma 1 minuto, dicha secuencia de tres pasos corresponde a un ciclo de PCR. Posteriormente se realizó un solo ciclo de elongación terminal a 72°C por 7 minutos, así como una incubación final de 4°C hasta que la reacción se retiró del termociclador y el producto se congeló a -20°C. o se procede a realizar una electroforesis en agarosa al 1% para corroborar los tamaños de los productos.

2.1.14. Análisis de productos en gel de agarosa

La electroforesis en gel de agarosa es una técnica que permite la separación de muestras de ácidos nucleicos de diferente tamaño en pares de bases. El fundamento de su desarrollo se basa en la capacidad de la agarosa para formar redes moleculares que impiden a diferentes niveles el paso de moléculas a través de sus poros, así como la misma capacidad del ADN de ser atraído hacia un polo positivo debido a la presencia de los grupos fosfato en su estructura molecular. El tamaño en pares de bases (pb) de los productos obtenidos durante la amplificación por PCR de los segmentos genéticos del VIH se analizó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TE 1X corrida durante 50 minutos a 60 mV. Se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb que permitió la comparación de la muestra con dicho marcador.

2.1.15 Extracción del producto de PCR del gel de agarosa

Para extraer el ADN producto de la PCR que se utiliza para la electroforesis, se cortó la banda correspondiente al producto de interés, cuidando de cortar la menor cantidad de agarosa posible y se colocó en un tubo eppendorf estéril y se cubrió en su totalidad con agua DEPC esterilizada y filtrada, se incubó a 4°C por una noche.

2.1.16 Purificación de los productos de PCR

Se realizó con el kit comercial QIAquick® siguiendo las instrucciones del fabricante. Se separó el agua DEPC tratada con la que se separó el ADN del gel de agarosa en un tubo Eppendorf estéril y se adicionaron 5 volúmenes de buffer PB, se mezcló en vortex. Después se colocó una columna en un tubo colector de 2ml y se pasó la mezcla a la columna, se centrifugó a 13,000 rpm por 60 segundos, el líquido que sobrepasó la columna se descartó y se volvió a colocar la columna para lavar con 750 µl de Buffer PE, se centrifugó nuevamente a la misma velocidad por 60 segundos, se descartó el líquido que traspasa la columna y se vuelve a colocar la columna en el tubo, se centrifugó nuevamente 60 segundos. Después se colocó la columna en un tubo Eppendorf nuevo y estéril para eluir el ADN, mediante la adición de 50 µl de agua grado molecular y una última centrifugación de 60 segundos. El ADN purificado que pasó al tubo Eppendorf, se almacenó a -80°C, hasta su secuenciación.

2.1.17. Secuenciación Illumina Iseq100

Preparación de librerías

A. Etiquetado de muestras (tagmentation)

1. Diseñar en el termociclador un programa TAG NSP1 a 5 minutos a 55°C y “hold” a 10°C.
2. Marcar una placa de 96 pozos NSP1 y adiciona 20 µL de cADN a 2.5 ng/µL (total de 50ng) a cada pozo según la cantidad de muestras que se proceden.
3. Adicionar 25 µL de buffer TD a cada pozo

4. Adicionar 5 μ L de TDE1 a cada pozo y mezcla con la pipeta
5. Centrifugar a 280 g a 20°C por 1 minuto
6. Poner en el termociclador y correr el programa.

B. Purificación del cADN etiquetado

1. Preparar el reactivo RSB y marca una placa de 96 NSP2 y otra NSP3
2. Adicionar 180 μ L de Zymo DNA binding buffer a cada pozo, según las muestras montadas en la placa NSP2.
3. Transferir 50 μ L de la placa NSP1 a la NSP2 según corresponda, mezcla con la pipeta.
4. Poner la placa Zymo spin I96 en la placa colectora y transferir el contenido de la placa NSP2 a la placa I96 Zymo
5. Centrifugar a 1300 g por 2 minutos a 20°C, tira el sobrenadante
6. Lavar dos veces de la siguiente forma.
7. Adicionar 300 μ L de Zymo wash buffer, centrifugar a 1300 g por 2 minutos a 20°C y tira el sobrenadante.
8. Centrifugar de nuevo a 1300 g por 2 minutos a 20°C para eliminar todo el líquido y poner la placa zymo I96 en la placa NSP3
9. Adicionar 25 μ L de RSB sobre el filtro de la placa I96, incubar por 2 minutos a 20°C y centrifugar a 1300 por 2 minutos a 20°C
10. OPCIONAL. Revisar la calidad de los fragmentos 150 pb – 1 kb en el qsep1.

C. Amplificación del cADN etiquetado

1. Marcar una placa de 96 pozos nueva NAP1
2. Programar el siguiente termociclado como PCR AMP: lid 100°C, 73°C por 3 minutos, 98°C por 30 segundos, 5 ciclos de: 98°C por 10 segundos, 63°C por 30 segundos y 72°C por 3 minutos, terminar con hold a 10°C.
3. Adicionar 5 µl de adaptador i7 e i5 a cada pozo según las muestras procesadas
4. Adicionar 15 µL de NPM a cada pozo
5. Adicionar 5 µL de PPC a cada pozo
6. Transferir 20µL de NSP3 a NAP1 y mezclar con la pipeta
7. Centrifugar a 280 g por 1 minuto a TA
8. Poner la placa en el termociclador y correr el programa.

D. Purificación de la librería

1. Utilizar perlas AMPure XP, etanol al 80% preparado al momento, marcar una placa de 96 pozos NAP2 y otra NLP.
2. Centrifugar NAP1 a 280 g por 1 minuto
3. Transferir el contenido de NAP1 a NAP2
4. Adicionar 30 µL de perlas AMPure XP a cada pozo en NAP2, mezclar con la pipeta el contenido
5. Incubar sin mezclar 5 minutos
6. Poner en la placa magnética hasta que el líquido este claro (2 minutos) y mantener allí la placa durante los siguientes pasos.

7. Quitar y tirar el sobrenadante.
8. Lavar dos veces siguiendo los pasos a continuación: adicionar 200µL de etanol al 80% tratando de no distorsionar las perlas magnéticas. Incubar en la placa magnética por 30 segundos hasta que el sobrenadante quede claro. Remueve y tira el sobrenadante.
9. Dejar secar al aire por 15 minutos
10. Retirar la placa magnética
11. Adicionar 32.5 µL de RSB y mezclar con la pipeta e incubar a TA por 10 minutos
12. Poner la placa magnética y dejar que las perlas se peguen hasta que el líquido quede claro (2 minutos)
13. Transferir 30µL de NAP2 a NLP

E. Cuantificación de la librería.

1. Utilizar el protocolo de QUBIT dsDNA

F. Control de calidad de la librería

1. Utilizar 1 µL de la librería para correrlo en el qSep1 equipo de electroforesis capilar y verificar el tamaño del producto

G. Normalización y mezclado (pooling) de librerías.

1. Poner el código de barras a la placa NDP (Nextera Dilution Plate) y NPP (Nextera Pooled Plate). Si la placa NLP se congeló, centrifugar para que caiga el líquido.

2. Cargar la placa NDP con 10 μ L de la placa NLP
3. Normalizar la concentración en cada pozo a 2 nM usando Tris-Cl 10 mM, pH 8.5 with 0.1% Tween 20.
4. Agitar con vortex a 1000 rpm por 2 minutos
5. Centrifugar a 280 g por 1 minuto a TA
6. Cargar la placa NPP con 5 μ L de la placa NLP y mezclar las librerías

2.1.18. Análisis de datos

2.1.18.1 Análisis demográfico

El análisis de las variables demográficas se realizó mediante el uso de una plantilla en una hoja de Microsoft Excel. Se calcularon estadísticos descriptivos para cada una de las variables.

