

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS
FACULTAD DE CIENCIAS
MAESTRÍA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS



“Factores genéticos asociados con progresión a enfermedad y con hipersensibilidad a fármacos antirretrovirales en pacientes VIH-1 positivo de tres regiones de Honduras, durante 2013-2015”.

TESIS SUSTENTADA POR:
CANDY CARBAJAL GONZALES
PARA OPTAR AL GRADO DE MÁSTER EN CIENCIAS EN
ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS
TEGUCIGALPA M.D.C. 29 DE SEPTIEMBRE DEL 2017

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS
FACULTAD DE CIENCIAS
MAESTRÍA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS



RECTOR INTERINO

FRANCISCO JOSÉ HERRERA ALVARADO M.D, M.Sc.

VICERRECTORA ACADÉMICA

BELINDA FLORES, M.Sc.

DIRECTORA DE LA DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN

CIENTÍFICA Y POSTGRADO

LETICIA SALOMÓN, M.Sc.

DECANO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS

NABIL KAWAS, M.Sc.

COORDINADORA DEL POSTGRADO EN ENFERMEDADES

INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS

MARITZA CANALES GIRÓN, M.S.P.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS
MAESTRÍA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS

ASESOR DE TESIS

IVETTE LORENZANA DE RIVERA, M.Sc.

CO-ASESORA

WENDY MURILLO, Ph.D.

COORDINADOR DE INVESTIGACIÓN-MEIZ

GUSTAVO ADOLFO FONTECHA, Ph.D.

TERNA EXAMINADORA

IVETTE LORENZANA, M.Sc.

WENDY MURILLO, Ph.D.

JEREMÍAS SOTO, M.D. M.Sc.

DEDICATORIA

A Dios primeramente, quien me dio la fe, la fortaleza, la salud y la perseverancia para terminar este posgrado y que sin su bendición nada es posible.

A mi asesora, la Dra. Ivette Lorenzana, quién me ha brindado su apoyo incondicional a lo largo desarrollo del trabajo de tesis, me ha formado a nivel académico y profesional y ha inculcado en mi la pasión por la investigación.

A mi co-asesora, la Dra. Wendy Murillo por su apoyo, cariño y estímulo constante.

A mi esposo, Pedro Mejía, quién me brindó su amor y apoyo incondicional. Su comprensión y paciente espera para que pudiera terminar el posgrado.

A mi Madre y mejor amiga Magdalena Gonzáles quién con el ejemplo me enseñó desde pequeña a luchar para alcanzar mis metas y perseverar hasta el final. ¡Mami mi triunfo es suyo!

A mis hermanas Mariela e Ivin, y a mi papá Arnoldo Carbajal por sus palabras de ánimo y estar siempre pendientes de mi.

A mi pequeño Matías que aun sin conocerlo se ha convertido en la principal motivación de mi vida, ¡lo hicimos juntos campeón!

AGRADECIMIENTOS

Al grupo de investigación del Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIENI) del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) de la Ciudad de México por su valiosa colaboración en el desarrollo del proyecto al Dr. Gustavo Reyes Terán, Dr. Santiago Ávila, Humberto Valenzuela, Selma Alva y Claudia García.

A mi segunda familia, la sección de Virología de la Escuela de Microbiología, quienes me han apoyado constantemente, mis compañeros de lucha: Dra. Leda Parham, Cynthia Rodríguez, Kimberly García, Gloria Salinas, Olga Chirinos y Selvin Palacios.

A los médicos, enfermeras y participantes de los diferentes centros de atención integral al paciente con VIH que aceptaron participar, por contribuir con el desarrollo del proyecto y la investigación del país.

A los Coordinadores y Maestros de la Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas, que me dieron esta oportunidad y quienes me han apoyado en la trayectoria de la misma.

A todas mis compañeras de la Maestría por su apoyo y palabras de ánimo.

ÍNDICE

| | |
|--|----------|
| CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO | 6 |
| 2.1 EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH)..... | 6 |
| 2.1.1 <i>La pandemia del VIH</i> | 6 |
| 2.1.2 <i>Situación mundial del VIH/sida</i> | 7 |
| 2.1.3 <i>Situación del VIH/sida en América Latina</i> | 9 |
| 2.1.4 <i>Situación del VIH/sida en Honduras</i> | 11 |
| 2.2 CLASIFICACIÓN Y ESTRUCTURA DEL VIH | 14 |
| 2.2.1 <i>Clasificación taxonómica</i> | 14 |
| 2.2.2 <i>Estructura y organización genómica del VIH</i> | 18 |
| 2.3 INFECCIÓN POR EL VIH-1..... | 21 |
| 2.3.1 <i>Ciclo de replicación del VIH-1</i> | 21 |
| 2.3.2 <i>Historia natural de la infección por VIH-1</i> | 24 |
| 2.3.3 <i>Respuesta inmune en la infección por VIH-1</i> | 27 |
| 2.3.4 <i>Terapia antirretroviral contra el VIH</i> | 29 |
| 2.4 PARÁMETROS CLÍNICOS QUE DETERMINAN LA PROGRESIÓN DE LA INFECCIÓN POR VIH..... | 32 |
| 2.4.1 <i>Infecciones oportunistas</i> | 32 |
| 2.4.2 <i>Determinación de carga viral de VIH</i> | 34 |
| 2.4.3 <i>Recuento de linfocitos T CD4+</i> | 35 |
| 2.5 FACTORES IMPLICADOS EN LA PROGRESIÓN A SIDA | 36 |
| 2.5.1 <i>Factores virológicos</i> | 38 |
| 2.5.2 <i>Factores genéticos del hospedero</i> | 40 |
| 2.6 DELECIÓN DE 32 PARES DE BASES EN EL CORRECEPTOR CCR5 (CCR5 Δ 32) | 42 |
| 2.7 COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD | 46 |
| 2.7.1 <i>Organización genómica y función del sistema HLA</i> | 46 |
| 2.7.2 <i>Estructura y denominación del sistema HLA Clase I</i> | 48 |
| 2.7.3 <i>Características del sistema HLA Clase I</i> | 50 |
| 2.7.4 <i>Alelos HLA implicados en la progresión o protección en el desarrollo de sida en individuos portadores del VIH-1</i> | 52 |
| 2.7.5 <i>ALELOS HLA Y FARMACOGENÉTICA</i> | 57 |

| | |
|---|-----------|
| CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA..... | 65 |
| 3.1 OBJETIVOS..... | 65 |
| 3.1.1 OBJETIVO GENERAL..... | 65 |
| 3.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 65 |
| 3.2 DISEÑO DEL ESTUDIO..... | 66 |
| 3.2.1 Tipo de Estudio..... | 66 |
| 3.2.2 Periodo del estudio..... | 66 |
| 3.2.3 Población de estudio..... | 66 |
| 3.3 TAMAÑO DE LA MUESTRA..... | 67 |
| 3.3.1 Cálculo del tamaño de muestra..... | 67 |
| 3.3.2 Criterios: inclusión, exclusión y eliminación..... | 68 |
| 3.3.3 RECOLECCIÓN DE LA INFORMACIÓN..... | 69 |
| 3.4 MÉTODOS..... | 70 |
| 3.4.1 Obtención de la muestra..... | 70 |
| 3.4.2 Determinación de carga viral de VIH-1..... | 70 |
| 3.4.3 Recuento de linfocitos T CD4+..... | 70 |
| 3.4.4 Cálculo del Z-score de VIH..... | 70 |
| 3.4.5 Extracción de ADN genómico..... | 71 |
| 3.4.6 Determinación de la delección CCR5 Δ 32..... | 71 |
| 3.4.7 Tipificación de alelos HLA de Clase I a alta resolución..... | 73 |
| 3.4.8 Análisis estadístico..... | 78 |
| 3.5 ORGANIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN..... | 79 |
| 3.5.1 Recursos..... | 79 |
| 3.6 CONSIDERACIONES ÉTICAS..... | 79 |
| 3.6.1 Consentimiento informado..... | 79 |
| 3.6.2 Procedimientos, riesgos y beneficios..... | 80 |
| 3.6.3 Confidencialidad..... | 81 |
| CAPÍTULO 4. RESULTADOS..... | 82 |
| 4.1 CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO..... | 82 |
| 4.1.1 Características epidemiológicas de la población de estudio..... | 82 |
| 4.1.2 Características clínicas y analíticas de la población de estudio..... | 84 |
| 4.2 DETERMINACIÓN DE LA FRECUENCIA DE LA DELECCIÓN CCR5 Δ 32..... | 86 |
| 4.3 DETERMINACIÓN DE LAS FRECUENCIAS ALÉLICAS HLA CLASE I (A, B, C).... | 87 |

| | |
|--|------------|
| 4.3.1 Distribución de los alelos HLA-A, B y C en la población de estudio..... | 87 |
| 4.3.2 Comparación de las frecuencias alélicas HLA Clase I (A, B, C) en portadores del VIH-1 procedentes de tres regiones geográficas de Honduras..... | 94 |
| 4.4 ASOCIACIÓN DE LOS ALELOS HLA DE RIESGO Ó PROTECCIÓN CON PARÁMETROS CLÍNICOS DE VIH | 100 |
| 4.5.2 Alelos HLA asociados con hipersensibilidad a nevirapina | 104 |
| CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN | 106 |
| 5.1 CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS Y CLÍNICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO..... | 107 |
| 5.2 DETERMINACIÓN DE LA FRECUENCIA DE LA DELECIÓN CCR5 Δ 32..... | 111 |
| 5.3 DETERMINACIÓN DE FRECUENCIAS ALÉLICAS HLA CLASE I (A, B, C)..... | 115 |
| 5.3.1 Distribución de los alelos HLA Clase I (A, B, C) en la población de estudio.... | 115 |
| 5.3.2 Comparación de las frecuencias alélicas HLA Clase I (A, B, C) en portadores del VIH-1 procedentes de tres regiones geográficas de Honduras..... | 118 |
| 5.4 RELACIÓN DE LOS ALELOS HLA DE RIESGO Ó PROTECCIÓN CON PARÁMETROS CLÍNICOS DE VIH-1 | 121 |
| 5.5 DETERMINACIÓN DE FRECUENCIAS DE ALELOS HLA ASOCIADOS CON HIPERSENSIBILIDAD A FÁRMACOS ANTIRRETROVIRALES | 123 |
| CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES | 128 |
| CAPÍTULO 7. RECOMENDACIONES..... | 129 |
| CAPÍTULO 8. LIMITACIONES | 130 |
| CAPÍTULO 9. REFERENCIAS | 131 |
| APÉNDICES..... | 138 |

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC: Abacavir

ADN: ácido desoxirribonucleico.

AIS: Sociedad internacional de sida

ARN: ácido ribonucleico

ARV: antirretroviral

CAI: Centro de atención integral

CCR5 Δ 32: deleción de 32 pb en el correceptor CCR5

CFRs: Formas recombinantes circulantes

CMH: Complejo Mayor de Histocompatibilidad

CTL: Linfocitos T citotóxicos.

FDA: Administración de medicamentos y alimentos

HEU: Hospital Escuela Universitario

HLA: Antígeno leucocitario humano.

HMCR: Hospital Mario Catarino Rivas

HS: Hospital del Sur

IE: Inhibidores de entrada

IIN: Inhibidores de integrasa

IMGT: Sistema de información internacional de inmunogenética

ImMunoGeneTics

INCP: Instituto Nacional Cardiopulmonar

IP: Inhibidores de proteasas

ITRAN: Inhibidores de la transcriptasa reversa análogos de nucleósidos

ITRNAN: Inhibidores de la transcriptasa reversa no análogos de nucleósidos

LTNP: no progresores a largo plazo.

LTR: Secuencias repetidas largas.

NVP: Nevirapina

OMS: Organización mundial de la salud

OPS: Organización Panamericana de la salud

PC: Progresores Crónicos

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PharmGKB: Base de datos de farmacogenética

PR: Progresores rápidos

RHS: Reacciones de hipersensibilidad

SDF-1: Factor derivado de células estromales-1.

SIDA: Síndrome de inmunodeficiencia adquirida

SNP: Polimorfismo que afecta a un nucleótido.

TARGA: Tratamiento antirretroviral de gran actividad

TB: Tuberculosis

TNF: Factor de necrosis tumoral

UFRs: Formas recombinantes únicas

USM: Unidad de Salud Metropolitana

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Prevalencia regional del VIH en adultos en el año 2014 (OMS)..... | 9 |
| Figura 2. Clasificación filogenética del VIH-1 y VIH-2..... | 16 |
| Figura 3. Estructura del virión de VIH | 19 |
| Figura 4. Estructura genómica del VIH. | 20 |
| Figura 5. Esquema del ciclo de replicación del VIH-1..... | 24 |
| Figura 6. Historia natural de la infección por VIH-1..... | 25 |
| Figura 7. Clasificación de los fármacos antirretrovirales utilizados en el TARGA. | 31 |
| Figura 8. Rol del CCR5 como correceptor en la entrada y fusión del VIH a la célula. | 43 |
| Figura 9. Mapa genético del Sistema HLA..... | 48 |
| Figura 10. Estructura funcional de las moléculas HLA Clase I. | 49 |
| Figura 11. Número de alelos HLA reportados en los últimos treinta años. | 51 |
| Figura 13. Patrón de bandas de amplificación de los genes HLA (A, B, C) por electroforesis..... | 76 |
| Figura 14. Frecuencia de alelos HLA- A. | 91 |
| Figura 15. Frecuencia alelos HLA-B. | 92 |
| Figura 16. Frecuencia de alelos HLA-C. | 93 |
| Figura 17. Comparación de frecuencias alélicas HLA-A en portadores del VIH-1 procedentes de las regiones centro, norte y sur de Honduras. | 95 |
| Figura 18. Comparación de frecuencias alélicas HLA-B en portadores del VIH-1 procedentes de las regiones centro, norte y sur de Honduras. | 97 |
| Figura 19. Comparación de las frecuencias alélicas HLA en portadores del VIH-1 procedentes de las regiones centro, norte y sur de Honduras. | 99 |

| | |
|---|-----|
| Figura 20. Relación de alelos HLA de “riesgo/protección con variables analíticas que determinan progresión a enfermedad en la infección por VIH-1. | 103 |
|---|-----|

LISTA DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Número de casos y tasa VIH por departamento (acumulativo 1985-2013). | 12 |
| Tabla 2. Esquema de tratamiento antirretroviral en adultos recomendado por la OMS, 2013. | 31 |
| Tabla 3. Cálculo del tamaño de la muestra. | 67 |
| Tabla 4. Distribución de los participantes durante el período de estudio. | 68 |
| Tabla 5. Primers utilizados para la tipificación de los alelos HLA Clase I (A, B, C). | 74 |
| Tabla 6. Características demográficas por región. | 83 |
| Tabla 7. Características clínicas y analíticas por región | 85 |
| Tabla 8. Distribución de las frecuencias de la delección CCR5 Δ 32. | 86 |
| Tabla 9. Frecuencia de alelos HLA Clase I (A, B, C) en portadores del VIH-1 de Honduras. | 88 |

LISTA DE APÉNDICES

- A. Flujograma de trabajo
- B. Consentimiento informado
- C. Ficha epidemiológica

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

La infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) sigue siendo una de las principales causas de mortalidad y morbilidad en el mundo. Las últimas cifras reportadas indican que 36.7 millones [34.3–41.4 millones] de personas vivían (al final de 2016) con el VIH en el mundo, 2.1 millones [1.9–2.2 millones] de personas se infectaron y 1.1 millones [980 000–1.6 millones] de personas murieron a causa de enfermedades relacionadas con el VIH/sida (ONUSIDA, 2016). A nivel mundial, 78 millones de personas han contraído la infección por el VIH desde el comienzo de la epidemia, de los cuales, 35 millones han fallecido a causa de enfermedades relacionadas al sida desde el comienzo de la infección (ONUSIDA, 2016).

Honduras ocupa el sexto lugar en problemática de VIH/sida en Latinoamérica, y es el tercer país con mayor prevalencia en Centroamérica (ONUSIDA, 2016). El número de casos de VIH/sida notificados desde 1985 hasta diciembre del 2015 es de 32,573, de los cuales, 22,737 (71%) son clasificados como infección avanzada y 9,836 (29%) como asintomáticos (Secretaría de Salud, 2015).