2.1.18.2 Análisis de farmacorresistencia

El análisis se realizó en la base de datos para detección de resistencias del VIH de la Universidad de Stanford (<http://hivdb.stanford.edu/index.html>). El propósito de este programa es estimar qué tan activo será un ARV contra una variante del VIH en particular comparándolo con la actividad que presenta ante una cepa de referencia. Se introdujeron las secuencias en la forma de análisis de mutaciones en la base de datos, se "pegaron" las secuencias en formato fasta en el cuadro de texto. Las mutaciones se definieron como las diferencias encontradas entre las secuencias obtenidas y la secuencia de referencia de consenso del subtipo B y se caracterizaron

como: a) mutaciones de la RT.- mutaciones de resistencia-NRTI, mutaciones de resistencia NNRTI y otras mutaciones; b) mutaciones de la PR.- mutaciones mayores de resistencia PI, mutaciones menores de resistencia-PI y otras mutaciones; c) mutaciones de la IN.- mutaciones mayores de resistencia IN, mutaciones menores de resistencia IN y otras mutaciones. La lista de “otras mutaciones” contiene las mutaciones que tienen poco efecto en la susceptibilidad al fármaco, mutaciones que representan secuencias de VIH subtipo no-B.

2.1.18.3 Análisis de subtipos

La determinación de los subtipos del VIH se realizó en la base de datos del Standford HIV Data Base. El subtipo asignado a cada una de las secuencias obtenidas de las personas VIH positivas del estudio fue calculado mediante el análisis de similitudes genéticas por el método de Kimura, el porcentaje que se presenta dentro de la Tabla XIII es el de disparidades encontradas entre la cepa y el subtipo asignado de acuerdo con la comparación en la base de datos de Standford HIV Data Base. El subtipo asociado es el genotipo encontrado en la base con la mayor similitud, se presenta el país y año en el que la secuencia de comparación se subió a la base de datos de Standford HIV Data Base.

2.1.18.4 Análisis de Redes Filogenéticas

Un análisis de redes filogenéticas es un estudio de las relaciones evolutivas que presenta un grupo de organismos dentro de una especie. Este estudio nos indica las similitudes y diferencias entre las secuencias del genoma de los organismos y a través de ello podemos descubrir ancestros comunes, las distancias genéticas entre los organismos en comparación, el flujo y distribución de un organismo entre una

población de portadores, etc. En una población de portadores del VIH, un alto grado de similitud genética entre la población viral de los portadores implica que las infecciones están relacionadas a través de una serie desconocida de transmisiones.

El análisis de las secuencias se realizó inicialmente mediante la alineación de las secuencias que se obtuvieron a partir de la secuenciación de las cepas de VIH de los portadores, esta alineación se realizó mediante el programa CLUSTALW que implementa el programa MEGA. A las alineaciones se les eliminó las secuencias periféricas (esquinas 5 y 3 prima) para quedar únicamente con un set de secuencias comparativas que contaran con la misma cantidad de nucleótidos y que la comparación sea estadísticamente comparable. Tras tener el set de secuencias alineadas y purificadas, se seleccionó la región de interés de la secuencia del VIH silvestre (Human immunodeficiency virus type 1 (HXB2), complete genome; HIV1/HTLV-III/LAV reference genome GenBank: K03455.1) para utilizarse como raíz dentro de la construcción del árbol filogenético. Luego se seleccionó la región de interés de uno de los representantes silvestres de cada uno de los Subgrupos y Recombinantes Circulantes del VIH para incluirlas dentro de la comparación filogenética. Mediante el uso de MEGA en una computadora con memoria RAM papaz de realizar el análisis (256G) se introdujeron todas las secuencias al programa y se le pidió una alineación completa para continuar con la estructuración de árboles filogenéticos usando la metodología Maximun Parsimony (mayor similitud) que implementa el modelo de Kimura Las secuencias obtenidas se anotaron de acuerdo a la región geográfica del portador (lugar en el que se le tomo la muestra sanguínea) para analizar la distribución fitogeográfica de las cepas y comparar con las secuencias que se realizaron en estudio anterior, analizando la infiltración que se tiene de las cepas de VIH, distribuidas entre la población de usuarios a drogas del 2015 al 2019. Esta última comparación nos permitirá determinar si la política policiaca de “cero tolerancia” al uso de drogas en el bordo de Tijuana trajo consigo la distribución de cepas del VIH desde el bordo hacia toda la ciudad.

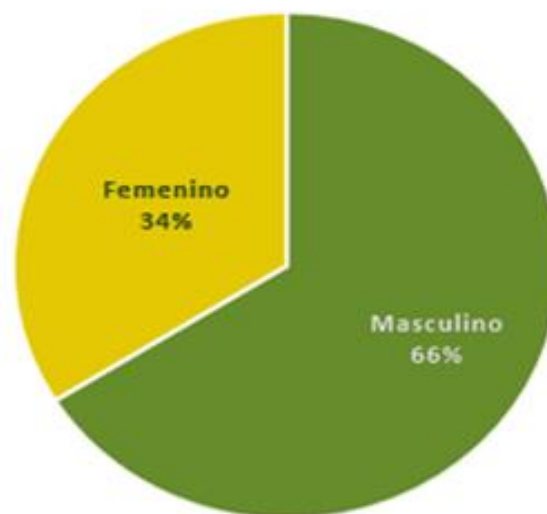
CAPITULO III

3.1 RESULTADOS

3.1.1 Análisis de variables demográficas.

La población total de sujetos del estudio fue de 442 participantes, de los cuales 66.1% (292) fueron masculinos y 33.9% (150) femeninos (**Fig. 10**). En cuanto a la edad el mínimo fue de 14 años y el máximo de 70 una media de 36.16 años.

Figura 10. Porcentaje de participantes distribuidos por sexo



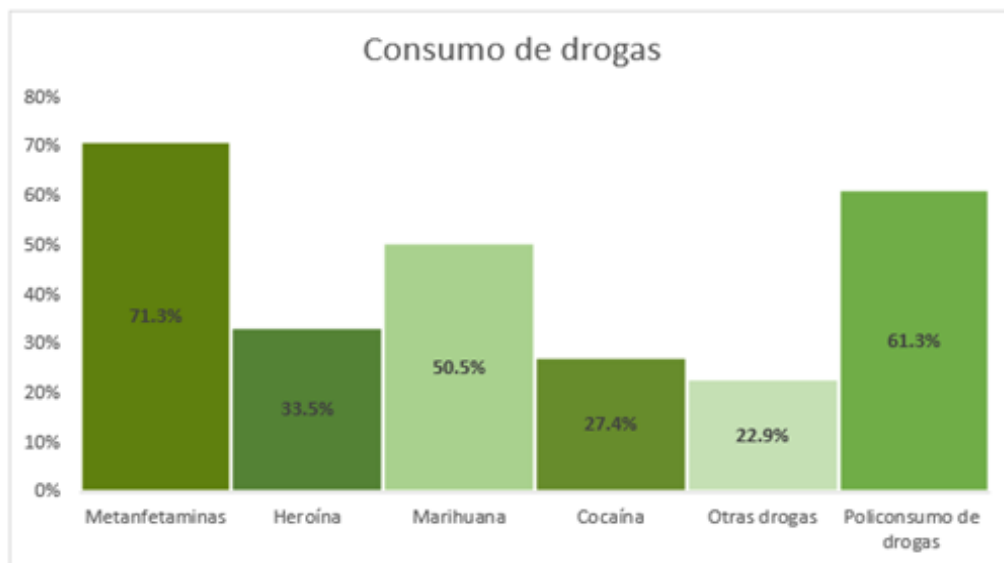
Respecto de las preferencias sexuales, el 71.9% (318) mencionaron ser heterosexuales, 13.8% (61) bisexuales, 11.5% (51) homosexuales y el 2.7% (12) no respondió (Tabla VIII).

Tabla VIII. Preferencias sexuales

Preferencias sexuales	Porcentaje
Heterosexuales	71.9
Homosexuales	11.5
Bisexuales	13.8
No respondió	2.7

El uso de metanfetaminas fue positivo para el 71.3% (315). En cuanto al uso de heroína, esto ocurrió en el 33.5% de los integrantes del estudio, la marihuana, es consumida por el 50.5% (223), el uso de la cocaína disminuyó en comparación con la utilización de otras drogas al 27.4% (121) y el consumo de otras drogas no incluidas en las anteriores fue de 22.9% (101). El policonsumo de drogas fue de un 61.3% (271) de los participantes.

Figura 11. Consumo de drogas utilizadas por los participantes



En cuanto al lugar de nacimiento que reportaron los sujetos del estudio, el 90.2% (399) de los participantes dijeron ser mexicanos. De los participantes que nacieron en México; el 40.4% (179) nacieron en Baja California, mientras que el 24.4% en el norte y 21.8% en el centro, únicamente el 3.6% nacieron en el sur del país. Dentro del 8.2% (33 participantes) que nacieron fuera de México, 6.8% de estos nacieron en el estado de California EUA y el resto 2.3% fuera de México o Estados Unidos. (Tabla IX).

Tabla IX. Porcentaje de participantes según lugar de nacimiento

Lugar de Nacimiento	
México	90.2 % 40.4 % Baja California 24.4 % Estados del Norte de México

	21.8 % Estados del Centro de México 3.6 % Estados del Sur de México
Estados Unidos de América EUA	8.2 % 6.8 % California EUA 1.4 % Otros estados de EUA
Otro país	1.6 %

El 81.4% (360) de las personas encuestadas no podían cruzar legalmente a EUA y el resto 18.6% (82) si podía hacerlo. Un 27.6% del total de los encuestados (114), era deportado desde los EUA hacia México. El 62.9% (278) había intentado cruzar ilegalmente a EUA al menos una vez, y el 37.1% (164) no lo había hecho. En relación con los participantes que habían cruzado de manera ilegal, el 89.1%(394) pensaba hacerlo de nuevo. En este mismo grupo de participantes el 59.1% (97) había estado preso y el 60% (99) había realizado el poli consumo de drogas.

Tabla X Datos migratorios de las personas encuestadas

Datos Migratorios	Si	No
Ha cruzado a EUA ilegalmente	62.9	37.1
Puede cruzar legalmente a EUA	18.6	81.4

Ha sido deportado	27.6	72.4
-------------------	------	------

En promedio el 5.7% (25) de los sujetos de estudio tuvieron una prueba reactiva al VIH, de los cuales 13 habían recibido tratamiento médico para VIH mientras vivieron en EUA. En cuanto a su preferencia sexual se encontró que el 64% (16) eran heterosexuales.

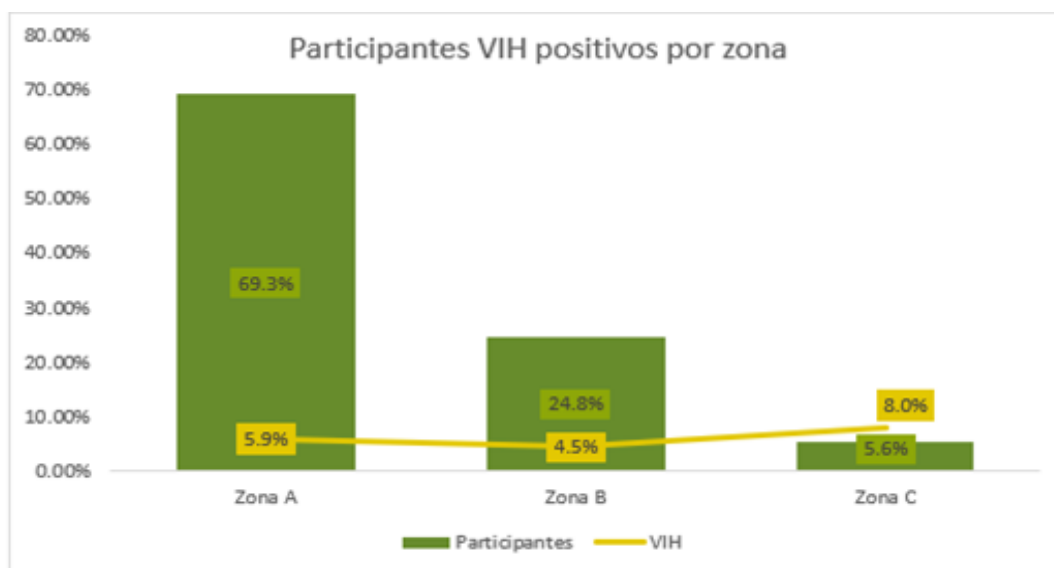
Tabla XI. Porcentaje de participantes con enfermedades de transmisión sexual

Enfermedades de Transmisión Sexual	Porcentaje
VIH	5.7
Sífilis	4.1
VHC	6.3
Gonorrea	2.3

De acuerdo al análisis estratificado de las características sociodemográficas por área geográfica, el total de participantes por zona se distribuyó en su mayoría dentro de la Zona A con 69.3% (307), en esta se encuentra el 5.9% (18) de la población VIH positivo, en la Zona B se encuentra el 24.8% (110) de los participantes contando con el 4.5% (5) de las personas con VIH, por último, la Zona C, es la que

cuenta con menos participantes 5.6% (25) del total, pero con mayor porcentaje de VIH positivos con 8% (2).

Figura 12. Total de participantes por zona y porcentaje de VIH positivos



En la zona A se encontró el 64.5% (198) hombres vs 35.5% (109) mujeres, cabe mencionar que en esta área se encontraron 14 (4.6%) hombres y 4 (1.3%) mujeres positivas a VIH. En la zona B el 68.2% (75) eran masculinos y el 31.8% (35) restante femeninos, el 100% (5) de los participantes VIH positivos de la zona eran masculinos; finalmente en la zona C se encontró el 76% (19) hombres y únicamente 24% (6) mujeres y en referencia al VIH se registró el 50% (1) masculino y el otro 50% (1) femenino.

3.1.2 Análisis de farmacorresistencia y subtipo

Se encontró resistencia a los medicamentos en ocho de los 25 pacientes positivos (36%) al VIH. Un análisis de los resultados según el área geográfica en la que se encontró el sujeto de estudio al momento de la toma de muestra indica que el porcentaje de personas que contenían un virus con al menos un cambio genético asociado a la resistencia farmacológica en el VIH fue de un 27.8 %, 60% y 50% en los picaderos de las palmitas (zona A), las vías (zona B) y el parque de la Morita (zona C), respectivamente.

Tabla XII Análisis de farmacorresistencia

	Zona A	Zona B	Zona C	TOTAL
Número total de sujetos estudiados	307	110	25	442
Número total de sujetos positivos a VIH	18	5	2	25
Cantidad de personas con al menos un cambio genético asociado a la resistencia farmacológica	5	3	1	9
% de resistencia	27.8	60	50	36

Los cambios genéticos asociados a la resistencia a los fármacos no-nucleósidos inhibidores de la transcriptasa reversa (NNRTI) con mayor presencia fue

la mutación K103N, Y188L y V179E. Mientras que los cambios genéticos asociados a la resistencia a los fármacos nucleósidos inhibidores de la transcriptasa reversa (NRTI) con mayor presencia fueron S68G y T215C,L El subtipo asignado a cada una de las secuencias obtenidas de las personas VIH positivas del estudio fue calculado mediante el análisis de similitudes genéticas por el método de Kimura, el porcentaje que se presenta dentro de la tabla XIII es el de disparidades encontradas entre la cepa y el subtipo asignado de acuerdo con la comparación en la base de datos de Standford HIV Data Base. El subtipo asociado es el genotipo encontrado en la base con la mayor similitud, se presenta el país y año en el que la secuencia de comparación se subió a la base de datos de Standford HIV Data Base .

Tabla XIII. Cambios genéticos asociados a la resistencia farmacológica en el VIH.