El VIH es miembro de la familia Retroviridae y pertenece al género Lentivirinae, llamado así por su largo periodo de incubación y el lento curso de la enfermedad. Es un virus ARN, envuelto, que se caracteriza por la transcripción reversa de su genoma ARN a ADN-complementario, y la integración de este en el genoma de la célula hospedera infectada, en este caso los linfocitos T CD4+ (Carter Jonh B., 2007).

En el período de latencia algunas personas VIH-positivas logran controlar la infección, pero con el paso del tiempo su sistema inmune se debilita y desarrollan la enfermedad (sida) en un período de 8 a 10 años; estos son llamados “*progresores típicos*”; a quienes de 2-3 años con la infección desarrollan sida se les conoce como “*progresores rápidos*”; mientras que en quienes después de 8 años los recuentos de linfocitos T CD4+ se mantienen estables y la carga viral baja sin necesidad de utilizar tratamiento antirretroviral se conocen como “*progresores lentos*”. También existe una pequeña proporción de individuos que se exponen repetidamente al virus y permanecen seronegativos; estos se consideran resistentes a la infección (Yang et al., 2013). Esta variabilidad en el curso de la infección luego de la exposición al VIH sugiere que existen mecanismos de resistencia natural contra esta infección viral.

Cuando hay una exposición continua al virus, varios mecanismos genéticos e inmunitarios son esenciales para que se logre el control de la infección. Diversos trabajos científicos han descrito la existencia de factores genéticos del hospedero relacionados con la progresión a enfermedad en la infección por el VIH (Buckheit et al., 2012; Coloccini et al., 2014). El componente genético del hospedero afecta definitivamente al tipo de respuesta inmunitaria generada (Carrière et al., 2014), al proceso de entrada del virus a la célula diana (Marmor et al., 2001) y al mecanismo de replicación y propagación del virus (Zhang et al., 2013). Adicionalmente otros aspectos pueden verse afectados, como el ritmo de progresión de la infección a sida, la aparición de determinadas infecciones o enfermedades oportunistas, y el tipo de respuesta al tratamiento con agentes antirretrovirales (Pirmohamed et al., 2015).

Los principales factores inmunogenéticos relacionados con la susceptibilidad a la infección por el VIH y la progresión a sida están relacionados con 3 familias de genes del hospedero: los antígenos leucocitarios humanos (HLA) I y II los receptores de quimiocinas y sus ligandos (López et al., 2012).

El VIH utiliza los receptores de quimiocinas CCR5 y CXCR4 como punto de fusión para infectar una célula, este proceso de entrada del virus a la célula hospedera puede verse afectado por polimorfismos genéticos donde la expresión de estos correceptores está disminuida o ausente. Diversos estudios han mostrado la importancia de la integridad del correceptor CCR5 en la infección y patogénesis del VIH-1. La delección de 32 pares de bases en el gen CCR5 (CCR5 Δ 32) en homocigosis disminuye significativamente, aunque no elimina por completo, el riesgo de infección por VIH-1 (Ballana et al, 2013), mientras que en heterocigosis, se ha asociado con una menor tasa de progresión a sida que las personas con el correceptor CCR5 normal (CCR5 wt/wt) (Fellay J, et al, 2009, Loannidis JP et al, 2001).

La aparición de nuevas variantes del virus en el curso de la infección de un paciente confiere al virus una gran capacidad para escapar a la respuesta inmunitaria (Juarez-Molina et al., 2014). En este contexto, el sistema HLA desempeña un papel determinante. Los genes del sistema HLA se localizan en el brazo corto del cromosoma 6 y están estructurados en tres grupos o clases. Los genes HLA de las clases I y II codifican proteínas de membrana implicadas en la presentación de antígenos extraños al sistema inmunológico. Una de las características inherente del sistema HLA es su enorme variabilidad. Dicha

variabilidad se localiza en la región de la molécula que define el lugar de anclaje de los péptidos que se van a presentar a los linfocitos T citotóxicos (LTC) (Abbas Abul K, 2012).

Estudios genéticos poblacionales han aportado un mayor entendimiento del papel de los determinantes genéticos en el hospedero con relación a la adquisición del virus, progresión a la enfermedad, transmisión y respuesta a la terapia antirretroviral (ARV) (Sobieszczyk et al., 2011). Al menos dos alelos, HLA-B*27 y B*57 (Naruto et al., 2012) han sido identificados como “*protectores*” contra el VIH-1, mientras que los alelos B*35 y B*53 actúan como factores que favorecen una mayor susceptibilidad a la infección y por ende una rápida progresión a sida (Gao et al., 2001). Además el alelo HLA-B*57:01 ha sido fuertemente asociado con el síndrome de hipersensibilidad al abacavir y los alelos HLA-B*14, HLA-C*04:01 y HLA-C*08 con hipersensibilidad a nevirapina (Pirmohamed et al., 2015). Estos medicamentos son recomendados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como primera línea y tratamiento alternativo en la terapia antirretroviral, y son utilizados en el esquema nacional de tratamiento en los infectados con VIH-1.

En Honduras, poco o nada conocemos sobre las características genéticas en general de la población, sobre todo, en relación al polimorfismo CCR5 Δ 32, los alelos HLA y su asociación con la progresión en la infección por el VIH-1 e hipersensibilidad a los antirretrovirales. La asociación de estos alelos ha sido ampliamente estudiada en varios países, permitiendo su correlación con diferentes condiciones clínicas, sin embargo, la frecuencia de los alelos HLA varía de región a región debido al bagaje genético que posee cada población.

En este escenario, el estudio de los factores genéticos en pacientes hondureños portadores del VIH-1 se considera de gran relevancia para el país, ya que este es el primer estudio que estima la frecuencia de la delección de 32 pares de bases en el correceptor CCR5 en nuestra población y corresponde al primer esfuerzo en describir las frecuencias de los alelos HLA clase I (loci: A, B, C), ambos relacionados como factores de riesgo o protección a enfermedad en la infección por VIH-1, lo cual sentará las bases para futuros estudios de asociación en el país, que permitan definir su utilidad como factores importantes tanto en la evolución de la infección como en sus implicaciones farmacogenéticas, de esta manera ser utilizados como marcadores en el pronóstico de progresión a enfermedad así como valorar la utilidad clínica de los alelos asociados con síndromes de hipersensibilidad a los fármacos antirretrovirales, previo al inicio del tratamiento.

Adicionalmente los datos obtenidos en esta investigación no solo son relevantes por su relación con la progresión del VIH-1, sino también para su asociación con otras enfermedades crónicas e infecciosas con las cuales han sido relacionados estos factores. En el caso de la tipificación de los alelos HLA clase I (A, B, C,) constituye el primer intento por reportar las frecuencias de estos alelos en tres diferentes regiones geográficas del país, lo cual nos aporta información valiosa sobre la diversidad alélica de la población hondureña, útil para futuros estudios en varios campos de la ciencia como: la antropología molecular, trasplante de órganos y tejidos, asociación con enfermedad y la farmacogenética.

CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO

2.1 EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH)

2.1.1 La pandemia del VIH

A finales de los años setenta y principios de los ochenta del siglo pasado, en Estados Unidos de América (EEUU) se observó que había un número inusual de hombres jóvenes homosexuales, haitianos, heroinómanos y hemofílicos (grupo de riesgo inicial “club de las 4 H”) que fallecía debido a infecciones normalmente oportunistas y benignas, y sus síntomas definieron una nueva enfermedad (Patrick R. Murray, 2013). En el año 1981, el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida), fue reconocido como una nueva entidad clínica (Gottlieb et al., 1981) que se caracteriza por la presencia de anomalías inmunológicas generalmente acompañadas por infecciones oportunistas, desórdenes neurológicos y formas inusuales de cáncer.

Los primeros estudios epidemiológicos demostraron que esta enfermedad era causada por un nuevo agente infeccioso, el cual fue aislado por primera vez en Francia por François Barré-Sinoussi (Barre-Sinoussi et al., 1983), a partir de una muestra de sangre de un hombre homosexual con sida. Poco después en EEUU fue aislado un retrovirus similar en otro paciente con la misma condición clínica al cual nombraron HTLV III (Gallo et al., 1984); pero fue hasta 1986 que se demostró que ambos aislamientos correspondían al mismo virus y oficialmente este nuevo retrovirus fue nombrado: Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), llamado así por ser responsable de causar el Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida).

Desde entonces el VIH/sida ha cobrado la vida de millones de personas y hoy en día es una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial, considerándose una pandemia ya que se ha documentado la presencia del virus en la mayor parte de los países del planeta, ocupando el quinto lugar de las diez pandemias con mayor número de muertes en la historia de la humanidad. Aunque se desconoce cuál es el número total de personas afectadas, pues la mayor parte de los portadores del virus suele desconocer su situación hasta el momento en que presentan alguna de las enfermedades oportunistas. Se estima que 78 millones de personas han contraído la infección por el VIH desde el comienzo de la pandemia (ONUSIDA, 2016).

2.1.2 Situación mundial del VIH/sida

La pandemia del VIH/sida constituye un problema de salud pública con grandes repercusiones demográficas, sociales y económicas en muchos países, las últimas cifras reportadas por el Programa Conjunto de Naciones Unidas sobre VIH/sida (ONUSIDA) indican que 36.7 millones [34 millones–39.8 millones] de personas vivían con el VIH en el mundo a finales del 2015; unas 35 millones [29.6–40.8 millones] de personas han fallecido a causa de enfermedades relacionadas con el sida desde el comienzo de la epidemia, 2 millones [1.9–2.2 millones] de personas contrajeron la infección por el VIH y 1.1 millones [940 000–1,3 millones] de personas murieron a causa de enfermedades relacionadas con el sida en el 2015 (ONUSIDA, 2017a).

Se estima que ocurren alrededor de 2 millones de nuevas infecciones por año y aproximadamente 6,800 nuevas infecciones al día, de los cuales más del 97% son

en países en vías de desarrollo. Esta es una de las principales preocupaciones para la salud pública mundial, ya que la mayoría de los países afectados son países de bajos recursos que tienen deficientes programas de detección y prevención y escasa cobertura con la terapia antirretroviral, como es el caso de Honduras.

Aunque el número de nuevos diagnósticos en mujeres sigue siendo superior al de los hombres, se ha visto una mayor reducción de infectados en los últimos años, sobre todo en los países donde la transmisión por vía heterosexual es la predominante, como son África subsahariana y el Caribe. Pero aún así, en estas dos regiones, aproximadamente la mitad de los nuevos diagnósticos corresponden a mujeres jóvenes en edad reproductiva, por lo que la epidemia del VIH constituye una auténtica amenaza para el desarrollo de estos países.

Para junio de 2016, 18.2 millones [16.1 millones–19.0 millones] que representa el 49.5% de personas a nivel mundial que vivían con el VIH tenían acceso al tratamiento antirretroviral (ARV), de estos, el 46% [43%-50%] corresponde a adultos, el 32% [30%-34%] a niños y el 77% [69%-86%] a mujeres embarazadas. Gracias a esta cobertura y a las campañas de prevención de la transmisión madre-hijo las nuevas infecciones en población infantil se redujeron en un 58% entre el 2000 y el 2015 (ONUSIDA, 2016a).

A pesar que la epidemia varía considerablemente entre países y regiones, África subsahariana sigue siendo la región más severamente afectada, en la que 1 de cada 20 adultos está infectado por el VIH, lo que concentra cerca del 71% de todas las personas que viven con VIH en el mundo, como se observa en la figura 1, la prevalencia de VIH en África es de 4.5%, la segunda región más afectada es

América con 0.5%, seguido de Europa con 0.4% y Asia donde la prevalencia varía según la región de 0.1 a 0.3%. (OMS, 2014).

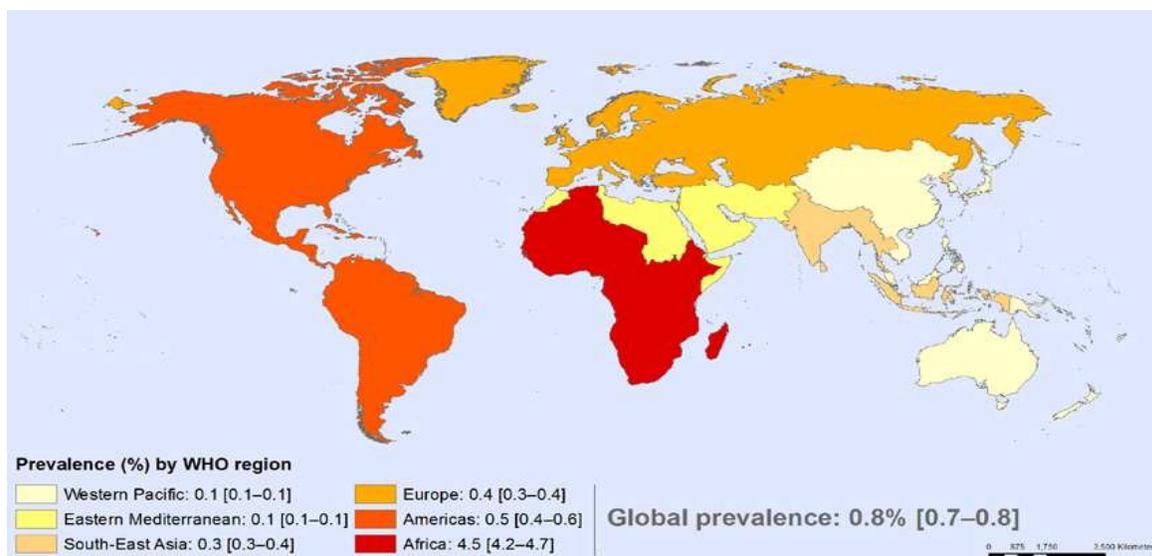


Figura 1. Prevalencia regional del VIH en adultos en el año 2014 (OMS).

2.1.3 Situación del VIH/sida en América Latina

El último reporte de ONUSIDA indica que en el año 2015, había 2 millones [1.7 millones–2.3 millones] de personas que vivían con el VIH en América Latina. Se estima que se produjeron 100,000 [86,000–120,000] nuevas infecciones en la región, es importante señalar que la cifra de nuevas infecciones no sufrió ningún cambio entre 2010 y 2015. Ese mismo año fallecieron 50,000 [41,000–59,000] personas a causa de enfermedades relacionadas con el sida (ONUSIDA, 2016b). Sin embargo entre 2010 y 2015, el número de muertes relacionadas con el sida en la región disminuyó en un 18% (ONUSIDA, 2016).

Entre las poblaciones con mayor vulnerabilidad en la región figuran hombres que tienen sexo con hombres, mujeres trans, trabajadores/as sexuales y sus clientes, usuarios de drogas, jóvenes y adolescentes, población indígena y afro

descendiente, personas en situación de calle, y mujeres víctimas de violencia (OPS, 2015).

En América Latina, ocurrieron 2,100 [1,600–2,900] casos de nuevas infecciones por el VIH en niños en el año 2015. Aunque se ha reducido significativamente la transmisión vertical, exceptuando África Sub-sahariana, el Caribe es la otra región donde la proporción de mujeres y niñas (53%) es mayor que la de los hombres y niños. Por lo que se considera que existe feminización de la epidemia en América Latina y que debido a esto la cifra de menores de 15 años que viven con VIH siguen siendo elevadas en esta región.

A diferencia de la tendencia mundial, la cobertura del tratamiento en la región Latinoamericana es más alta entre los niños (54% [46-64%]) que entre los adultos (47% [40-56%]). De los 10 países de la región con el mayor número de personas que viven tanto con el VIH como con la tuberculosis (TB), tres países (Brasil, Ecuador y Honduras), proporcionaron la terapia antirretroviral a más de la mitad de las personas que viven con el VIH/TB en el 2014 (Informe, ONUSIDA, 2015). Sin embargo, Latinoamérica no parece tener un buen ritmo para alcanzar la meta global de reducir el número de muertes relacionadas con la tuberculosis en un 50% en el 2015; ya que esas muertes se redujeron solamente en un 19% desde el 2004 hasta el 2013.

A pesar de la expansión de los servicios integrados y descentralizados de atención y tratamiento en la región, es necesario equilibrar estos avances con un énfasis en intervenciones y estrategias eficaces e innovadoras, ya que las infecciones nuevas y la mortalidad no están disminuyendo con tanta rapidez como se había propuesto y la epidemia de VIH sigue estando concentrada en grupos específicos de la

población para los cuales acceder y recibir los servicios de atención médica necesarias presenta varias limitaciones (OPS, Foro 2015).

2.1.4 Situación del VIH/sida en Honduras

Desde 1985 cuando se notificó el primer caso en nuestro país, la presencia de VIH/sida es una realidad que afecta a la población hondureña de forma epidémica. Honduras ocupa el sexto lugar en Latinoamérica entre los países con mayores prevalencia de VIH/sida y es el tercer país más afectado en Centroamérica después de Belice y Panamá.

El número de casos de VIH/sida notificados hasta diciembre del 2015 es de 32,573, de los cuales 22,737 (71%) son clasificados como infección avanzada por VIH y 9,836 (29%) como VIH asintomáticos (Secretaría de Salud, 2015). Para ese mismo año la prevalencia de VIH en adultos (15-49 años de edad) fue de 0.42%, ocurrieron 663 nuevas infecciones (57% en hombres y 43% en mujeres), y 1,160 defunciones (61% en hombres y 39% en mujeres) (informe consida, 2015).

La población joven, en edad reproductiva y económicamente activa es la que está principalmente afectada por la epidemia de VIH. Los grupos de edad comprendidos entre los 15 y los 39 años representan el 72% de los casos notificados a lo largo de los últimos treinta años. En relación a la distribución geográfica de la epidemia, (Tabla 1) los departamentos más afectados son: Islas de la Bahía, Atlántida, Cortés, Francisco Morazán, Yoro, Choluteca, Colón y Comayagua ubicados en las zonas norte, centro y sur del país, que juntos agrupan el 86.4% de los casos VIH/sida a nivel nacional (ONUSIDA, 2012).

Tabla 1. Número de casos y tasa VIH por departamento (acumulativo 1985-2013).

| Departamentos | Casos VIH | Tasa VIH/100,000 hab. | Departamentos | Casos de VIH | Tasa VIH/100,000 hab. |
|-------------------|-----------|-----------------------------|---------------|-----------------|-----------------------------|
| Islas de la Bahía | 466 | 844.7 | Copán | 682 | 177.2 |
| Atlántida | 3,165 | 740.1 | Santa Bárbara | 699 | 165.0 |
| Cortés | 11,728 | 694.0 | El Paraíso | 629 | 138.5 |
| Colón | 1,465 | 472.3 | Olancho | 444 | 62.0 |
| Francisco Morazán | 6,736 | 330.1 | Ocotepeque | 114 | 80.8 |
| Gracias a Dios | 409 | 315.8 | La Paz | 144 | 68.5 |
| Yoro | 1,919 | 291.5 | Lempira | 157 | 46.2 |
| Valle | 564 | 203.4 | Intibucá | 93 | 36.9 |
| Choluteca | 1,409 | 177.2 | Ignorado | 53 | - |
| Comayagua | 967 | 165.0 | TOTAL | 31,823 | 372.0 |

Fuente: SESAL, 2013.

De los casos de sida notificados por la Secretaría de Salud de Honduras, más del 91.6% son transmitidas por contacto sexual, siendo esta la principal vía de transmisión, 2.6% por transmisión vertical (madre-hijo), por el uso de drogas inyectables la transmisión es baja, con un 0.1% y en un 2.0% se desconoce el modo de transmisión. En los últimos años no se han reportado casos asociados a la transfusión sanguínea. (SESAL,2015).

El país, tiene una epidemia concentrada en hombres que tienen sexo con hombres, mujeres trans, trabajadores/as sexuales, aunque existen otras poblaciones clave como la población garífuna, uno de los grupos étnicos de afro

descendientes más grande que habita en la zona norte de Honduras con una población aproximada de 300,000 habitantes, corresponde uno de los grupos más afectados por la epidemia de VIH-1 donde la prevalencia es mayor a la de la población general. Las prevalencias oscilan entre 4.4% en hombres y 4.6 en mujeres (informe considera, 2015).

La Segunda Encuesta de Vigilancia del Comportamiento Sexual y Prevalencia de Infecciones de Transmisión Sexual (ECVC) en poblaciones clave de Honduras, realizada en año 2012, reporta una prevalencia de VIH en trabajadoras sexuales de 3.3% (1.4-5.8) en Tegucigalpa, 6.7% (4.1-9.5), en San Pedro Sula y 15.3% (8.0-23.8) en La Ceiba; y para hombres que tienen sexo con otros hombres de 6.9% (3.5-10.5) en Tegucigalpa, 10.7% (6.0-18.0) en San Pedro Sula y 11.7% (5.9-19.3) en La Ceiba.

En cuanto al acceso de los servicios de atención integral, la Secretaría de Salud reglamentó la provisión de la terapia antirretroviral en el año 2002. Para el 2014 el país cubrió el 98% del costo de los antirretrovirales con recursos nacionales (SESAL, 2014). Ese mismo año La Secretaría de Salud proveyó servicios descentralizados en 49 Centros de Atención Integral (CAI) distribuidos en las 20 regiones departamentales del país y funcionando bajo un sistema único de suministro y distribución de antirretrovirales. Aunque el 80% de los pacientes se concentran en 12 CAIs de las regiones geográficas mas afectadas del país (centro, norte y sur).

Para el cierre del 2014, aproximadamente 9,920 personas estaban bajo terapia antirretroviral, es decir, el 43.1% del total de personas que se estimaba que vivían con VIH, de estos 4,826 son hombres y 5,100 son mujeres, 700 eran menores de

15 años y 9,226 en mayores de 15 años. Según el esquema de tratamiento el 83.2% se encuentran en primera línea de terapia, 16.6% en segunda línea y el 0.2% en terapia de rescate (informe ONUSIDA, 2015). La Secretaría de Salud de Honduras ha elaborado lineamientos para el tratamiento antirretroviral contra el VIH con base en las directrices brindadas por la Organización Mundial de la Salud (Guía tratamiento ARV en adultos, OMS, 2013).

2.2 CLASIFICACIÓN Y ESTRUCTURA DEL VIH

2.2.1 Clasificación taxonómica

Según las características genéticas, biológicas y morfológicas, el VIH pertenece a la familia Retroviridae y al género Lentivirinae (Barre-Sinoussi et al., 1983), llamado así por su largo periodo de incubación y lento curso de la enfermedad. La familia Retroviridae se caracteriza por agrupar una amplia gama de agentes virales, que afectan aves, mamíferos como: bovinos, murinos, simios además de los humanos. En la actualidad se han identificado 5 retrovirus causantes de enfermedad en humanos: Los virus de inmunodeficiencia Humana (VIH-1 y VIH-2), responsables del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida); los virus linfotrópicos de células T humano (HTLV-I y HTLV-II,) causantes de leucemias y síndromes neurológicos; y el recientemente descrito virus xenotrópico relacionado con el virus de la leucemia murina (XMRV), que podría estar involucrado en la patología del cáncer de próstata y el síndrome de fatiga crónica (Robert Schlaberg et al 2009, Lombardi et al, 2009).

Una de las características que comparten los retrovirus es que realizan la transcripción reversa de su genoma ARN a ADN complementario (ADNc) y la integración de este en el genoma a la célula diana, en el caso del VIH, los linfocitos T CD4+ (Carter Jonh B. , 2007). El VIH es un virus citopático, con alta tasa de replicación, que presenta viremia libre y una alta variabilidad genética que le permite escapar de la respuesta inmune. Se han identificado dos tipos: VIH-1 y VIH-2. El VIH-1 está extendido por todo el mundo y es el responsable de la pandemia, causa el mayor número de casos de sida en África subsahariana, Asia, Europa, EE.UU. y América Latina, incluido Honduras.

El VIH-2 se encuentra distribuido principalmente en países de África Occidental con casos particulares en otros países del continente, produce una enfermedad semejante al VIH-1 pero menos virulento; con un período de latencia mayor, menor capacidad replicativa y tasas de progresión de la enfermedad más lentas. Dentro del VIH-2 encontramos ocho grupos filogenéticos (A-H), siendo el A el más prevalente (García de Quevedo, 2003).

El VIH-1 presenta gran variabilidad genética, derivada de la alta tasa de mutación, recombinación y heterogeneidad de las poblaciones víricas (Carter Jonh B. , 2007). Esto presenta importantes implicaciones biológicas y clínicas ya que las dificultades para interferir con la capacidad adaptativa del VIH-1 hace difícil el control de la infección y la prevención del desarrollo del sida.

Dentro del VIH-1, las cepas se han clasificado en cuatro grandes grupos, según la homología de sus secuencias genéticas: grupo M (del inglés *main* o principal), grupo O (del inglés *outlier* o atípico) y grupo N (no M, no O) y el más reciente descrito grupo P (Plantier et al., 2009). La mayoría de cepas circulantes en el

mundo pertenecen al grupo M, el resto de grupos están limitados principalmente a África subsahariana occidental, por lo que se le considera a éste responsable de gran parte de todas las infecciones a nivel mundial. Los virus del grupo M, han sido clasificados en 9 subtipos denominados por letras (A-D, F-H, J, K,), varios sub-subtipos, y numerosas formas recombinantes circulantes (CFRs) por sus siglas en inglés (circulating recombinant forms) (Velasco, A.M. et al. 2009) como se muestra en la figura 2.

El subtipo C es responsable del mayor porcentaje de infecciones en el mundo, predominante en África y Asia, el subtipo B sigue siendo el predominante en Europa y América del Norte y es el responsable de la epidemia en Honduras (ONUSIDA, 2008). Aunque con la gran movilidad de las poblaciones los límites geográficos entre subtipos van desapareciendo, es posible encontrar diversidad de subtipos en una población/región geográfica que anteriormente no se reportaba su presencia, este es un fenómeno dinámico que obliga a estar investigándolo.

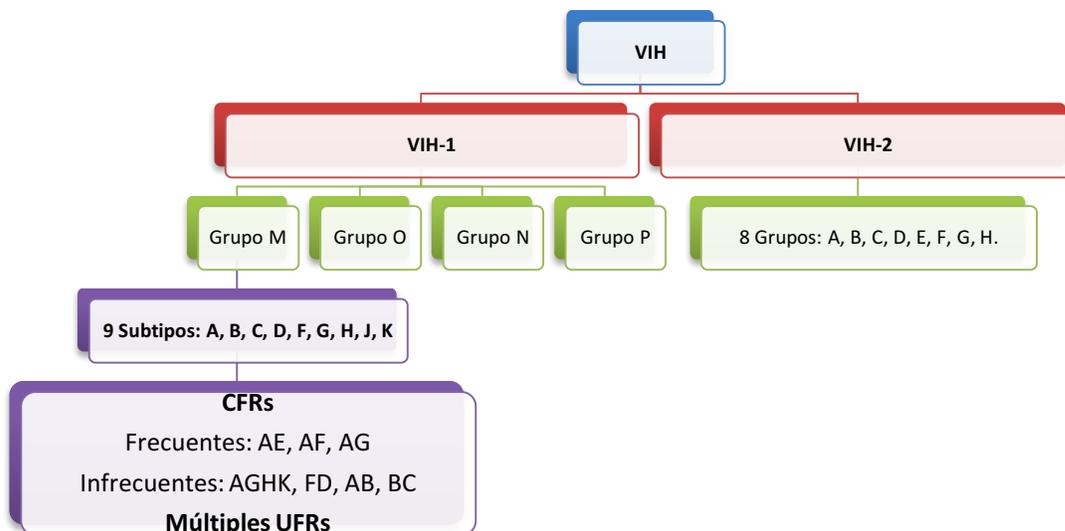


Figura 2. Clasificación filogenética del VIH-1 y VIH-2.

Dentro de algunos subtipos se distinguen sub-subtipos, como ocurre con el subtipo F, con los sub-subtipos F1 (presente en Brasil, Rumanía y África Central) y el F2 (Camerún) y en el subtipo A, con los sub-subtipos A1, A2, A3 (Velasco, A.M. et al 2009), de los cuales el A1 es el más predominante.

En áreas donde circulan diferentes subtipos del VIH-1 en individuos infectados por dos o más virus de distinto subtipo se pueden originar CRFs, las cuales se definen como aquellas secuencias genéticas identificadas y descritas en por lo menos 3 individuos no asociados epidemiológicamente. Según la base de datos de secuencias de VIH del Laboratorio Nacional Los Álamos existen hasta el momento 88 formas recombinantes circulantes CRFs reportadas en todo el mundo concentradas en determinadas áreas geográficas (Los Álamos, HIV database, 2017). Además existen múltiples formas recombinantes únicas (URFs) estas son secuencias genéticas encontradas en individuos aislados o grupos de personas infectadas relacionadas epidemiológicamente. La variabilidad del VIH-1 es tan grande que en un individuo infectado existe una enorme cantidad de genomas virales, muy relacionados entre sí pero no idénticos, llamados “cuasi especies”.

En Honduras, al igual que en el resto de América y Europa, predomina el subtipo B, aunque se han reportado algunos aislamientos de subtipos no-B y algunas CRFs en los últimos años. Un estudio realizado por Wendy Murillo y colaboradores que incluyó 625 secuencias de 6 países Centroamericanos incluido Honduras, reveló que la mayoría de las secuencias pertenecían al subtipo B (98.9%), (0.8%) subtipo C y (0.3%) URFs (URF_AD y URF_AK), además los análisis filogenéticos agruparon las secuencias en 5 clados, sin embargo, el (62%) de las secuencias se agrupó en un solo clado, sugiriendo que una sola introducción del subtipo B de

VIH-1 es responsable de la mayoría de los casos en América Central (Murillo et al, 2013).

2.2.2 Estructura y organización genómica del VIH

Como todos los retrovirus, el genoma del VIH está constituido por dos hebras idénticas de ARN de polaridad positiva en el interior de una partícula esférica de 80 a 120 nm de diámetro, que posee una bicapa lipídica externa que recubre la nucleocápside, envoltura formada a partir de la membrana de la célula hospedera y puede incluir proteínas de la célula como las del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) Clase I y II (Tremblay et al., 1998), en la que se insertan 72 espículas o proyecciones formadas por las glicoproteínas (gp) virales, gp120 y gp41, las cuales están asociadas no covalentemente en la superficie del virión.

Como se muestra en la figura 3, en el interior de la bicapa lipídica se encuentran las proteínas de la matriz (p17), cápside (p24) y nucleocápside (p7) que forman la estructura que protege las 2 cadenas de ARN y las 3 enzimas necesarias para el ciclo infeccioso del virus: la proteasa (PR), la transcriptasa reversa (TR) y la integrasa (IN) (Patrick R. Murray, 2013).

Al ser un retrovirus, el VIH se replica mediante la acción de la enzima transcriptasa reversa (TR) que retro transcribe el ARN a ADN proviral que se integra en el genoma del hospedero utilizando la enzima integrasa. A partir de este provirus se transcribe a ARN mensajero (ARNm) que codifica las proteínas necesarias para la conformación de la partícula viral que, en conjunto con el ARN viral, forman la partícula que emerge por gemación a través de la membrana celular, incorporando

lípidos de la misma y las glicoproteínas virales forman parte de la envoltura antes mencionadas, que a su vez incorporan azúcares derivadas de la célula hospedero.