No.	Sujeto	Subtipo	Subtipo asociado	Sensibilidad a Medicamentos											
				Mutaciones		NRTI					NNRTI				
				NRTI	NNRTI	ABC	AZT	FTC	3TC	TDF	DOR	EFV	ETR	NVP	RPV
1	Morita GAV	B 2.16%	KJ704787 EUA 1983		K103N	S	S	S	S	S	S	RNA	S	RNA	S
2	Palmita RDJE	B 4.12%	EU839600 Haiti 2005	S68G		S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
3	Palmita	B	AF042100		Y188L	S	S	S	S	S	RNA	RNA	RPNB	RNA	RNA

	JCHC	2.90%	Australia 1986												
4	Palmita DGH	B 5.19%	EU839600 Haiti 2005	D67N S68SG T215L K219E	G190S	RPNB	RI	S	S	RPNB	RNB	RNA	RPNB	RNA	RNB
5	Palmita JLM	B 3.55%	KJ704787 EUA 1983	S68G	K103N V179E	S	S	S	S	S	S	RNA	RPNB	RNA	RPNB
6	Palmita PJAA	B 3.99%	AB873942 Japon 2009			S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
7	Palmita JAM	B 5.81%	EU839600 Haiti			S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

			2005												
8	Palmita SABM	B 3.59%	AB873942 Japon 2009			S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
9	Palmita LAP	B 4.21%	AB873942 Japon 2009			S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
10	Palmita FCOZ	B 2.79%	KJ704787 EUA 1983	S68G		S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
11	Palmita LMB	B 3.01%	AB873942 Japon 2009			S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
12	Palmita	B	AB873942			S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

	JAAL	4.19%	Japon 2009												
13	Morita	B	EU839600			S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	BTI	3.99%	Haiti 2005												
14	Palmita	B	EU839600			S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	AM	3.97%	Haiti 2005												
15	Palmita	B	EU839600	M184V	K103N	RNB	S	RNA	RNA	S	RNA	RNA	RPNB	RNA	RNA
	PRE	3.80%	Haiti 2005		Y188L										
16	Vias	B	AB873942	S68G		S	RPNB	S	S	S	S	S	S	S	S
	JR	3.51%	Japon 2009	T215C											

17	Vias LACM	B 4.06%	EU839600 Haiti 2005		E138EA	S	S	S	S	S	S	S	RPNB	S	RNB
18	Vias MCMA	B 4.28%	KJ704787 EUA 1983			S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
19	Vías NAO	B 3.85%	AB873942 Japón 2009			S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
20	Palmita BZB	B 2.92%	EU839600 Haiti 2005			S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
21	Palmita GRJR	B 2.66%	KJ704787 EUA			S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

			1983												
22	Palmita	B	AB873942			S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	BRA	3.89%	Japon 2009												
23	Vias	B	EU839600		V106I	S	S	S	S	S	RPNB	S	RPNB	RPNB	RPNB
	BMCV	4.34%	Haiti 2005												
24	Palmita	B	AB873942			S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	AJSA	2.27%	Japon 2009												
25	Palmita	B	EU839600		V179E	S	S	S	S	S	S	RPNB	RPNB	RPNB	RPNB
	LNV	3.42%	Haiti 2005												

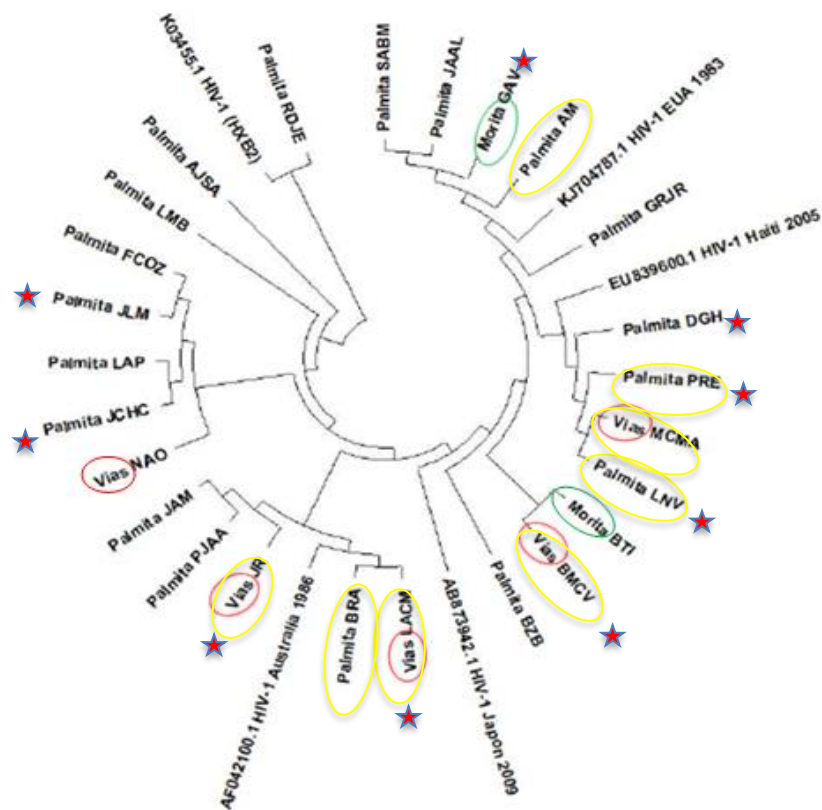
Descripción. Análisis de subtipo y cambios genéticos asociados a la resistencia a fármacos en el VIH usando la base de datos para detección de resistencias del VIH de la Universidad de Stanford (<http://hivdb.stanford.edu/index.html>). Los fármacos Nucleosidos Inhibidores de la Transcriptasa Reversa (NRTI)

mencionados en la tabla son: abacavir (ABC), zidovudina (AZT), emtricitabina (FTC), lamivudina (3TC), tenofovir (TDF); Los fármacos No-Nucleosidos Inhibidores de la Transcriptasa Reversa (NNRTI) mencionados en la tabla son: **doravirina (DOR)**, **etravirina (ETR)**, **efavirenz (EFV)**, nevirapina (NVP). Se utilizo la siguiente nomenclatura para categorizar a los cambios genéticos asociados a la resistencia a fármacos: Resistente Nivel Alto (RNA), Resistencia Potencial Nivel Bajo (RPNB), Resistencia Nivel Bajo (RNB), Resistencia Intermedia (RI) y Sensible (S). El sujeto se encuentra codificado con las iniciales y como Palmita (Zona A) Vias (Zona B) y Morita (Zona C)

3.1.3 Análisis de Redes Filogenéticas

Filogenéticamente las cepas del VIH que circulan entre los sujetos de este estudio presentan una distribución dinámica y extensa dentro de las 3 áreas geográficas en las que se realizó la toma de muestras. Las características genéticas de las cepas que se encuentran circulando en la Zona A (las palmitas) contienen una distribución generalizada entre las Zonas B (las vías) y C (el Parque Morita). Mientras que las cepas de las Zonas B y C tienen una distribución limitada a solo algunos de los subgrupos filogenéticos que se forman dentro de este análisis. En total se observa la formación de 6 grupos filogenéticos equidistantes dentro del análisis del total de las cepas analizadas. Al realizar una comparación filogenética de las características de la estructura genética de las cepas circulantes en este estudio con las cepas circulantes en el resto del mundo, se encuentra que existe relaciones entre grupos bien definidos de este estudio con cepas circulantes en Australia, Japón, Haití y EUA.

Figura 13. Análisis filogenético del VIH.



Descripción. Árbol filogenético generado usando la alineación nucleotídica mediante CLUSTALW que implementa el programa MEGA. A las alineaciones se les eliminó las secuencias periféricas (esquinas 5 y 3 prima) Tras tener el set de secuencias alineadas y purificadas, se seleccionó la región de interés de la secuencia del VIH silvestre (Human immunodeficiency virus type 1 (HXB2), complete genome; HIV1/HTLV-III/LAV reference genome GenBank: K03455.1) para utilizarse como raíz dentro del análisis. En círculo rojo se aprecia las variantes provenientes de la Zona B (Vías), círculo verde se aprecian las variantes de la Zona C (Morita), en círculo amarillo se aprecian las variantes de las personas migrantes deportadas a México desde EUA, con una estrella roja se aprecian las variantes que presentaron al menos un cambio genético asociado a la farmacorresistencia en el VIH. Dentro del árbol se puede apreciar también la presencia de las variantes comparativas del subtipo: Australia, Japón, Haití y EUA.