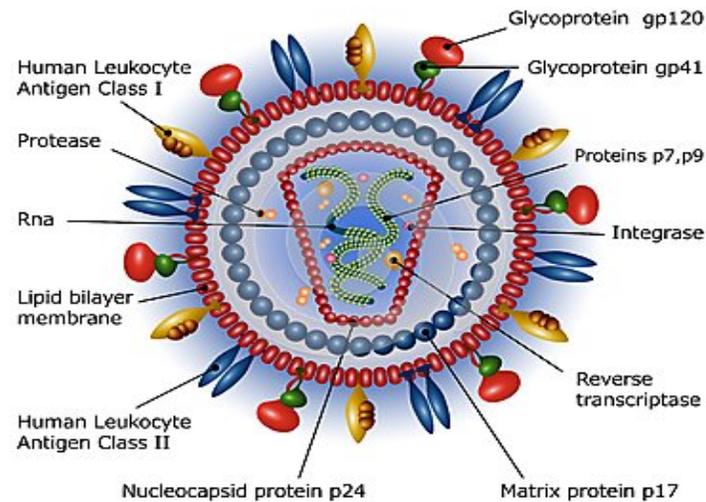


Figura 3. Estructura del virión de VIH.

Tomado de <http://www.unaids.org/es>

El genoma del VIH posee una longitud aproximada de 9,800 pb. Está formado por tres genes esenciales: *gag*, *pol* y *env*. El gen *gag* codifican 4 productos polipeptídicos que forman el core llamadas proteínas menores: p17 (matriz), p24 (cápside), p6 y p7 (nucleocápside) como puede observarse en la figura 4. El gen *pol* codifica una gran poli proteína que sirve de precursor para las enzimas virales esenciales del ciclo replicativo viral, estas son: transcriptasa reversa, proteasa e integrasa, y el gen *env* codifica para dos glicoproteínas asociadas con la envoltura del VIH y responsables de la unión a la célula hospedera; la proteína de superficie gp120 y la transmembranal gp41 (Carter Jonh B. , 2007).

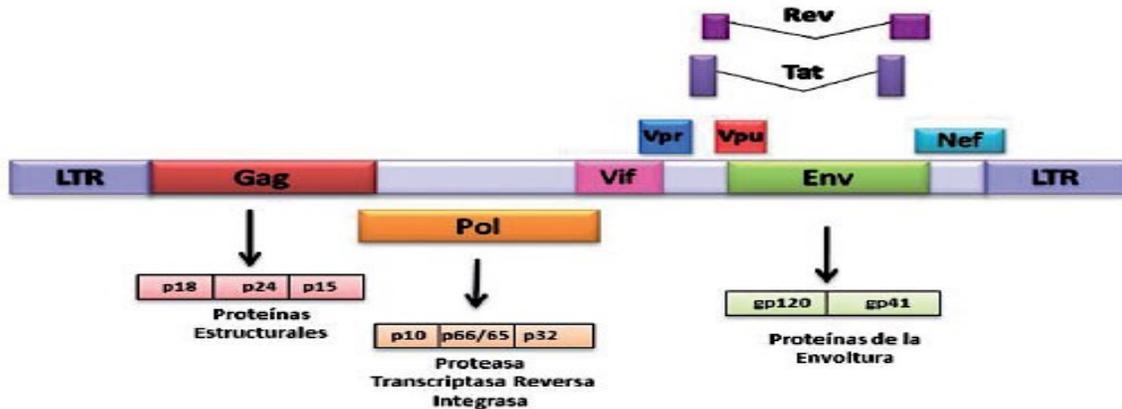


Figura 4. Estructura genómica del VIH. Estructura genómica del VIH-1; el esquema resalta el ADN proviral, flanqueado por regiones repetitivas extensas, denominadas LTR. A partir de este se transcriben los ARNm que codifican para las proteínas estructurales (Gag), la envoltura (Env) y las enzimas con actividad transcriptasa reversa, proteasa e integrasa (Pol); también se destacan las regiones genómicas que codifican para las proteínas accesorias (Vif, Vpr, Vpu, Nef, Tat y Rev).

Adaptada de: Arroyave, J. et al, 2013. Interaction between HIV-1 and GB virus type-C during coinfection status. Revista chilena de infectología, 30(1), 31-41. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182013000100005>.

Además, el virus posee seis genes adicionales, dos de ellos reguladores (*tat* y *rev*); el *tat* es un gen temprano que acelera la replicación viral aumentando su propia síntesis y la de las proteínas virales a través de la expresión de todos los genes virales, siendo imprescindible para la replicación. El gen *rev* (Regulador de la expresión viral) codifica una proteína esencial para la replicación viral, debido a su función transportadora de los transcritos virales entre el núcleo y el citoplasma. Una vez sintetizada en el citoplasma, Rev pasa al núcleo donde interactúa con la secuencia RRE (del inglés *Rev response element*) presente en los transcritos virales semiprocesados y sin procesar; esta interacción favorece el reclutamiento de proteínas nucleares, para formar un complejo de exportación que lleva los diferentes transcritos hacia el citoplasma, para que sean traducidos por los

ribosomas en proteínas estructurales y no estructurales del virus (Askjaer et ál., 1998).

El VIH posee cuatro genes accesorios *nef* y *vif* que están relacionados con la infectividad del VIH. *nef* se expresa en forma abundante al inicio de la infección como una proteína (p57) que aumenta la infectividad y podría considerarse como un auténtico factor de virulencia (Piguet et al., 2000). El gen *vpr* interviene en la regulación del ciclo replicativo y el *vpu* está asociado con la maduración de la partícula viral (Klimkait et al., 1990).

Las secuencias repetidas largas (LTR, del inglés *long terminal repeats*), no codificantes, flanquean los extremos 3' y 5' del genoma viral, donde se encuentran regiones reguladoras esenciales para el ciclo replicativo del virus. Estas contienen señales que controlan la iniciación de la transcripción y la terminación (Jean et al., 1993).

2.3 INFECCIÓN POR EL VIH-1

2.3.1 Ciclo de replicación del VIH-1

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 de la célula (Patrick R. Murray, 2013).

Como se muestra en la figura 5, el ciclo de replicación del VIH-1 presenta varias etapas y muchos autores las han clasificado de diferentes maneras, a

continuación se trata de explicar ordenadamente la cascada de eventos que ocurren desde la entrada del virus a la célula hospedera hasta la salida de los viriones para infectar otras células:

- 1. Entrada:** el ingreso del virión a la célula está mediado por la interacción específica de la gp120 con el receptor CD4 presente en los linfocitos T, aunque en menor porcentaje también puede infectar macrófagos, monocitos y células dendríticas debido a que también expresan en su superficie el receptor CD4 (Wu et al., 1996).
- 2. Fusión:** La unión virión-célula lleva al proceso de fusión de las membranas, que es facilitado por la glicoproteína de envoltura gp41 y los correceptores de los linfocitos y monocitos, CCR5 y CXCR4 principalmente. Esta unión desencadena cambios conformacionales sobre la membrana de la célula, dando lugar a la entrada del genoma viral al citoplasma celular (Wu et al., 1996).
- 3. Transcripción reversa del ARN a ADNc:** Luego del ingreso del ARN viral, por acción de la enzima transcriptasa reversa, este sufre un proceso de retrotranscripción que convierte el ARN de cadena simple en ADN de doble cadena. Este mecanismo es altamente complejo y es responsable de la capacidad que posee el virus de recombinación de material genético propio de los retrovirus y por ende del VIH-1 (Cullen et al., 1991).
- 4. Integración:** Una vez sintetizado el ADN proviral, la integrasa se encarga de transportarlo al núcleo y unirlo covalentemente en sitios aleatorios del ADN celular, esta propiedad permite al virus desarrollar una infección persistente en su hospedero (Wei et al., 1995).

- 5. Transcripción:** 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. 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 (Straszer and Hurt, 2001).
- 6. Síntesis proteica:** la síntesis de las proteínas virales puede ocurrir en los poli ribosomas libres del citoplasma o en la membrana del retículo endoplásmico rugoso según la naturaleza de las proteínas. Algunas son sintetizadas como poli proteínas y necesitan sufrir modificaciones postraduccionales.
- 7. Ensamblaje y salida del virión por gemación:** algunas de las proteínas virales se ubican en los centros de ensamblaje para formar los nuevos viriones, y son liberados mediante un proceso de gemación a través de la membrana plasmática, trayendo parte de la membrana celular que contiene las glicoproteínas de la envoltura. El virión requiere la acción de la proteasa para formar una partícula viral madura e infectiva (Carter Jonh B. , 2007).

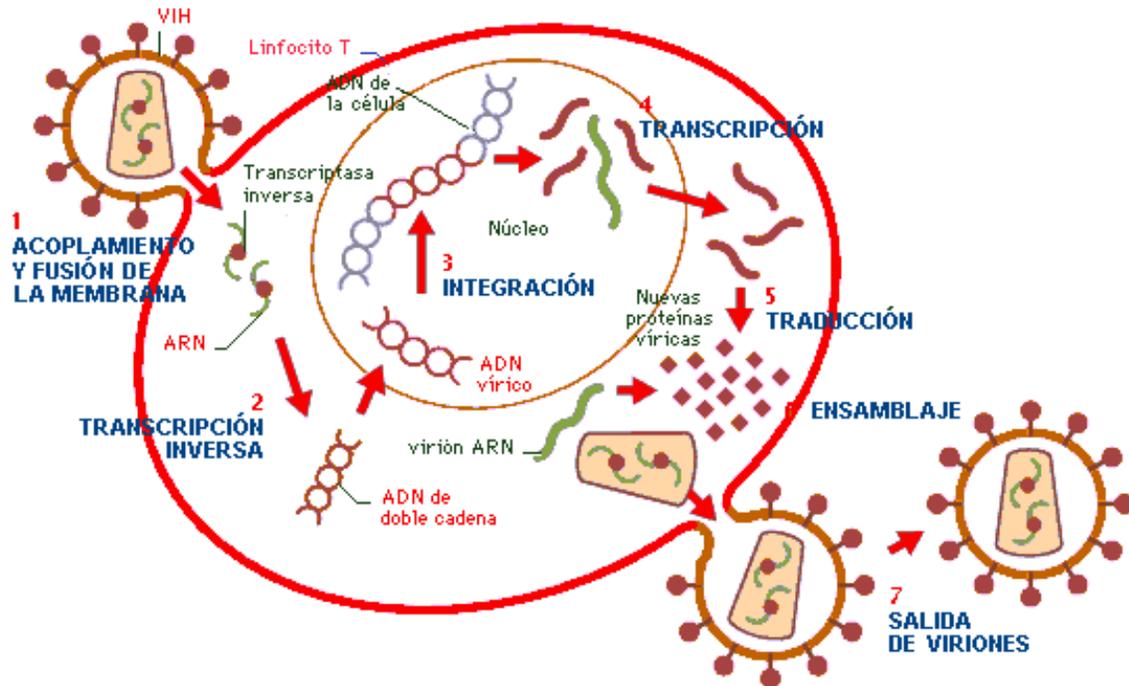


Figura 5. Esquema del ciclo de replicación del VIH-1. 1) Unión de la gp120/gp41 a los receptores de membrana y fusión. 2) Transcripción inversa del material genético del virus. 3) Integración del ADN viral en el ADN de la célula hospedadora. 4) Transcripción del ADN proviral y formación del ARN mensajero viral. 5) Traducción y síntesis de las proteínas necesarias para la formación de viriones. 6) Ensamblaje de los virus inmaduros. 7) Salida de los viriones al medio extracelular.

Tomado de: <http://acerdelvih-sida.blogspot.com/2015/>

2.3.2 Historia natural de la infección por VIH-1

La infección por VIH-1 presenta tres fases que se esquematizan en la figura 6. La primera de ellas denominada **primo infección o infección aguda**, se caracteriza por la detección de una alta viremia además de algunos síntomas clínicos inespecíficos leves tipo mononucleosis infecciosa, con fiebre, cefalea, mialgia, dolor de garganta, rash y malestar general, observándose una disminución del número de linfocitos T CD4+. Una vez resuelto este período de entre 2-6 semanas, y coincidiendo con la aparición de inmunidad humoral y celular, la carga

viral disminuye hasta alcanzar un valor que se mantendrá estable durante la mayor parte del curso de la infección, aunque algunos autores sostienen que muy por el contrario, los niveles de ARN del VIH-1 en el plasma permanecen relativamente constantes en ausencia de tratamiento y que este fenómeno es el resultado del balance de la producción y eliminación del virus, creando un estado estacionario, el cual constituye la segunda fase denominada **período de latencia clínica** (Figura 6). Esta fase varía sustancialmente entre individuos, de hecho, el período desde la infección hasta la muerte puede variar en más de 10 años (Moss and Bacchetti, 1989). La mayoría de los pacientes (80-85%), denominados progresores crónicos (PC), presentan una evolución caracterizada por una progresiva caída del número de linfocitos T CD4+ durante un periodo de 8 a 10 años, hasta presentar finalmente las enfermedades definitivas de sida en ausencia de tratamiento antirretroviral (Muñoz et al., 1989).

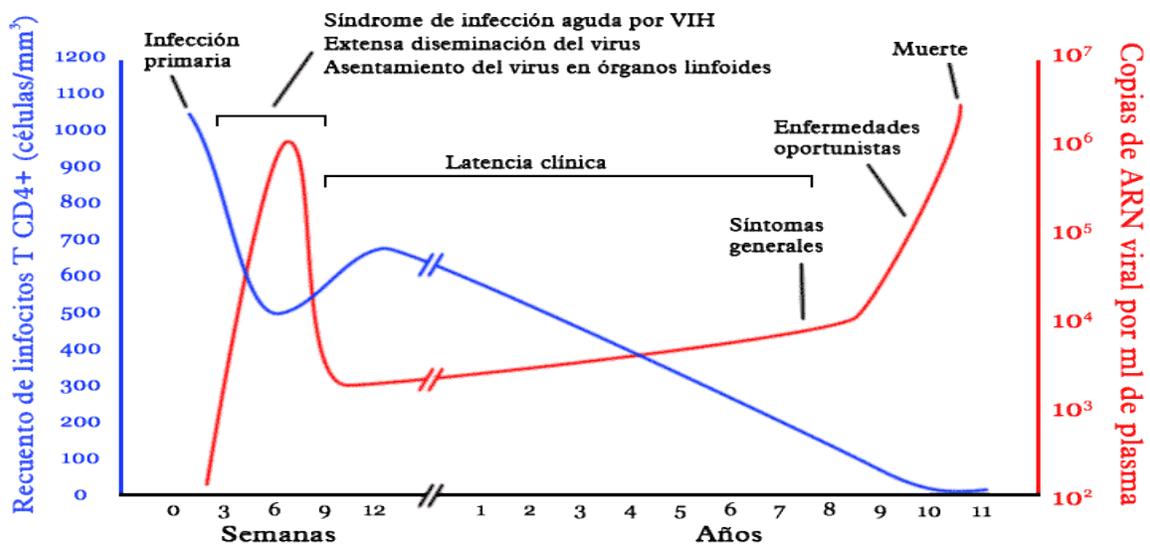


Figura 6. Historia natural de la infección por VIH-1.

Tomado de: <http://www.medicinahoy.org/vih.html>

Este patrón en la progresión de la infección no parece cumplirse en todos los individuos infectados, ya que las recientes líneas de investigación revelan que existen poblaciones que muestran una evolución muy diferente a la mencionada anteriormente. Se ha reportado que existe una pequeña proporción de pacientes infectados (10%), denominados progresores rápidos (PR), en los cuales, el descenso en el número de células T CD4+ se produce a una mayor velocidad, entre 2 a 3 años después de la infección, acompañado de altos niveles de ARN viral en plasma que no disminuyen sustancialmente después de la infección primaria (Casado et al., 2001).

Además, existe un pequeño grupo de pacientes infectados (5-10%), denominados progresores lentos o no progresores a largo plazo (PL o LTNP), en los que el número de linfocitos T CD4+ se mantiene a niveles normales incluso después de 10 años de infección y suelen presentar un nivel de ARN viral en plasma siempre bajo (Bello et al., 2005; Buchbinder et al., 1994).