CAPITULO IV

4.1 DISCUSIÓN

Los porcentajes de seropositividad al VIH encontrados en cada una de las zonas geográficas estudiadas se presenta a continuación: Zona A con 69.3% del total de los estudiados (307 participantes) presenta un 5.9% (18 participantes VIH positivos) de seropositividad, en la Zona B constituida por el 24.8% de los sujetos de estudio (110 participantes) presenta un 4.5% (5 participantes VIH positivos) de seropositividad y la Zona C constituida por 5.6% del total de los estudiados (25 participantes) presenta una seropositividad al VIH del 8% (2 participantes VIH positivos). Es posible establecer que mientras más alejada se encuentre la zona geográfica de los servicios de reducción de daño mayor es el índice de factores de riesgo para el contagio o exposición al VIH. Al considerar que los porcentajes de positividad al VIH incrementan paulatinamente desde la Zona A hacia la Zona C al igual que se incrementa la distancia a la que se encuentran los esfuerzos que se realizan en la ciudad para reducir el daño asociados a la infección por el VIH. Existe una mayor cantidad de actividades, realizado por diferentes organizaciones, destinadas a la reducción del daño de la epidemia del VIH en Tijuana dentro de la Zona A en comparación de las actividades que se realizan en la Zona B y C respectivamente(Baker et al., 2021; Horyniak et al., 2018; Vera et al., 2012).

Aunque el consumo de drogas a cualquier edad puede llevar a la adicción, las investigaciones muestran que cuanto más temprano se comienza a consumirlas mayor es la probabilidad de progresar al abuso. Esto puede ser un reflejo de los efectos dañinos que tienen las sustancias adictivas sobre el cerebro en la fase de desarrollo; aunque también depende de varios factores tempranos de vulnerabilidad, tanto biológicos como sociales, incluyendo vulnerabilidad genética, enfermedad mental, relaciones familiares inestables y la exposición al abuso físico o sexual. El

consumo de drogas y alcohol puede considerarse una vía de transmisión debido a que las drogas alteran el juicio de las personas; lo que las lleva a tener comportamientos sexuales riesgosos (p. ej., tener relaciones sexuales sin condón o tener múltiples parejas sexuales), y estos comportamientos pueden aumentar sus probabilidades de contraer o transmitir el VIH((National Institutes of Health, 2014). Algunos estudios indican que América Latina se caracterizan por presentar una epidemia principalmente concentrada de VIH, afectando a personas que usan drogas, trabajadoras sexuales, personas transgénero y hombres que practican sexo con hombres(A. C. T. L. G. P. E. G.-Z. J. K. S. H. A.-R. J. R. C. A. V. K. D. W. T. L. P. B. S. D. M. S. S. A. S. Sanjay R Mehta, 2018).

Si bien la migración no es sinónimo de vulnerabilidad al VIH y, por lo tanto, no todos los migrantes y poblaciones móviles corren un mayor riesgo de contraer este virus a raíz de su movilidad, en muchos contextos se encuentran expuestos a un conjunto único de factores socioculturales, económicos y ambientales que los hacen más vulnerables al VIH. Entre dichos factores cabe destacar la falta de acceso a servicios de salud y a la información, así como los entornos que propician comportamientos de alto riesgo. Muchos de los factores subyacentes que impulsan la movilidad, como la distribución inequitativa de recursos, el desempleo, la inestabilidad socioeconómica y los disturbios políticos, también determinan el riesgo de contraer el VIH.

Tijuana es una ciudad clave receptora de migrantes deportados de Estados Unidos quienes se consideran estar entre los subgrupos de población con mayor riesgo de infección por el VIH (Strathdee et al., 2008). Sin embargo, existe poca información sobre aspectos de la salud y el bienestar económico y social de los migrantes durante el período inmediato posterior a la deportación. Por tanto, la situación del VIH/SIDA y la movilidad de la población específicamente en la ciudad de Tijuana, es descrita por Magis, et al., (2009) de la siguiente manera: se registran altas tasas de migración gracias a la proximidad con Estados Unidos y el desarrollo

de la industria maquiladora de exportación; un notable comercio sexual y un alto uso de drogas inyectables entre un grupo determinado de la población; por tanto se registra una alta prevalencia de VIH/SIDA en la población adulta significativamente superior con respecto de la prevalencia de Baja California y de México en general. En este estudio, se encontró que el 32% de los participantes portadores del VIH, habían sido migrantes deportados desde los EUA a México por la ciudad de Tijuana y el 55% de estos presentaron al menos un cambio genético asociado a la resistencia farmacológica en el VIH. También se observó que los migrantes deportados se concentraron entre las personas positivas al VIH dentro de las áreas de las Palmitas (zona A) y las Vías (zona B)

El Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) es un virus que ha mostrado una gran variación genética por todo el mundo (Johnson V A, 2010). Dicha característica viral podría estar asociada a su distribución global, así como a patrones patológicos como el de la farmacorresistencia y la llegada del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida más temprano en los portadores.

Existen ciertas características sociodemográficas que exacerbaban la variación genética de un organismo como el VIH. Entre estas se encuentra el aumento de la exposición al virus a través del uso de drogas intravenosas, actividad sexual sin protección y/o prostitución, migración, etc. Sin embargo, la contribución de estas características de la población hacia la variación del VIH es aún desconocida.

La ciudad de Tijuana en México es una ciudad con un índice migratorio muy grande e importante para la Salud Pública de la región. La variación genética en el VIH que circula en nuestra ciudad se atribuye a nuestra posición geográfica dentro de una de las fronteras más concurridas del mundo, la frontera Tijuana-San Diego.

Durante el 2018 se descubrió la existencia de focos de infección entre personas usuarios de drogas inyectables, mujeres que ejercen el trabajo sexual y personas migrantes ilegales que habían sido deportadas desde el vecino país de EUA(W. D. K. C. B. S. E. T. P. S. K. P. S. A. S. and D. M. Smith. Sanjay R. Mehta, 2010).

Dichos focos de infección se descubrieron dentro de un área en la cual se encuentra un canal artificial localizado justo en el límite entre la frontera México-EUA. En esta área, conocida coloquialmente como El Bordo, se reúnen un gran número de adictos a drogas y población indigente, quienes buscan un lugar para vivir y/o drogarse. Durante los años en los que se realizó este descubrimiento el Bordo se volvió inaccesible para todas las personas que solían vivir allí debido a redadas que realizó la policía aplicada como política pública de cero tolerancia a los adictos. De un día a otro, todas las personas que radicaban o acudían al lugar para consumir drogas se dispersaron por toda la ciudad y aparecieron nuevos lugares de reunión para el consumo de drogas (llamados picaderos). Anterior a la dispersión de las personas del Bordo, también era un lugar en el que se realizaban actividades para el control y prevención de infecciones mediante varios programas existentes de ayuda social que coordinan las universidades locales, las organizaciones no gubernamentales y los ministerios de salud de la ciudad.

Como resultado de la política de cero tolerancia para los adictos dentro del área del bordo las cepas del VIH que anteriormente se concentraban en dicha zona geográfica se distribuyeron por los picaderos que se formaron tras la ejecución de dicha política pública. Como resultado a esta política encontramos que filogenéticamente las cepas del VIH que circulan entre los sujetos de este estudio presentan una distribución dinámica y extensa dentro de las 3 áreas geográficas en las que se realizó la toma de muestras, a como era esperado.