En los últimos años, se ha descrito un nuevo subgrupo de pacientes dentro del grupo de LTNP, denominados “Supresores Élite”, “VIH controladores”, o “Élite no progresores”. Se han definido como portadores del virus que mantienen la carga viral por debajo de 50 copias/ml en ausencia de tratamiento antirretroviral (Deeks and Walker, 2007; Dyer et al., 2008; Okulicz et al., 2009). Otros autores, definen a este nuevo grupo como aquellos pacientes infectados durante más de 10 años, que presentan determinaciones de carga viral plasmática por debajo de 400 copias/ml sin terapia antirretroviral (Grabar et al., 2009). La prevalencia de este tipo de pacientes entre la población infectada por VIH, es difícil de determinar,

debido a que en ausencia de manifestaciones clínicas el porcentaje de sub diagnósticos es alto en esta población. También existe una pequeña proporción de individuos que se exponen repetidamente al virus y permanecen seronegativos, estos se consideran resistentes a la infección (Yang et al., 2013).

Tanto los progresores lentos o no progresores a largo plazo, los controles élite y los individuos resistentes a la infección, por sus características clínicas, representan un modelo natural de control de la infección por el VIH. Por lo tanto, es crucial comprender los factores virológicos, genéticos e inmunológicos, que puedan estar contribuyendo a la supresión de la replicación viral y/o control de la infección, que presentan este grupo “especial” de individuos.

Generalmente con el paso del tiempo, ya sean 3 años en los progresores rápidos o hasta más de 10 años en los progresores lentos, se produce una gradual y paulatina disminución del número de linfocitos T CD4+. Esta caída conduce a la fase final, **el sida**. En este momento la concentración de linfocitos T CD4+ es muy baja y hay un incremento de la viremia circulante. Es entonces cuando el paciente infectado puede desarrollar las infecciones oportunistas y otras patologías que definen el sida que consecuentemente lo conducen a la muerte.

2.3.3 Respuesta inmune en la infección por VIH-1

Los principales mecanismos implicados en la protección contra el VIH-1 están mediados básicamente por la acción citolítica de los linfocitos T CD8+ y los anticuerpos producidos por las células B. Además hay factores solubles producidos por activación de los linfocitos T CD4+ (LT CD4+) y linfocitos T CD8+

(LT CD8+) que tienen actividad antiviral y que pueden influir en la diferenciación, expansión y duración de la respuesta T (Allen et al., 2000).

La respuesta mediada por las células T CD4+ se ha relacionado con un control más efectivo de la replicación viral tras la infección primaria. Al parecer su función radica en la diferenciación, expansión y selección de las poblaciones linfocitarias, además de ayudar en el mantenimiento y la maduración de los LT CD8+ (Betts et al., 2001).

Con respecto a las células T CD8+, se conoce que son el principal efector de la respuesta inmune adaptada para eliminar las células infectadas por el virus, existe evidencia tanto en modelos animales como en humanos de su importancia en el control de la replicación viral. Los LT CD8+ reconocen a las células infectadas mediante la interacción de los péptidos presentados por dichas células por acción de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA) clase I y el receptor T CD8+. Se ha descrito una clara asociación temporal entre estas células y la disminución de la viremia en la infección aguda (Koup et al., 1994).

Diferentes estudios han aportado evidencias sobre el potencial que tienen las células asesinas (NK) para ayudar a controlar la infección por el VIH-1, tanto por mecanismos citolíticos como no líticos. Entre estos últimos se destaca la capacidad de las β -quimoquinas MIP-1 α , MIP-1 β y RANTES, secretadas por las células NK activadas, para bloquear la infección por los virus que utilizan como correceptor la molécula CCR5, denominados cepas R5 trópicas; en este bloqueo las β -quimoquinas mencionadas inhiben competitivamente la unión de la glicoproteína de envoltura gp120 del VIH-1 al correceptor CCR5 (receptor natural para esas β - quimoquinas). Además estas células han mostrado que intervienen

en el control de la replicación viral, con efectos antivirales directos y con la activación de células dendríticas, y otros componentes de la inmunidad innata (Taborda, et al, 2014).

2.3.4 Terapia antirretroviral contra el VIH

El desarrollo de fármacos con capacidad de inhibir la replicación del VIH y su posterior uso en pacientes infectados, ha logrado alterar la evolución natural de la infección. De esta manera, una enfermedad rápidamente mortal se ha transformado en una afección crónica.

Los fármacos antirretrovirales contra el VIH tiene cuatro objetivos fundamentales:

1. Aumentar la esperanza y la calidad de vida.
2. Evitar la progresión de la enfermedad (reducir carga viral de VIH).
3. Devolver el sistema inmunitario a su estado normal y mantenerlo así durante el mayor tiempo posible (aumentar recuento de linfocitos T CD4+).
4. Minimizar la transmisión del VIH a otras personas.

Como se ilustra en la figura 7 según el mecanismo de acción, actualmente los fármacos antirretrovirales se clasifican en 4 familias 1) inhibidores de la transcriptasa reversa: análogos de nucleósidos (ITRAN) y los inhibidores de la transcriptasa reversa no análogos de nucleósidos (ITRNAN) 2) inhibidores de la proteasa (IP) 3) inhibidores de entrada (IE) y 4) inhibidores de la integrasa (IIN) (Infosida, 2017).

Estos medicamentos se dirigen frente a enzimas o estructuras virales que desempeñan una función clave en el proceso de replicación.

ITRAN ó NRTI (por sus siglas en inglés): Interfieren en el proceso de la transcriptasa inversa insertando dentro de la copia viral del ADN análogos nucleósidos , haciendo que el proceso de replicación fracase y evitando así que el virus se inserte en el núcleo de la célula para poder replicarse.

ITRAN ó NNRTI (por sus siglas en inglés): Interfieren en la misma etapa de los ITRAN, pero utilizando un proceso químico diferente, tienen una estructura química heterogénea. Actúan de un modo no competitivo, a diferencia de los análogos de los nucleósidos, sobre la transcriptasa inversa. Causan una ruptura en el sitio catalizador de la enzima.

IP (Inhibidores de la Proteasa): Bloquean la acción de la enzima proteasa encargada de la fragmentación de las cadenas más largas de proteínas, los IP impiden que dicha fragmentación tenga lugar. Consecuentemente, las proteínas que resultan son copias defectuosas que si bien pueden destruir la célula que infectó, ya no pueden infectar nuevas células.

IE (inhibidores entrada): Este tipo de medicamento interfiere en la entrada del virión VIH a la célula diana, utiliza antagonistas de los correceptores celulares y las glicoproteínas de superficie del virus para evitar que la infección se lleve a cabo.

IIN (Inhibidores de Integrasa): Estos medicamentos bloquean la acción de la enzima integrasa encargada de inserción del ADNc del VIH en la célula hospedera, evitando que el material genético del virus quede integrado en el genoma celular.

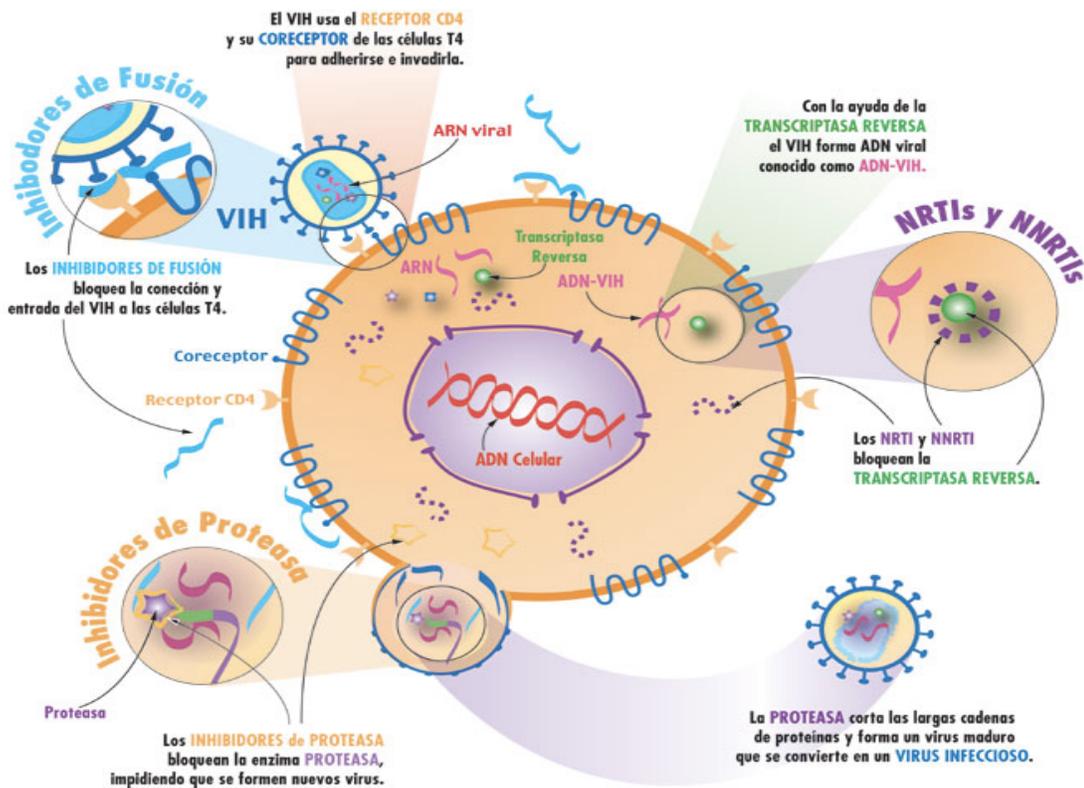


Figura 7. Clasificación de los fármacos antirretrovirales utilizados en el TARGA.

Tomada de: <http://www.infosida.es/que-es-el-tratamiento-arv>

El Tratamiento Antirretroviral de Gran Actividad (TARGA) se basa en combinaciones de varios fármacos antirretrovirales; por norma general suele tratarse de 3 fármacos de cómo mínimo dos familias diferentes.

El esquema actual de terapia antirretroviral recomendado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y adoptado por la Secretaría de Salud de Honduras se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Esquema de tratamiento antirretroviral en adultos recomendado por la OMS, 2013.

| Tratamiento antirretroviral | Primera línea | Segunda línea |
|-----------------------------|---------------|---------------|
|-----------------------------|---------------|---------------|

| | | |
|------------------------------|----------------------|-----------------------|
| Esquema preferente | TDF+3TC(o FTC)+EFV | AZT+3TC+LPV/r |
| | ABC+3TC+LPV/r | AZT+3TC+ATV/r |
| Esquemas alternativos | AZT+3TC+EFV (o NVP) | TDF+3TC (o FTC)+ATV/r |
| | TDF+3TC (o FTC)+ NVP | TDF+3TC (o FTC)+LPV/r |

Fuente: Organización Mundial de la Salud. Directrices sobre el uso de medicamentos antirretrovirales para el tratamiento y la prevención de la infección por el VIH. Ginebra: Organización Mundial de la Salud. 2013. Notas: ABC: abacavir; TDF: tenofovir; 3TC: lamivudina; FTC: emtricitabina; EFV: efavirenz; AZT: zidovudina; LPV/r: lopinarivir/ ritonavir; ATV/r: atazanavir/ritonavir.

2.4 PARÁMETROS CLÍNICOS QUE DETERMINAN LA PROGRESIÓN DE LA INFECCIÓN POR VIH

2.4.1 Infecciones oportunistas

Clínicamente se considera que un paciente es un posible caso sida cuando tiene alguna de las afecciones relacionadas en la fisiopatología, el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC), en Atlanta, EE.UU, ha elaborado una lista con más de 24 enfermedades clasificadas como infecciones oportunistas (CDC, 1993).

En América Latina las enfermedades más frecuentes asociadas al VIH que conforman el sida son: la tuberculosis causada por *Mycobacterium tuberculosis* y el complejo de *Mycobacterium avium*. Según ONUSIDA las muertes relacionadas con la tuberculosis entre quienes viven con el VIH han descendido en un 32% desde el año 2004, pero aun así la tuberculosis sigue siendo la principal causa de muertes entre quienes viven con el VIH; lo que supone una de cada tres muertes relacionadas con el sida. En 2014, el porcentaje de pacientes con tuberculosis

identificados como seropositivos que iniciaron o continuaron el tratamiento antirretroviral llegó al 77% (ONUSIDA, 2015a).

Además, la neumonía por *Pneumocystis carinii*, candidiasis, infecciones por Citomegalovirus, Herpes y ciertos tipos de cáncer son también parte de la carga de enfermedad más frecuente en los pacientes infectados con el VIH y dentro las afecciones con compromiso neurológico se pueden mencionar la encefalitis por *Toxoplasma gondii* y meningitis por *Cryptococcus neoformans*.

Suele ser frecuente que un enfermo en esta fase padezca varias afecciones indicadoras del sida. Actualmente, además de las enfermedades indicadoras de sida, también se ha incluido para el informe de caso sida a pacientes con recuento de células CD4+ <200 por mm³, con independencia del estado clínico en que se encuentren. Esto se conoce como sida inmunológico (ONUSIDA, 2011). También se puede clasificar la infección por VIH desde el punto de vista clínico en las 3 fases siguientes:

Fase precoz o aguda: El VIH se disemina e invade muchos tejidos, especialmente el sistema linfático. El paciente infectado puede no presentar sintomatología.

Fase intermedia o crónica: En esta fase persiste la proliferación viral, aunque a bajo nivel. Los pacientes suelen ser asintomáticos, con adenopatías o sin ellas, recuento bajo de plaquetas y mínimos trastornos neurológicos.

Fase final o de crisis: coincide con una profunda alteración del estado general del paciente, aparición de graves infecciones oportunistas, alteraciones

neurológicas y ciertas neoplasias. Es el momento en el que se considera que el infectado con el VIH tiene sida (InfoSIDA, 2015).

2.4.2 Determinación de carga viral de VIH

La carga viral es el término empleado para referirse a la cantidad de viriones de VIH que un individuo infectado tiene en circulación. Las pruebas de carga viral miden la cantidad de material genético del VIH en sangre. Los resultados de una prueba de carga viral se expresan como términos absolutos (número de copias de ARN del VIH en un mililitro de sangre) y logarítmicos. Los logaritmos son medidas exponenciales que sirven para comprender la evolución (si el VIH avanza o se suprime) del virus. La metodología empleada es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en tiempo real (ONUSIDA, 2017).

El objetivo del tratamiento antirretroviral es mantener la carga viral indetectable. En general, se considera que una carga viral es indetectable cuando se sitúa por debajo de las 50 copias/mL; no obstante, en la actualidad, el significado de “indetectable” depende del método de análisis empleado en cada hospital, y puede ser inferior a 20, 37 o 50 copias por mililitro. Por tanto, aunque no se detecten copias del virus en la prueba, puede haber pequeñas cantidades de virus en la sangre de los pacientes con carga viral “indetectable”.

Además, es necesario recordar que el análisis de carga viral solo mide la cantidad de virus en la sangre, y no la cantidad de VIH en otros órganos del cuerpo como los ganglios linfáticos, fluidos genitales, el bazo o cerebro. Cuando los niveles de VIH disminuyen en la sangre, también lo hacen el tejido linfático y en los fluidos

genitales como el semen, pero no al mismo tiempo ni en la misma proporción (infosida, 2017).

La determinación de la carga viral forma parte de las pruebas rutinarias en el seguimiento clínico de las personas con el VIH y sirve para valorar la respuesta al tratamiento antirretroviral y la progresión de la infección en un individuo. Se consideran que una carga viral de 500 o menos copias de ARN del VIH por ml es baja, mientras que una carga viral de 40,000 o más de copias de ARN del VIH por ml se considera alta.

2.4.3 Recuento de linfocitos T CD4+

Los linfocitos T CD4+ son un tipo de células que constituyen una parte esencial del sistema inmunitario. Su función principal es la de activar al propio sistema inmune alertándole de la presencia de patógenos o de una replicación errónea de células humanas. Además son las células blanco en la infección por VIH, por lo que la principal consecuencia de la replicación persistente del virus es la reducción gradual del número de linfocitos T CD4+, lo que eventualmente conduce a la pérdida de la competencia inmunológica (Noda-Albelo et al., 2013).

La determinación en el laboratorio del número de linfocitos T CD4+ se realiza mediante la utilización de la citometría de flujo y es un parámetro indispensable en la atención médica a los pacientes infectados con VIH, se emplea para estadificar la infección y como para evaluar la progresión a enfermedad. Cierta nivel de células CD4+ sirve como referencia para iniciar profilaxis contra infecciones oportunistas y/o para iniciar tratamiento antirretroviral.