Las características genéticas de las cepas que se encuentran circulando en la Zona A (las palmitas, área contigua al bordo) contienen una distribución generalizada entre las Zonas B (las vías) y C (el Parque Morita). Mientras que las cepas de las Zonas B y C tienen una distribución limitada a solo algunos de los subgrupos filogenéticos que se forman dentro de este análisis. En total se observa la formación de 6 grupos filogenéticos equidistantes dentro del análisis del total de las cepas analizadas. Adicional a la integración de las características genéticas de las cepas del VIH de la Zona A que se descubrió circulan dentro de las Zonas B y C se encontró cambios genéticos asociados a la resistencia a los fármacos que se han logrado establecer dentro de las cepas circulantes dentro de las 3 áreas geográficas estudiadas. Entre la Zona A y Zona C se comparte la integración de la mutación K103N, mutación no polimórfica que confiere reducciones de alto nivel en la susceptibilidad a NVP y EFV y además es considerada el cambio genético asociado a la resistencia a fármacos más comúnmente transmitido. Mientras que dentro de la Zona A y Zona B se comparte la integración del cambio genético asociado a la resistencia a fármacos S68G mutación polimórfica que a menudo se selecciona en combinación con K65R y apoya en la restauración parcialmente del defecto de replicación asociado con K65R en el VIH. Dentro de la población de cepas circulantes en la Zona A encontramos que el cambio genético asociado a la resistencia a fármacos más comúnmente encontrado es el K103N. El porcentaje general de personas que portan al menos un cambio genético asociados a la resistencia a los fármacos descubierto a través de este estudio fue de un 36%. Mientras que el mismo análisis por áreas geográficas nos indicó que esto se encuentra en un 27.8 %, 60% y 50% en los picaderos de Zona A, B y C respectivamente.

CAPITULO V

5.1 CONCLUSIONES

El conocer la estructura filogenética de las cepas circulantes de un organismo como el VIH posibilita la monitorización de la farmacorresistencia y brinda información importante para la generación de conocimiento para el control de la epidemia de forma local y global.

La comparación de secuencias que componen la estructura genética del VIH, en comparación con los métodos epidemiológicos tradicionales como el rastreo de contactos, puede evaluar con mayor eficacia su dinámica epidemiológica e informar mejor sobre los mecanismos de distribución que este organismo toma entre las poblaciones, así como algunas características relacionadas a su virulencia. Los estudios sobre las relaciones filogenéticas del VIH en Tijuana nos han permitido descifrar ampliamente la dinámica de distribución del virus respecto al entorno geográfico y social en el que se distribuye el virus, lo que ha apoyado a generar y sugerir políticas públicas que apoyen a la mejora de los sistemas de prevención y control de la epidemia en la ciudad. Es aun desconocido el efecto que tiene sobre las características epidemiológicas la distribución generalizada de las cepas circulantes de VIH dentro de la población sin embargo, podría ser que la concentración geográfica de cepas circulantes sea epidemiológicamente positivo para los estragos que un virus como el VIH puede ocasionar en la población por diversos factores como lo son la infección primaria con virus que contienen cambios genéticos que les confieren resistencia a fármacos, una mayor virulencia, progresión más rápida de la enfermedad que causan, etc.

La migración de las poblaciones trae consigo la propagación de enfermedades que repercuten inevitablemente sobre la salud en los lugares en donde los migrantes terminan su viaje. Un ejemplo común a esto es la distribución mundial de los genotipos del VIH y los cambios genéticos que se relacionan con su farmacorresistencia. La distribución mundial de las variantes genéticas de este organismo inicio de forma localizada para luego mostrar una distribución más uniforme de tal forma que en estos días casi en cualquier parte del mundo se

encuentran todas las variantes genéticas del virus. Debido a esto, la transmisión de la farmacoresistencia en el VIH, y en otros organismos, se ha vuelto un problema para la salud pública global.

Tijuana es reconocida mundialmente como una ciudad de migrantes y como una ruta importante para el tráfico de drogas hacia los Estados Unidos de América. Debido a la inestabilidad social que estos factores imponen sobre la población, en la ciudad se observan diversos problemas que afectan a la salud pública local. Entre estos se pueden mencionar un alto índice de adicciones, prostitución, personas sin un lugar para vivir estable, frecuencia alta de enfermedades transmisibles, entre otras. Según la ONUSIDA, la transmisión de VIH por consumo de drogas inyectables continúa siendo uno de los desafíos más importantes. Las políticas cero tolerancia no permiten o entorpecen los esfuerzos que se realizan para disminuir el daño ocasionado por la epidemia del VIH. Esconder el problema no equivale a eliminarlo, más bien equivale a empeorarlo.

CAPITULO VI

6.1 BIBLIOGRAFIA

- Adams J, P. N. M. N. et al. (2010). Nonnucleotide reverse transcriptase inhibitor resistance and the role of the second-generation agents. *Ann Pharmacother.*, 44, 157-65.
- Anta L, L. J. P. E. et al. (2012). Rilpivirine resistance mutations in HIV Patients mailing non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors-based therapies. *AIDS.* .
- Asahchop E, O. M. W. M. et al. (2011). Characterization of the E138K resistance mutation in HIV-1 reverse transcriptase conferring susceptibility to etravirine in B and non-B HIV-1 subtypes. *Antimicrob Agents Chemother.*, 55, 600-7.
- Atwood, W. J. ; B. J. R. ; K. R. ; T. C. y M. E. O. (1993). Human immunodeficiency virus type 1 infection of the brain. . *Clinical Microbiology Reviews*, 4(6), 339–366.
- Baker, P., Arredondo, J., Borquez, A., Clairgue, E., Mittal, M. L., Morales, M., Rocha-Jimenez, T., Garfein, R., Oren, E., Pitpitan, E., Strathdee, S. A., Beletsky, L. & Cepeda, J. A. (2021). Municipal police support for harm reduction services in officer-led referrals of people who inject drugs in Tijuana, Mexico. *Harm Reduction Journal*, 18(1), 76. <https://doi.org/10.1186/s12954-021-00513-4>

- Bartz, S. R. , R. M. E. , and E. M. (1996). Human immunodeficiency virus type 1 cell cycle control: Vpr is cytostatic and mediates G2 accumulation by a mechanism which differs from DNA damage checkpoint control. . *J Virol* , 70, 2324-2331.
- Bennett D, C. R. O. D. et al. (2009a). Drug resistance mutations for surveillance of transmitted HIV-1 drug-resistance: *PloS One*, 4724.
- Bennett D, C. R. O. D. et al. (2009b). Drug resistance mutations for surveillance of transmitted HIV-1 drug-resistance . *PloS One* . .
- Betancor G, G. C. P. M. et al. (2012). Clinical, virological and biochemical evidence supporting the clustering of HIV-1 reverse transcriptase polymorphism R284K and dthymidine analogue resistance mutations M41L, L210W and T215Y in patients failing antiretroviral therapy. . *Retrovirol.* , 9(68).
- Borrow, P. , L. H. , W. X. , H. M. S. , P. N. , M. H. , N. J. A. , G. J. E. , H. B. H. , O. M. B. A. , and S. G. M. (1997). Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary demonstrated by rapid selection of CTL escape virus. *Nature Medicine.* , 3, 205-211.
- Briz V, P. E. S. V. (2006). HIV entry inhibitors: mechanisms of action and resistapathways. . *J Antimicrob Chemother* , 5619-27.
- Bryant, M. , and R. L. (1990). Myristoylation-dependent replication and assembly of human immunodeficiency virus 1. . *Proc Natl Acad Sci U S A* , 87(15), 523–527.
- Cellular transcription factors involved in the regulation of HIV-1 gene expression. (1992). Gaynor R. . *AIDS* , 6, 347-363.
- Choe H, F. M. S. Y. et al. (1996). The b-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* , 85(1), 135–1138.
- Clavel F, H. AJ. (2004). HIV Drug resistance. *N Engl J Med*, 350(10), 1023-35.
- Dagleish AG, B. P. C. P. C. D. G. M. W. RA. (1984). The CD4(T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* , 312, 763–767.
- Deacon, N. . et. al. (1995). Deacon, N. J., Tsykin, A., Solomon, A., Smith, K., Ludford-Menting, M., Hooker, D. J., McPhee, D. A., Greenway, A. L., Ellett, A., Chatfield, C., Lawson, V. A., Crowe, S., Maerz, A., Sonza, S., Leramont, J., Sullivan, J. S., Cunningham, A., Dwyer, D., Dowton, D., and Mills, J. . *Science* , 270, 988-991.
- Diehl, W. E., Patel, N., Halm, K. & Johnson, W. E. (2016). Tracking interspecies transmission and long-term evolution of an ancient retrovirus using the genomes of modern mammals. *ELife*, 5. <https://doi.org/10.7554/eLife.12704>
- Embretson, J. , Z. M. , R. J. L. , B. A. , R. P. , T.-R. K. , and H. A. T. (1993). Massive covert infection of helper T lymphocytes and macrophages by HIV during the incubation period of AIDS. *Nature*, 362, 359-362.
- Fauci, A. S. (1996). Resistance to HIV-1 infection: It's in the genes. *Nature Medicine.* , 2, 966-967.
- Feng, S. , and H. E. C. (1988). HIV-1 tat trans-activation requires the loop sequence within tar. *Nature* , 334(6178), 165-7.
- Frankel AD, Y. J. (1998). . HIV-1: fifteen proteins and an RNA. . *Annu Rev Biochem* , 1-25.
- Gaines H, von S. M. von S. L. et al. (1990). Immunological changes in primary HIV-1 infection. . *AIDS* , 4, 995-999.
- Gallo, R. (1987). El primer retrovirus humano. *Investigación y Ciencia*, 125, 44–55.
- Gange, S. J. , M. J. W. , L. B. , D. R. , P. J. P. , M. A. , and M. J. B. (2001). *Longitudinal patterns of HIV type 1 RNA among individuals with late disease progression. AIDS Res Hum Retroviruses* . 17((13)), 1223-9.
- García F, Á. M. B. C. et al. (2011). Laboratory diagnosis of HIV infection, viral tropism and resistance to antiretrovirals. . *Enferm Infecc Microbiol Clin.* , 29, 297-307.