El conteo de células CD4+ es también un indicador de respuesta al tratamiento antirretroviral. Se considera una adecuada respuesta a la terapia antirretroviral a un incremento en el conteo absoluto de células CD4+ en un rango de 50 a 150 cel./ μ L por año, con una respuesta acelerada en los primeros 3 meses. Incrementos subsecuentes en pacientes con adecuado control virológico muestran un incremento en 50 a 100 cel./ μ L por año hasta que se alcanza la estabilización.

Por lo general, una persona no infectada con VIH tiene un recuento de entre 500 y 1600 cel./ μ L. Durante la progresión de la enfermedad, el número de células CD4+ se ve cada vez más reducido, pudiendo llegar a niveles inferiores a 500 cel./ μ L si no se aplica tratamiento antirretroviral. El umbral crítico de CD4 está fijado en las 200 cel./ μ L: por debajo de esta cantidad, se considera que existe un riesgo serio de sufrir infecciones oportunistas y otras enfermedades; por encima de ese valor, ese riesgo se reduce o incluso puede llegar a desaparecer.

Además del número de células también se considera el porcentaje de linfocitos T CD4+ en relación con el número total de leucocitos como indicador de progresión, tener un porcentaje de células CD4 en torno al 14% es un indicador del mismo nivel de riesgo de enfermar que un recuento de CD4+ de 200 cel./ μ L (Infosida, 2017).

2.5 FACTORES IMPLICADOS EN LA PROGRESIÓN A SIDA

El curso de la infección con el VIH muestra una amplia variabilidad en cuanto a la progresión de la enfermedad entre los individuos. Es por esa razón que las recientes líneas de investigación se han dedicado a estudiar qué factores o condiciones presentan estos pacientes, tanto para progresar a sida en poco

tiempo o para mantenerse con la infección sin daño aparente por más de 10 o 15 años o hasta para resistir la infección por VIH (Casado et al, 2010).

Numerosos estudios han demostrado que no se trata de un solo factor sino que la velocidad de progresión a enfermedad en un individuo depende de varios factores entre ellos: los factores virológicos (aquellos que son propios de la cepa viral) (Sandónis et al., 2009) (Kouri V, et al, 2015). Ya se había mencionado que el VIH-1, debido a su condición de retrovirus, necesita de una enzima para transcribir su genoma (transcriptasa reversa), la cual tiene una tasa de error muy alta, lo que hace que el virus presente una gran cantidad de mutaciones haciéndolo extremadamente variable (Mwimanzi et al. 2013). En algunas ocasiones estas mutaciones le confieren mayor virulencia o resistencia a la TARGA, en cambio en otras ocasiones el virus se ve perjudicado ya que se limita su infectividad, o su propiedad de replicación haciéndolo menos virulento y por ende el individuo puede controlar la infección (Lum et al., 2003).

Además también existen los factores propios del hospedero los cuales pueden ser genéticos o inmunológicos (Lama & Planelles, 2007); estos son aquellos con los cuales se nace y es la combinación de los alelos la que determina que algunos individuos tengan mayor susceptibilidad o resistencia a determinados agentes infecciosos. En el caso del VIH, estos determinantes genéticos pueden estar involucrados en el desarrollo de una progresión rápida o lenta a sida, o incluso en la resistencia a la infección, además de la posibilidad de adquirir o tener protección a determinadas infecciones oportunistas o algunos tipos de cáncer. A continuación se mencionan algunos ejemplos de estos factores.

2.5.1 Factores virológicos

La progresión lenta o rápida a la enfermedad en los pacientes infectados con VIH puede estar mediada por la cepa de virus que esté causando la infección. La enorme variabilidad del virus hace que existan miles de variantes aun dentro del mismo organismo (persona infectada). En el afán de aumentar la replicación, la transcriptasa reversa, cuya tasa de error es muy alta, provoca muchas mutaciones que hacen que el virus adquiera o pierda propiedades importantes.

En el caso de los progresores lentos, diversos estudios han sugerido que estos grupos de pacientes pueden estar infectados con virus defectuosos o atenuados que facilitarían el control de la replicación viral. Las cepas con mutaciones que limitan la actividad o inactivan el gen *nef* han mostrado ser menos virulentas y prolongar el periodo de latencia ya que el hospedero puede controlar la infección debido a que el virus no es capaz de replicarse correctamente y ser infectivo en relación a un virus silvestre (Calugi et al., 2006; Sardonís et al., 2009).

Algunos estudios han descrito que mutaciones o deleciones en genes accesorios (*rev*, *tat*, *vif*, *vpr* y *vpu*), pueden afectar la virulencia de la cepa viral, causando menor daño al portador y por ende se es capaz de controlar la infección y se mantiene asintomático por largo tiempo (Lum et al., 2003; Piguet et al., 2000).

Además existen cepas cuyas mutaciones les confieren un factor de virulencia superior (Casado et al., 2005), haciéndolas tan agresivas que en un par de años se ve comprometido el sistema inmune del paciente. La mayoría de los reportes coinciden en que estas cepas se caracterizan por presentar en los hospederos

altas tasas de replicación; por ende altas cargas virales y bajos recuentos de linfocitos T CD4+ poco tiempo después de la infección.

Uno de los más recientes reportes es sobre la forma recombinante circulante (CRF) supervirulenta de Cuba denominada CRF19_cpx. Los análisis sugieren que los ancestros de esta nueva variante son un intersubtipo AG de Camerún y el subtipo D de Gabón (Powell et al., 2007), y se ha reportado su fuerte asociación con rápida progresión a enfermedad, produciendo sida en un lapso de 3 años después de la seroconversión. El estudio de *Casado y colaboradores* muestra asociaciones robustas y significativas con la presencia de infecciones oportunistas, altos niveles de carga viral, mayor actividad de la proteasa, y uso del co-receptor CXCR4, que sugieren que CRF19_cpx puede ser un virus más patógeno.

Sin embargo, estos hallazgos son controversiales debido a que otros estudios sugieren que algunos supresores élite están infectados con virus patogénicos y aun así se mantienen sin desarrollar enfermedad (Bailey et al., 2007; Blankson et al., 2007). Por ejemplo en otro estudio se documenta la superinfección de un supresor élite con otro aislamiento de VIH-1 y se demostró que mientras este paciente mantenía un control relativo de la carga viral plasmática, otros dos pacientes infectados con el mismo aislamiento viral, presentaban altas cargas virales (Rachinger et al., 2008). Esto indica que aún las cepas muy virulentas pueden ser controladas si el hospedero cuenta con las herramientas genéticas necesarias para limitar la infección.

En general la extrema variabilidad genética del VIH no sólo es un evento que concierne a mutaciones aleatorias sino que es una estrategia del virus que le

permite ser capaz de evadir la respuesta inmunológica durante el transcurso de la infección en un individuo, principalmente a nivel del antígeno de leucocito humano (HLA) y el receptor del linfocito T (TCR); es decir durante la unión del péptido viral antigénico al HLA y el reconocimiento subsiguiente al receptor de células T (TCR). Por lo cual el sistema HLA juega un papel determinante ya que la unión del péptido a las moléculas HLA es el primer paso para iniciar la respuesta inmune específica, esta unión es crítica y depende de la afinidad del péptido al sitio de unión.

2.5.2 Factores genéticos del hospedero

Los principales factores inmunogenéticos relacionados con la susceptibilidad a la infección por el VIH-1 y la progresión a sida están relacionados con 3 familias de genes del hospedero: 1. Polimorfismos genéticos que afectan la capacidad de entrada del virus al interior de las células como es el caso de los receptores de quimiocinas y 2. sus ligandos; 3. antígenos leucocitarios humanos HLA clase I y II responsables de la presentación de antígenos y de regular la respuesta inmune específica de la infección en el hospedero (Peterson et al., 2013; Sobieszczyk et al., 2011).

2.5.2.1 Receptores de quimiocinas y sus ligandos

Los receptores de quimiocinas son proteínas de membrana celular, que se encuentran en los leucocitos y otras células de los vertebrado cuya función fisiológica es actuar como sitio de unión a las citocinas quimiotácticas o quimocinas llamadas así por su capacidad de activar y atraer diversas familias de leucocitos hacia los sitios donde se necesitan. Además son de gran importancia en

múltiples procesos fisiológicos y patológicos como: desarrollo de la respuesta inmune, embriogénesis, inflamación, y desarrollo del cáncer y metástasis. (Comerford I, & McColl R, 2011).

Los receptores de quimiocinas están acoplados a receptores de proteínas G con siete dominios transmembrana que se encuentran en la superficie de los leucocitos. Se han descubierto diecinueve receptores de quimiocina distintos, que se dividen en cuatro familias dependiendo del tipo de quimiocina al que se unen; los receptores CXCR se unen a quimiocinas CXC, los receptores CCR se unen a quimiocinas CC, los CX3CR1 se unen a la única quimiocina CX3C (CX3CL1), y el receptor XCR1 se une a las dos quimiocinas XC (XCL1 y XCL2) (Lolis E, & Murphy J, 2007).

Los principalmente receptores de quimiocinas utilizados por el VIH como coreceptores para su entrada en la célula hospedera son: CCR5 y CXCR4. Existen determinadas mutaciones en dichos receptores que afectan la susceptibilidad de linfocitos y macrófagos a la infección por el VIH y pueden afectar la velocidad de progresión de la infección.

Mutación CCR2-64I. Esta alteración es producida por una variante alélica del coreceptor CCR2 y ocurre por la sustitución de una Valina por una Isoleucina (V-I) en la posición 64 de dicha molécula, lo cual se ha asociado con una evolución lenta a sida. No está muy claro cómo esta mutación retrasa la progresión de la infección, puesto que la Valina y la Isoleucina son aminoácidos similares que tienen las mismas características funcionales y químicas, pero se cree que esta mutación puede influenciar indirectamente la afinidad de CCR5 por la gp120 del

VIIH-1, debido a que puede presentarse ligada a una mutación en la región reguladora de CCR5 (Louisirirotchanakul et al., 2002; Smith et al., 1997).

Mutaciones en los ligandos. Mutación en el factor derivado de las células estromales 1 (SDF1-3A). El SDF-1 es la quimiocina que actúa como el ligando natural de CXCR4; es producida por células del estroma de la médula ósea, órganos linfáticos y diversas células de diferentes tejidos, con la excepción de los leucocitos. Hasta el momento, se ha descrito una mutación en el gen que codifica esta quimiocina, que involucra el cambio de una guanina por una adenina (G-A) en la posición 801 de la región no traducida 3'.

Cuando esta mutación se presenta de forma homocigota, se asocia con una evolución lenta de la enfermedad, debido a que dicha mutación induce la producción de grandes cantidades de SDF-1, que estaría limitando la disponibilidad de CXCR4 y, por consiguiente, la infección por el VIIH-1, específicamente por las cepas virales X4 (Soriano et al., 2002).

2.6 DELECIÓN DE 32 PARES DE BASES EN EL CORRECEPTOR CCR5 (CCR5 Δ 32)

El receptor CCR5 se expresa en la superficie de células del sistema inmune. El gen que lo codifica se localiza en el cromosoma 3 (región p21.3) y contiene un único exón (Samson M. et al., 1996). Su estructura se compone de 7 dominios transmembrana, 3 bucles extracelulares y 4 intracelulares, un dominio N-terminal extracelular y un dominio C-terminal intracelular, cuando un ligando se une a CCR5, el receptor lleva a cabo un cambio conformacional que activa la proteína G que se encuentra ligada a los dominios intracelulares del receptor.

Muchas células del sistema inmune pueden expresar el receptor CCR5 entre ellas: linfocitos T, células asesinas (NK), células de Langerhans, monocitos, macrófagos, células dendríticas inmaduras y basófilos. Cuando las quimiocinas se unen al CCR5 de estas células efectoras inmunes o células presentadoras de antígenos, se activan y se induce su migración con el objetivo de crear una respuesta frente a agentes extraños. De las células que expresan CCR5 tan solo aquellas que además expresan el receptor CD4 son potencialmente susceptibles de sufrir infección por el VIH.

Después de innumerables trabajos de investigación a mediados de los años noventa se profundizó en la explicación del ciclo de replicación del VIH y se descubrió que el CCR5 juega un papel importante como correceptor del VIH y junto al CD4 es responsable en la entrada y fusión del virus a la célula.

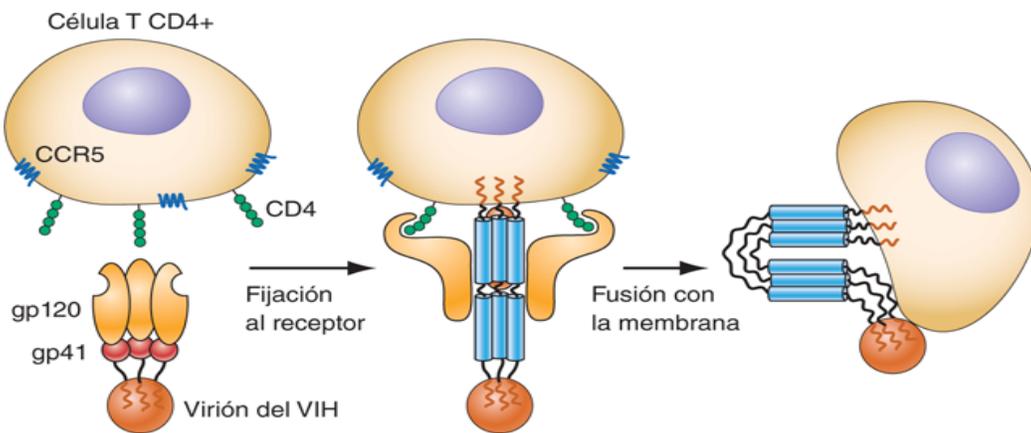


Figura 8. Rol del CCR5 como correceptor en la entrada y fusión del VIH a la célula.

Tomada de: Dennis L. Kasper, Anthony S. Fauci, Stephen L. Hauser et. al. Principios de Medicina Interna, 19 e: www.accessmedica.com

Como se ilustra en la figura 8, el ingreso del virión a la célula está mediado por la

interacción específica de la gp120 con el receptor CD4 presente en los linfocitos T, la unión virión-célula lleva al proceso de fusión de las membranas, que es facilitado por la glicoproteína de envoltura gp41 y los correceptores de los linfocitos y monocitos, CCR5 principalmente. Esta unión desencadena cambios conformacionales sobre la membrana de la célula, dando lugar a la entrada del genoma viral al citoplasma celular.

Es indiscutible la gran relevancia que tiene los correceptores en el ciclo de infección del VIH ya que sin la presencia de estos; este proceso no podría llevarse a cabo, lo cual explica que el CCR5 se convirtiera en objetivo de investigación y posible blanco en la prevención y tratamiento de la infección por VIH.

Una de las mutaciones más conocidas identificada en 1996 es la delección de 32 pares de bases en el gen que codifica para el correceptor CCR5 denominada CCR5-Δ32. Esta delección tiene un efecto dominante que introduce prematuramente un codón de parada en el gen del CCR5 que hace que se sintetice como producto final una proteína incompleta, no funcional, que queda atrapada en el retículo endoplásmico, por lo que este correceptor no se expresa en la superficie de la célula (Dean M, 1996, Michael NL, 1997). Como consecuencia, esto provoca la incapacidad del virus para anclarse al correceptor CCR5 y su entrada en la célula.

Por lo que esta mutación confiere una mayor protección contra el VIH a los individuos que la portan, y a su vez hace que los individuos infectados progresen más lentamente a sida que las personas con el correceptor CCR5 normal. Por esta razón se asoció con la resistencia a la infección por VIH (cepas X5) cuando estaba presente en homocigosis (Liu et al., 1996) aunque la homocigosis para la

CCR5 Δ 32 es un factor de protección contra la infección por el virus, esta protección no es absoluta y se han descrito individuos homocigotos infectados. En estos casos, la infección generalmente es producida por cepas de virus X4, que utilizarían el correceptor CXCR4 (Ballana et al, 2012). Además esta mutación se ha asociado con una reducción en la velocidad de progresión a enfermedad cuando se encuentra presente en heterocigosis (Marmor et al., 2001). Esto se explica porque los individuos heterocigotos disminuyen el número de correceptores en la superficie celular disponibles para la entrada del virus limitando la infección debido a que es más difícil que los nuevos viriones de VIH infecten las células blanco.

Este alelo se encuentra distribuido de manera heterogénea en la población y su frecuencia esta muy relacionada al origen étnico, se ha reportado en alta frecuencia en caucásicos hasta 20% en europeos, pero es raro en los africanos y los asiáticos; por lo que se cree que fue en población del norte de Europa donde surgió como resultado de la fuerte selección positiva, tal vez por agentes selectivos como la peste bubónica o la viruela durante la Edad Media, sin embargo, hay estudios que utilizando mapas genéticos estiman que es probable que el polimorfismo CCR5 Δ 32 haya surgido hace más de 5.000 años (Sabeti et al, 2005).

Aunque los estudios son limitados en población hispanoamericana en países como México, Brasil, Argentina, y Costa Rica se han reportado frecuencias de oscilan del 4-15% en heterocigosis y hasta 2.5 % en homocigosis (Valadez-González, 2011) (Motta et al, 2000).

Además de su asociación con la infección de VIH este polimorfismo es conocido por estar asociado con susceptibilidad a otras enfermedades infecciosas e inflamatorias, tales como osteomielitis, pre eclampsia, lupus eritematoso sistémico, artritis idiopática juvenil entre otras (Silva Carvalho, 2016).

También se han descrito diferentes polimorfismos en la región promotora de CCR5, que conducen a una menor expresión de este correceptor en la superficie de los macrófagos y se ha asociado con una progresión más lenta de la enfermedad en portadores del VIH-1. (McDermott et al., 1998).

2.7 COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD

Los genes del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) son denominados así por ser el sistema genético con mayor responsabilidad en el rechazo o aceptación de los trasplantes. Este sistema génico fue descubierto en 1945 cuando Jean Dausett observó que algunos sueros de pacientes tratados con transfusiones de origen diverso, contenían anticuerpos contra los glóbulos blancos, lo que determinó que se les llamara antígenos leucocitarios humanos (HLA), pero fue hasta 1967 a través de otras investigaciones que se estableció en forma definitiva la naturaleza del HLA (Hersh and Harris, 1968).

2.7.1 Organización genómica y función del sistema HLA

El sistema HLA es un complejo de genes estrechamente ligados, localizados en una extensión de 3,6 Mbps (3,600,000 pares de bases) en el brazo corto del cromosoma 6 (6p21.31> 6p21.33). Contiene 140 genes flanqueados por los marcadores genéticos MOG y COL11A2 (Abbas Abul K, 2012). Esta región se

caracteriza por tener alta densidad genética, alto grado de polimorfismo y desequilibrio de ligamiento (Consortium, 1999).

El sistema HLA se encuentra dividido en tres regiones, cada una de las cuales codifica para moléculas distintas en cuanto a distribución celular, estructura química y función. Como se observa en la figura 9. Esquema del Complejo Mayor de Histocompatibilidad, las moléculas de HLA-I se subdivide en seis loci: HLA-A, B y C son denominados "clásicos"; cuya función consiste en la presentación de antígenos a los linfocitos T CD8+. En cambio los loci HLA-E, F y G son denominados "no clásicos" y presentan funciones especializadas, no presentan antígenos a los linfocitos T, sino que se unen a receptores inhibidores de las células asesinas NK (del inglés natural killer). Todos estos loci codifican la cadena α de las moléculas HLA que se expresan en la superficie de todas las células nucleadas del organismo y llevan unidos péptidos endógenos que pueden ser propios o derivados de microorganismos (Mingari et al., 1996).

Las moléculas HLA-II se encuentran divididas en "clásicas", que presentan péptidos a los linfocitos T CD4; dentro de este grupo se encuentran: HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR; las "no clásicas", accesorias, con funciones intracelulares (no están expuestas en la membrana celular sino en membranas internas, de los lisosomas); normalmente, cargan los péptidos antigénicos sobre las moléculas HLA-II clásicas; en este grupo se incluyen HLA-DM y HLA-DO (Brown et al., 1993).

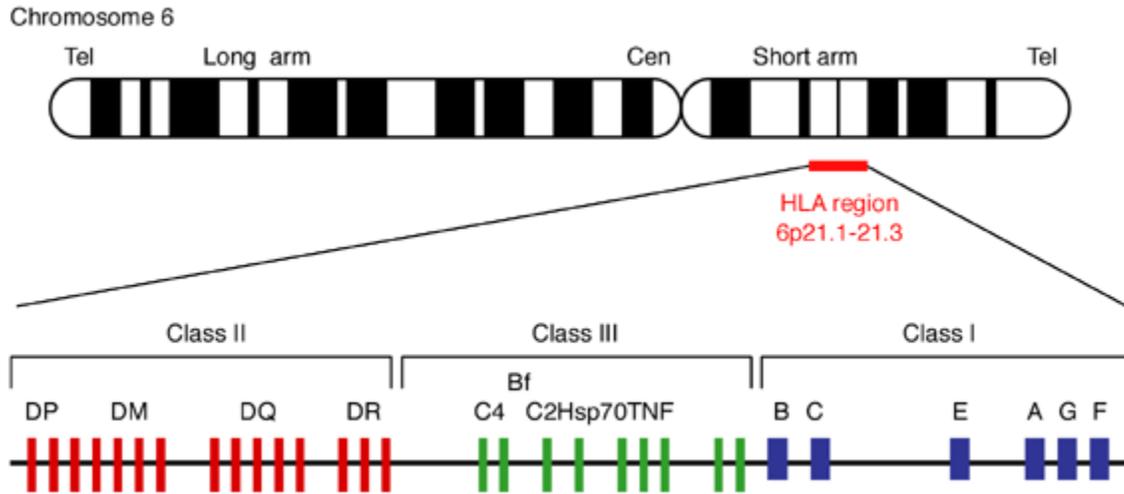


Figura 9. Mapa genético del Sistema HLA.

Tomado de: Expert Reviews in Molecular Medicine©2003 Cambridge University Press

Las moléculas HLA Clase-II se expresan en la superficie de las células presentadoras de antígeno, como los linfocitos B, monocitos, macrófagos, células dendríticas, células de Langerhans y linfocitos T activados, y llevan unidos péptidos derivados de proteínas exógenas y las presentan a los linfocitos T CD4+.

La Clase-III, aunque tiene una función completamente diferente a las clases I y II, se estudian en conjunto ya que se sitúan en el mismo espacio genético. Contiene genes que codifican varias proteínas secretadas que desempeñan funciones inmunitarias: componentes del sistema del complemento (como C2, C4 y factor B) y moléculas relacionadas con la inflamación (citoquinas como TNF- α , LTA, LTB) y las proteínas de choque térmico (HPS) (Carroll et al., 1985).

2.7.2 Estructura y denominación del sistema HLA Clase I

La molécula funcional del CMH clase I está compuesta por una cadena pesada que se denomina α , la cual presenta tres dominios extracelulares denominados

$\alpha 1$, $\alpha 2$ donde se encuentra el sitio de unión, el cual puede unirse a un fragmento de un péptido extraño de entre 8 y 10 aminoácidos. Como esta hendidura es demasiado pequeña para albergar una proteína globular intacta, es necesario que la proteína sea procesada para dar lugar a fragmentos más pequeños que se unan a las moléculas HLA clase I y puedan ser presentadas a los linfocitos T (Klein and Sato, 2000). El dominio $\alpha 3$ es un segmento transmembranal que posee una porción intracitoplasmática que tiene un C-terminal. La cadena α se une de manera no-covalente a una cadena de $\beta 2$ microglobulina, que es codificada fuera del sistema HLA (Klein and Sato, 2000) como se ilustra en la figura 10. Estructural funcional de las moléculas HLA Clase I.

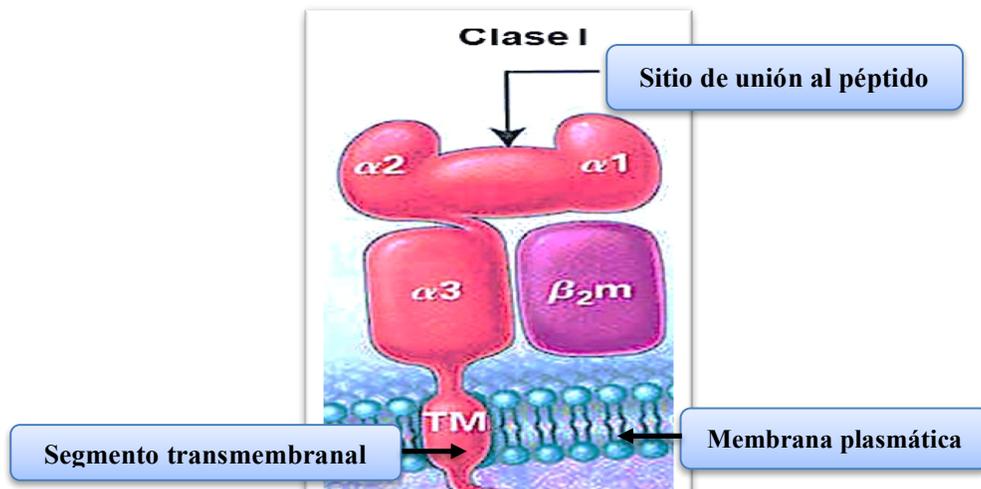


Figura 10. Estructura funcional de las moléculas HLA Clase I.

Adaptada de: <http://bloggenetica1b12.blogspot.com/>

2.7.3 Características del sistema HLA Clase I

Dentro de las características del sistema HLA podemos mencionar:

1. Es poligénico; está constituido por varios genes clasificados en tres regiones.
2. Alto grado de polimorfismo; existen múltiples alelos para cada locus. Los distintos alelos difieren entre sí en la habilidad para unir y presentar con mayor eficacia diferentes antígenos proteicos. Cada individuo puede tener dos alelos diferentes para cada gen, y la mayor parte de los individuos de una población son heterocigotos para cada gen de este sistema.
3. Presenta desequilibrio de ligamiento, es decir, diferentes alelos de distintos genes se encuentran en el mismo cromosoma con una frecuencia mayor a la teóricamente esperada en una combinación al azar, por lo que se heredan en haplotipos (Casado et al, 2010).

Como ya se mencionó, una de las características inherentes del sistema HLA es su enorme variabilidad, debido al gran polimorfismo genético que posee, se le atribuye ser el sistema genético más polimórfico en los humanos. Siendo así que hasta la fecha la base de datos del proyecto internacional InMunoGeneTics (IMGT) que incluye las secuencias de alelos oficiales nombradas por el Comité de Nomenclatura de Alelos del sistema HLA de la OMS reporta 12,544 alelos de Clase I, 3,968 alelos del locus A, 4,828 alelos del locus B y 3,579 para el C. (IMGT/HLA, 2017). En la figura 11. Puede verse como se ha incrementado el número de alelos HLA reportados en los últimos treinta años.

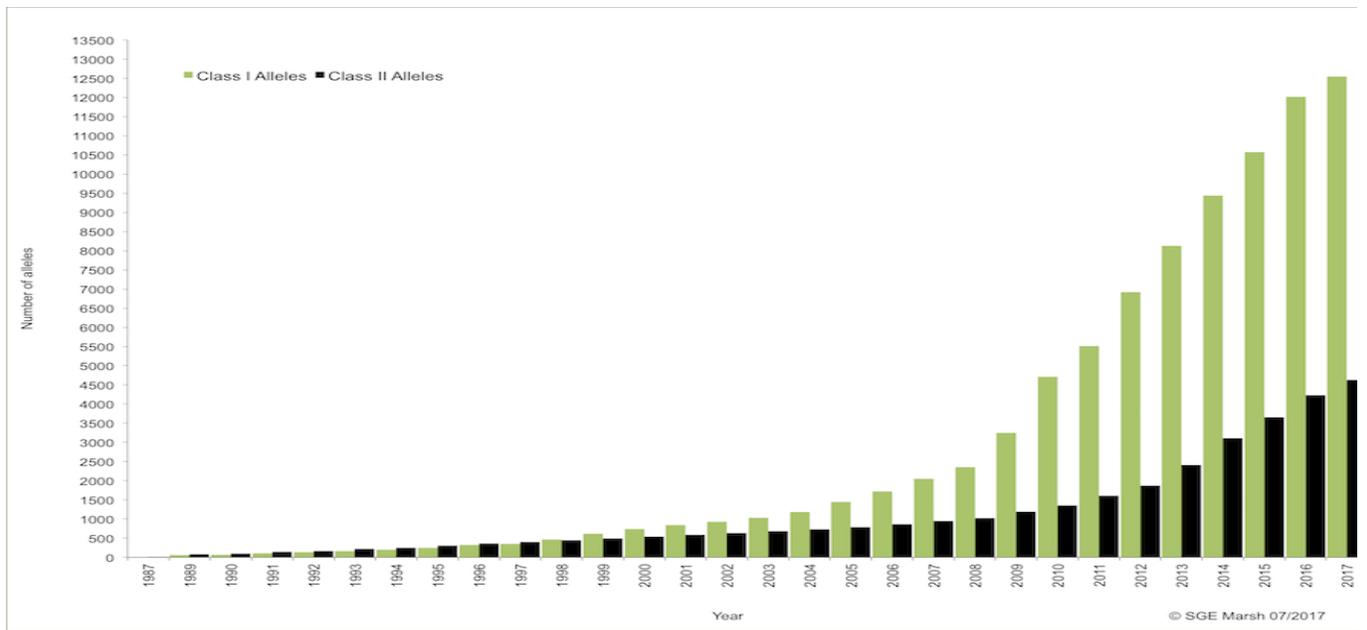


Figura 11. Número de alelos HLA reportados en los últimos treinta años.

Fuente: IMGT/HLA, 2017

Los genes del sistema HLA se heredan de manera co-dominante, con un patrón de segregación mendeliano, es decir cada individuo hereda un grupo de alelos de la madre y otro del padre, esta recombinación de alelos aumenta la variabilidad y hace que su frecuencia sea distinta entre las poblaciones humanas y genera una gran heterocigocidad (Abbas Abul K, 2012); esto parece ser un elemento importante en la unión al péptido y en el curso de la infección por VIH y en la progresión a sida.

Todas estas propiedades hacen que el MHC sea uno de los sistemas genéticos más complejos y con gran significado clínico que poseemos. Siendo así que hoy en día la tipificación de los alelos HLA es de suma utilidad para estudios de:

1. Evolución molecular
2. Trasplante de órganos y tejidos

3. Asociación con enfermedades autoinmunes y enfermedades infecciosas
4. Antropología molecular
5. Farmacogenética y farmacogenómica

2.7.4 Alelos HLA implicados en la progresión o protección en el desarrollo de sida en individuos portadores del VIH-1

La respuesta inmune celular específica contra el VIH-1 está condicionada por los alelos del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) del individuo. Varios estudios han sugerido que alelos específicos en los loci HLA estarían asociados con diferentes tasas de progresión de enfermedad en individuos portadores del VIH-1 (Gao et al., 2010; Payne et al., 2013). Esto podría explicarse por la diferente habilidad de los distintos alelos para presentar de forma eficiente los epítomos virales.

Los estudios que señalan una asociación entre el avance de la infección por el VIH-1 y la expresión de ciertos alelos del HLA se han centrado en la premisa de la homocigocidad/heterocigocidad. En el caso del HLA-I se pueden expresar de tres a seis moléculas diferentes, de ser homocigoto o heterocigoto, respectivamente, que serán las encargadas de hacer la presentación antigénica a los linfocitos T citotóxicos (LTC). Mientras más heterocigoto sea el individuo, mayor cantidad de variantes virales podrá presentar, desarrollando una respuesta efectiva contra el VIH-1 y por ende limitando el desarrollo de la infección, y manteniéndose asintomático por períodos más prolongados de tiempo que aquellos que son homocigotos y tienen una capacidad limitada de presentar variedad de antígenos.