- García F, Á. M. F. Z. et al. (2011). Predicting antiretroviral drug resistance from the latest or the cumulative genotype. . . *Antivir Ther.*, 16, 373–382.
- Garcia, J. V. , and M. A. D. (1992). Downregulation of cell surface CD4 by nef. . *Res Virol* , 143(1), 52-5.
- Gaynor R. (1992). Cellular transcription factors involved in the regulation of HIV-1 gene expression. *Aids* , 6, 347-363.
- Gaynor, R. B. (1995). Regulation of HIV-1 gene expression by the transactivator protein Tat. *Curr Top Microbiol Immunol* , 193, 51-77.
- Gelderblom, H. R. , M. Ö. and Pauli. , a. G. (n.d.). Morphogenesis and morphology of HIV structurefunction relations. . *Arch Virol* .
- Geretti A M. (2006). Clinical implications of HIV drug resistance to nucleoside and nucleotide transcriptase inhibitors. *AIDS Rev* , 8, 210-20.
- Goff, S. P. (1990). Retroviral reverse transcriptase: synthesis, structure, and function. . *J Acquir Immune Defic Syndr* , 3(8), 817-31.
- Göttlinger, H. G. , S. J. G. , and H. W. A. (1989a). Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. . . *Proc Natl Acad Sci USA* , 86(15), 5781-5.
- Göttlinger, H. G. , S. J. G. , and H. W. A. (1989b). Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. . . . *Proc Natl Acad Sci USA* , 86(15), 5781-5.
- Goudsmit, J. , B. J. A. , J. S. , S. H. , L. J. M. , C. R. A. , and W. G. J. (2002). Naturally HIV-1 seroconverters with lowest viral load have best prognosis, but in time lose control of viraemia. . *Aids* , 16(5), 791-3.
- Gray RR, T. A. L. S. et al. : (2009). Spatial phylodynamics of HIV-1 epidemic emergence in east Africa. *AIDS*, 23(14), F9–F17.
- Grossman, Z. , M.-S. M. , P. W. E. , and P. L. J. (2006). Pathogenesis of HIV infection: what the virus spares is as important as what it destroys. *Nat Med.*, 12(3), 289-95.
- Heinzinger, N. K. , B. M. I. , H. S. A. , R. A. M. , K. V. , L. M. A. , G. H. E. , R. L. , S. M. , and E. M. (1994). The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* , 91(15), 7311-5.
- Horyniak, D., Strathdee, S. A., West, B. S., Meacham, M., Rangel, G. & Gaines, T. L. (2018). Predictors of injecting cessation among a cohort of people who inject drugs in Tijuana, Mexico. *Drug and Alcohol Dependence*, 185, 298–304. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2017.12.034>
- Hu, W. S. , and T. H. M. (1990). Genetic consequences of packaging two RNA genomes in one retroviral particle: pseudodiploidy and high rate of genetic recombination. . *Proc Natl Acad Sci USA* , 87(4), 1556-60.
- Johnson V A, B.-V. F. C. B. (2010). Update of the drug resistance mutations in HIV-1. . *International AIDS Society-USA* , 18(5), 156-63.
- Klatzmann D, C. E. C. S. et al. (1984). lymphocyte T4 molecule behaves as receptor for human retrovirus LAV. *Nature* , 312, 767-76856.
- Klimkait, T. , S. K. , H. M. , M. M. A. , and J. M. O. (1990). The human immunodeficiency virus type 1-specific protein vpu is required for efficient virus maturation and release. *J Virol.*, 64, 621-629.
- Lang, W. , P. H. , A. R. E. , R. R. , J. N. , and W. W. , Jr. (1989). Patterns of T lymphocyte changes with human immunodeficiency virus infection: from seroconversion to the development of AIDS. *J Acquir Immune Defic* , 2(1), 63-9.

- Levy JA. (1993). Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Microbiol* , 57, 183-289.
- Lewis, P. , H. M. , and E. M. (1992). Human immunodeficiency virus infection of cells arrested in the cell cycle. *EMBO J* , 8, 3053-8.
- Llibre M J, S. M. J. B. C. (2010). Clinical implications of genotypic resistance to the newer antiretroviral drugs in HIV-1 infected patients with virological failure. . *Clin Infect Dis* , 50(6), 872-81.
- Malim, M. H. , H. J. , L. S. Y. , M. J. V. , and C. B. R. (1989). (1989). The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature* , 338(6212), 254-7.
- Matteson, N. L., Hassler, G. W., Kurzban, E., Schwab, M. A., Perkins, S. A., Gangavarapu, K., Levy, J. I., Parker, E., Pride, D., Hakim, A., De Hoff, P., Cheung, W., Castro-Martinez, A., Rivera, A., Veder, A., Rivera, A., Wauer, C., Holmes, J., Wilson, J., ... Zeller, M. (2023). Genomic surveillance reveals dynamic shifts in the connectivity of COVID-19 epidemics. *Cell*, 186(26), 5690-5704.e20.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.11.024>
- Mellors, J. W. , K. L. A. , R. J. C. R. , T. J. A. , H. B. S. , K. R. P. , and G. P. (1995). Quantitation of HIV-1 RNA in Plasma Predicts Outcome after Seroconversion. . *Ann Intern Med.* , 122, 573-579.
- Mellors, J. W. , R. C. R. , Jr. , G. P. , W. R. M. , T. J. A. , and K. L. A. (1996). Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science.*, 272(5265), 1167-70.
- Messenger RNA transport and HIV rev regulation. (1990). Chang DD, Sharp PA. . *Science*, 249, 614-615.
- (National Institutes of Health, N. (2014). *Las Drogas, el Cerebro y el Comportamiento La Ciencia de la Adicción, Institutos Nacionales de Salud.*
- Novak, R. M. , C. L. , M. R. D. y cols. (2005). Prevalence of antiretroviral drug resistance mutations in chronically HIV-infected, treatment-naïve patients: Implications for routine resistance screening before initiation of antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis* , 40, 468-474.
- Organizacion Panamericana de la Salud. (2023). VIH-SIDA en las Americas.
<https://www.paho.org/es/temas/vihsida#:~:Text=Se%20estima%20que%20el%20n%C3%BAmero,Casos%20a%2014.000%20por%20a%C3%B1o.> .
- Pantaleo, G. , G. C. , D. J. F. , B. L. , M. M. , F. C. H. , O. J. M. , K. D. P. , and F. A. S. (1993). HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. . *Nature*, 362, 355–358.
- Paraskevis D, P. O. M. G. et al. (2009). Tracing the HIV-1 subtype B mobility in Europe: A phylogeographic approach. . *Retrovirology* , 6:49.
- Paredes Roger and Buenaventura C. (2010). Clinic management of HIV-1 resistance. . *Antivir Res* , 85, 245-65.
- Perelson, A. S. , E. P. , C. Y. , V. M. , H. A. , S. K. , M. M. , and H. D. D. (1997). Decay characteristics of HIV-1-infected compartments during combination therapy. *Nature.* , 387, 188–191.
- Perelson, A. S. , N. A. U. , M. M. , L. J. M. , and H. D. D. (1996). HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science.* , 271, 1582–1586.
- Perelson, A. S. , N. A. U. , M. M. , L. J. M. , H. D. D. (1996). HIV-1 dynamics in vivo: Virion clearance rate, infected cell life-span and viral generation time. . *Science* , 271, 1582–1586.

- Perno C F, S. V. C.-S. F. (2006). Novel drug resistance mutations in HIV: Recognition and clinical relevance. *AIDS Rev* , 8, 179-190.
- Premkumar, D. R. D. , X. Z. M. R. K. M. B. K. C. J. S. B. Y.-L. M. S. H. and Kestler. , a. H. W. (1996). *The nef gene from a long-term HIV type 1 nonprogressor. AIDS Res Hum Retroviruses. 12(4), 337-45.*
- Retroviruses. (1988). Varmus H. *Science* , 240, 1427-1435.
- Rinaldo, C. R. , Jr. , G. P. , H. X. L. , F. Z. , M. J. I. , G. S. , F. H. , S. R. , M. A. , and M. J. B. (1998). . Anti-HIV type 1 memory cytotoxic T lymphocyte responses associated with changes in CD4+ T cell numbers in progression of HIV type 1 infection. . *AIDS Res Hum Retroviruses. , 14(16), 1423–1433.*
- Rodes, B. , T. C. , P. E. , P. E. , M.-P. M. , B. J. M. , J. V. , W. T. , B. S. , and S. V. (2004). Differences in disease progression in a cohort of longterm non-progressors after more than 16 years of HIV-1 infection. *Aids* , 18(8), 1109-16.
- Roy, S. , D. U. , C. C. H. , R. C. A. , and S. N. A. (1990). Roy, S., Delling, U., Chen, C. H., Rosen, C. A., and Sonenberg, N. A . *Genes Dev* , 4(8), 1365-73.
- Ruben, S. , P. A. , P. R. , J. K. , S. R. , B. R. , H. W. A. , and R. C. A. (1989). Structural and functional characterization of human immunodeficiency virus tat protein. *J Virol* , 63(1), 1-8.
- Sanjay R Mehta, A. C. T. L. G. P. E. G.-Z. J. K. S. H. A.-R. J. R. C. A. V. K. D. W. T. L. P. B. S. D. M. S. S. A. S. (2018). Impact of Public Safety Policies on Human Immunodeficiency Virus Transmission Dynamics in Tijuana, Mexico,. *Clin Infec Dis*, 66(5), 758–764.
- Sanjay R. Mehta, W. D. K. C. B. S. E. T. P. S. K. P. S. A. S. and D. M. Smith. (2010). The Relatedness of HIV Epidemics in the United States–Mexico Border Region. *AIDS Res and Hum Retr. , 26(12), 1273–1277.*
- Secretaria de Salud Mexico. (2022). Informe Histórico Día Mundial VIH. *Sistema de Vigilancia Epidemiológica de VIH.*
- Sevilya, Z. ; L. S. ; H. S. H. y H. A. (2001). The ribonuclease H activity of the reverse transcriptases of human immunodeficiency viruses type 1 and type 2 is affected by the thumb subdomain of the small protein subunits. . *Journal of Molecular Biology, 311, 957-971.*
- Shibuya, H. , I. K. , N.-T. J. , G. M. , T. T. , and M. K. (1992). New human gene encoding a positive modulator of HIV Tat-mediated transactivation. *Nature*, 357(6380), 700-2.
- Silvestri, G. , and F. M. B. (2003). Turnover of lymphocytes and conceptual paradigms in HIV infection. *J Clin Invest* , 112(6), 821-4.
- Sitges. (2008). *An update of the list of NNRTI mutations associated with decreased virologic response etravirine (ETV): multivariate analyses on the pooled DUET-1 and DUET-2 clinical trial data theProceedings of the XVII International Drug Resistance Workshop.*
- Sodroski, J. , P. R. , R. C. , W.-S. F. , and H. W. (1985). Location of trans-activating region on the genome of human T-cell lymphotropic virus type III. . *Science*, 229, 74-77.
- Sterrantino G, Z. M. T. M. et al. (2012). Interpretation of genotypic resistance to predict darunavir/ritonavir failure in antiretroviral experienced patients. *J Acquir Immune Defic Syndr.*, 59, 170-2.
- Temin, H. M. , and M. a. (1970). S. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous Sarcoma virus. . *Nature*, 226, 1211-1213.
- Tindall B, C. DA. (1991). . Primary HIV infection: host responses and intervention strategies. . *AIDS*, 5, 1-14.
- Urdaneta A, V. M. (2006). Update in antiretroviral therapy: entry inhibitors. *Infectio* , 266–273.

- US Food and Drug Administration. (2008). Drugs used in the treatment of HIV Infection. *US Food and Drug Administration*.
- Vera, A., Abramovitz, D., Lozada, R., Martinez, G., Rangel, M. G., Staines, H., Patterson, T. L. & Strathdee, S. A. (2012). Mujer Mas Segura(Safer Women): a combination prevention intervention to reduce sexual and injection risks among female sex workers who inject drugs. *BMC Public Health*, 12(1), 653. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-12-653>
- Vingerhoets J, P. M. A. H. H. A. N. S. D. B. M. et al. (2010). *Resistance profile of etravirine: combined analysis of baseline genotypic and phenotypic data from the randomized, controlled Phase III clinical studies*. 24(4), 503–514.
- Wei X, D. J. M. L. H. (2002). Emergence of resistant human immunodeficiency virus typ1 in patients receiving fusion inhibitor (T-20monotherapy. . *Antimicrob Agents Chemothe* , 46, 1896-905.
- Wensing, A. M. , van de V. D. A. , A. G. y cols. (2005). Prevalence of drug-resistant HIV-1 variants in untreated individuals in Europe: Implications for clinical management. . *J Infect Dis* , 192, 958–966.
- Westby M. (2007a). Resistance to CCR5 antagonists. *Curr Opin HIV AIDS* , 2, 137-44.
- Westby M. (2007b). Reduced maximal inhibition in phenotypic susceptibility assays indicates thviral strains resistant to the CCR5 antagonismaraviroc utilize inhibitor bound receptor fentry. . *J Virol* , 81, 2359-71.
- World Health Organization. (n.d.). *Global action plan on HIV drug resistance 2017-2021. work is available under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 IGO licence (CC BY-NC-SA 3.0 IGO;* <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/igo>.
- World Health Organization. (2023). *The Global Health Observatory*,. <https://www.who.int/data/gho/data/themes/hiv-aids>.
- Zennou, V. , P. C. , G. D. , N. U. , M. L. , and C. P. (2000). HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. *Cell* , 101(2), 173–185.
- Zhang, L. , C. C. D. , H. T. , H. Y. , C. Y. , W. G. , H. B. , and H. D. D. (1997). HIV Type 1 Subtypes, Coreceptor Usage, and CCR5 Polymorphism. . *AIDS Research and Human Retroviruses*, 13, 1357-1365.