Además este hecho es probablemente debido a: 1) la naturaleza de los péptidos presentados por estas moléculas, 2) al efecto de las mutaciones de escape en estos epítomos sobre la eficacia viral y 3) a la fuerza y naturaleza de la respuesta específica de los LTC contra estos péptidos (Rugeles et al., 2012).

De los tres loci denominados clásicos del CMH-Clase I, se ha demostrado que el HLA-B tiene un papel dominante en la respuesta de los LTC contra el VIH-1, comparado con los otros dos loci; estas diferencias se pueden explicar parcialmente por el mayor polimorfismo que exhiben estos alelos en la población, además sumado al hecho de que las respuestas generadas son de mayor magnitud en comparación con las que ocurren en el contexto de HLA- A y C.

Uno de los alelos más estudiado ha sido el HLA-B*27 el cual ha mostrado una fuerte asociación como factor protector de la enfermedad, en varias cohortes se ha encontrado sobre expresado en los pacientes controladores elite y por lo tanto se asoció con el control de la replicación viral y a la lenta progresión a sida (Naruto et al., 2012) (Peterson et al., 2013; Schneidewind et al., 2007). Se cree que los pacientes infectados por el VIH que poseen el alelo HLA-B*27 son capaces de controlar mejor el virus debido a su fuerte respuesta inmune.

Los estudios demuestran que los pacientes con HLA-B*27 mantienen los valores de los linfocitos T CD4+ estables durante años y presentan altos niveles de linfocitos T CD8+ específicos durante la fase asintomática del VIH. Además se conoce que el VIH puede escapar de la presión selectiva de los LTC, pero en el caso de los pacientes con HLA-B*27 poseen LTC específicamente seleccionados para el epítomo p24 del gen *gag* (Gag p24), el cual no suele mutar con facilidad y se considera que es una proteína conservadora del VIH. Por lo que cuando una

variante mutada sobrevive, los LTC específicos de antígenos B*27 siguen reconociendo este epítipo mutado (Rodríguez-Silva et al., 2016).

En un estudio realizado en Argentina se observó que el alelo HLA-B*27 estuvo significativamente disminuido en los pacientes con sida comparados con los pacientes VIH-1 positivo asintomáticos, con frecuencia de 2.9% y 25% respectivamente (de Sorrentino et al., 2000).

Por el contrario, en investigaciones realizadas en otras poblaciones no parece cumplirse esta relación entre el alelo HLA-B*27 con la lenta progresión a enfermedad (Bello G. et al., 2005; Pereyra F et al., 2008) e incluso un estudio mostró una asociación del alelo HLA-B*27 con la rápida progresión de la enfermedad entre los afroamericanos estudiados (Uyl et al., 2004). Estos datos resaltan la importancia del origen étnico sobre la progresión del VIH-1 que ya ha sido mencionada en otros factores genéticos como el CCR5 Δ 32. El alelo HLA-B*27 se considera de distribución universal, está presente en el 1.4-8% de los ciudadanos de los principales continentes, pero este porcentaje es mayor (8-20%) en los caucásicos, dependiendo de su distribución geográfica, presentando una mayor prevalencia en las zonas del norte de Europa (IMGT/HLA, 2017).

Otro alelo que también ha sido asociado como un alelo protector es el HLA*B57, en estudios de cohortes de sujetos VIH positivo clasificados como no progresores a largo plazo se ha encontrado que poseen este alelo entre 8-63%, siendo el porcentaje más alto en los controladores élite. Estas frecuencias alélicas tienen diferencia estadísticamente significativas al compararlas con las de los sujetos en los que la enfermedad evoluciona a sida que van de 2 al 24% (Naruto et al., 2012;

Paynea et al., 2013). En España se ha asociado fuertemente como un alelo protector, y se ha relacionado con el síndrome de hipersensibilidad al abacavir una droga que se utiliza como primera línea en la TARGA (Mallal et al., 2008). La frecuencia del alelo HLA-B*57 varía considerablemente, está presente entre el 1-10% de caucásicos, africanos y asiáticos.

Otros alelos HLA que han sido reportados por presentar un efecto protector son: el alelo HLA-B*5801 evaluado en controladores élite, el cual se une al epítipo conservado del *gag* denominado TW10. Se ha observado que tiene control en la replicación: la presentación de este epítipo permite la selección de una mutación asociada a una menor capacidad de replicación del virus (Miura et al., 2009), y parece ser que esta mutación favorece el control de la infección viral por parte del sistema inmune.

HLA-B*62, B*55, B*44, B*14 y recientemente el alelo HLA-B*52 (Teixeira et al., 2014), se han reportado como alelos protectores, ya que han sido fuertemente asociados con progresión lenta a enfermedad en población asiática, americana e hispana (Coloccini et al., 2014; de Sorrentino et al., 2000; Zhang et al., 2013).

Hasta la fecha se ha identificado una gran cantidad de alelos HLA que presentan una fuerte correlación estadística con la susceptibilidad a enfermedad, uno de los más frecuentes es el alelo HLA-B*35, el cual ha sido asociado con una acelerada progresión a sida en distintos grupos de personas. En estado homocigoto se incrementa la susceptibilidad, especialmente cuando se presenta una mutación, ya que el efecto de un simple cambio de aminoácido en el alelo B*35 puede modificar la interacción con el antígeno y relacionarse directamente con la progresión a sida.

Se han reportado dos subtipos de HLA-B*35 basado en el tipo de aminoácido de unión al péptido, el grupo HLA-B*35PY que une una Prolina en la posición P2 y una Tirosina en la posición P9 corresponde al subtipo HLA-B*3501 (Gao et al., 2001), en cambio el subtipo HLA-B*35PX, que corresponde a los alelos HLA-B3502, HLA-B*3503, HLA-B5301 (se incluye por estar filogenéticamente muy relacionado con el HLAB-35) y HLA-B35*04 también unen una Prolina en la posición 2, pero pueden unir diferentes aminoácidos en la posición P9 como: Valina, Leucina, Prolina y Metionina. Estos pequeños cambios se ven reflejados en la respuesta de los linfocitos T citotóxicos, ya que al presentar diferentes epítopos del antígeno en cada uno de estos alelos, cambia en patrón de respuesta de las células inmunes. Por esta razón se ha relacionado en diferentes estudios al subtipo HLA-B*35PX con una rápida progresión a sida (Jin et al., 2002). Una posible explicación a este fenómeno es que la molécula HLA-B*3503 se une con gran afinidad al receptor inhibidor ILT4 (por la sigla del inglés de *immunoglobulin-like transcript*), una molécula que se expresa en las células dendríticas y que podría inducir alteraciones funcionales en la célula (Huang et al., 2009). Otros alelos HLA-B relacionados con rápida progresión a enfermedad son: HLA-B*0702 y HLA-B*0801 reportados en población caucásica (Kløverpris et al., 2014; Peterson et al., 2013).

Aunque los alelos del locus B han sido los mas estudiados en relación a su papel en la progresión a enfermedad en individuos portadores de VIH-1, cada vez hay más estudios que asocian alelos HLA-A y HLA-C con progresión del VIH entre estos se pueden mencionar:

El alelo HLA-A*24 ha mostrado una progresión rápida hacia sida en hombres caucásicos que mantienen relaciones con individuos del mismo sexo (Rugeles Lopez et al., 2010). En HLA-A*02 se ha observado una asociación entre la expresión de este alelo y una resistencia a la infección (Lui C et al., 2003). Asimismo, un estudio desarrollado en el Este de África, evidenció que la presencia del alelo HLA-A*02 se asocia con una reducción de nueve veces en el riesgo de transmisión perinatal. El alelo HLA-A*03 se asoció con progresión lenta de la infección en una cohorte china de individuos infectados, demostrando que estos alelos presentan péptidos conservados del virus (Zhai S. et al., 2008).

Con respecto al HLA-C, existen menos estudios realizados, pero cada vez hay mas evidencia que asocia este locus del HLA con resistencia o susceptibilidad a la progresión de enfermedad por VIH-1. Un estudio llevado a cabo en individuos de descendencia europea infectados con el virus (200 progresores lentos y 75 progresores rápidos) reportó la asociación de los alelos HLA-C*14 y HLA-C*8 con alta protección del avance hacia sida, mientras que el alelo C*16 se observó con mayor frecuencia en pacientes con progresión rápida (Rasmi Thomas et al., 2009).

2.7.5 ALELOS HLA Y FARMACOGENÉTICA

La agencia Americana de Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA por sus siglas en inglés) define la farmacogenética como el estudio de variaciones en las secuencias de ADN y su relación con la respuesta a los medicamentos. La farmacogenética es entonces una disciplina biológica que estudia la influencia de los factores genéticos de un individuo sobre la adsorción, disposición, acción y respuesta a los medicamentos.

Durante los últimos años la farmacogenética ha adquirido un papel fundamental en la prevención de las reacciones adversas frente a fármacos (Philips KA. Et al., 2001). En este contexto el sistema HLA ha sido descrito como un factor importante tanto en la evolución de la infección como en sus implicaciones farmacogenéticas, donde tiene especial importancia gracias a la prevención que su determinación puede ofrecernos frente a tratamientos antirretrovirales crónicos y con alta frecuencia de efectos adversos asociados. Según La *Pharmacogenetics and Pharmacogenomics Knowledge Base* (PharmGKB) creada en el año 2000 con el objetivo de organizar y recopilar información obtenida en estudios farmacogenéticos, alrededor de 274 alelos HLA han sido asociados con efectos adversos a más de 30 medicamentos, existiendo al menos 89 publicaciones sobre este tema (PharmGKB, 2017).

Las reacciones de hipersensibilidad (RHS) constituyen un tipo de reacción adversa frente a fármacos que se asocia a una alta morbilidad y mortalidad, las reacciones de hipersensibilidad tipo IV, mediadas inmunológicamente por células T, donde los HLA tiene un papel importante, constituyen al menos el 20% del total de reacciones adversas frente a fármacos (OMS, 2016). Fármacos como los antibióticos beta lactámicos, sulfonamidas o antiepilépticos se asocian frecuentemente a reacciones de hipersensibilidad en humanos (Britschgi M. et al., 2003), mientras en el campo del VIH el abacavir (ABC) y la nevirapina (NVP) son los responsables de la mayoría de estas reacciones (Martin AM. et al., 2004).

2.7.5.1 Síndrome de hipersensibilidad al abacavir y el alelo HLA-B*57:01

El abacavir es un inhibidor de la transcriptasa reversa, análogo de nucleósidos (guanosina), y se usa con eficacia en combinación con otros fármacos antirretrovirales desde 1988 (Hervey PS y Perry CM, 2000), y es utilizado en el esquema de tratamiento nacional como fármaco de primera línea.

El síndrome de hipersensibilidad al abacavir es un efecto adverso que se produce entre el 5% y el 8% de aquellas personas que inician el tratamiento con este fármaco y que limita el tratamiento en el futuro. Se manifiesta como un cuadro multisistémico caracterizado por fiebre, malestar general, exantema, síntomas gastrointestinales y respiratorios. Estos signos y síntomas se suelen producir durante las primeras seis semanas tras el inicio del tratamiento y se resuelven rápidamente una vez se suspende el mismo. La reacción no obstante puede ser potencialmente mortal si se produce una re-exposición al fármaco en pacientes que hayan desarrollado una RHS previa.

Algunos factores genéticos del hospedero, en especial el alelo HLAB*5701, que desde el 2002 se publicaron los primeros estudios, revelaban una fuerte asociación entre la reacción de hipersensibilidad al abacavir y ser portadores de este alelo en los grupos étnicos de caucásicos e hispánicos (Mallal S, 2002) (Hughes DA, 2004), (Saag et al., 2008). Un estudio en pacientes VIH positivo en TARGA de Brasil, reportó que el HLA-B*5701 se encontró en el 10,3% de los individuos que presentaron una reacción de hipersensibilidad clínicamente diagnosticada (de Araújo et al., 2014).

Según las investigaciones la RHS producida por abacavir está restringida al HLA-B*57:01 y mediada por linfocitos T CD8. Estudios cristalográficos han revelado que el ABC se une de forma no covalente al bolsillo de unión del HLA-B*57:01, modificando la forma de la hendidura de unión al antígeno. Esto altera el repertorio de péptidos propios del individuo que son presentados por el HLA-B*57:01, favoreciendo la presentación de péptidos que no fueron presentados durante el desarrollo tímico de las células T. Una considerable cantidad de péptidos propios “nuevos” son únicamente presentados en presencia de abacavir (Chessman D. et al, 2008).

La sociedad internacional de sida (AIS, por sus siglas en inglés) desde el 2007 recomendó el tamizaje del B*57:01 en las personas que inicien tratamiento con abacavir, y la FDA en el año 2008 emitió una alerta sobre la importancia de realizar una prueba molecular que detecte la variante alélica HLA*57:01 en todas las personas, antes de la administración del abacavir, además notificó a los fabricantes de medicamentos que contienen abacavir la necesidad de agregar en la advertencia de la caja la recomendación de realizar una prueba a todos los pacientes para determinar la presencia del alelo HLA-B*5701 antes de comenzar o reiniciar el tratamiento con abacavir o con medicamentos que contienen abacavir ya que los pacientes que portan el alelo HLA-B*5701 tienen un alto riesgo de desarrollar una reacción de hipersensibilidad (FDA, 2008). Sin embargo en el caso de Honduras en las instituciones encargadas del manejo de los pacientes VIH positivo por carecer de la metodología y equipo necesario se administra el abacavir sin contar con una prueba de tamizaje previa.

2.7.5.2 Síndrome de Hipersensibilidad a Nevirapina y alelos HLA

La nevirapina fue el primer ITINAN aprobado para uso clínico. Las erupciones cutáneas y la hepatotoxicidad son los efectos adversos descritos con mayor frecuencia. El efecto adverso más común de nevirapina es el desarrollo de erupción cutánea leve o moderada que se presenta en las primeras 6 semanas de tratamiento en el 9-32% de los tratados. Se han observado reacciones cutáneas graves o potencialmente mortales en el 1,5% de los pacientes, incluyendo el síndrome de Stevens-Johnson, necrólisis epidérmica tóxica e hipersensibilidad o síndrome de DRESS (*drug rash with eosinophilia and systemic symptoms*), que se considera una entidad clínica y fisiopatológica diferente de la erupción cutánea aislada. En el síndrome de hipersensibilidad se asocia a la clínica cutánea fiebre, eosinofilia, adenopatías y alteraciones de las transaminasas (Knudtson E. et al., 2003). Se presenta en los primeros 2 meses de tratamiento, con una mediana entre 2 y 6 semanas tras la primera dosis. Los síntomas iniciales son la erupción cutánea y la fiebre. Posteriormente el paciente desarrolla adenopatías, artritis, mialgias, manifestaciones viscerales (hepáticas) y alteraciones hematológicas como leucocitosis, eosinofilia y linfocitosis atípica, presenta una mortalidad de un 10%, fundamentalmente en relación con la alteración hepática (Marcos-Bravo et al., 2007).

Algunos autores comunicaron una mayor incidencia de erupción cutánea por nevirapina en mujeres (7 veces más frecuente), raza oriental, bajos recuentos de linfocitos T CD4 y con el empleo de la dosis plena (400 mg/día). Puesto que la incidencia de exantema es aproximadamente del 50% cuando el fármaco se

administra a dosis plena, por lo que se recomienda iniciar con la mitad de dosis (200 mg/día) (Marcos-Bravo et al., 2007).

Al igual que con abacavir, el síndrome de hipersensibilidad por nevirapina se ha asociado con diferentes alelos HLA a través de múltiples investigaciones en diferentes grupos de población, sugiriendo varias vías mediadas por HLA para la patogénesis de las reacciones de hipersensibilidad causadas por nevirapina. Entre los alelos asociados que podemos mencionar se encuentran: el alelo HLA de clase II HLA-DRB1*01:01 en pacientes con recuentos de linfocitos T CD4 altos pre-tratamiento y que presentaban reacciones hepáticas (definidas como aumentos en los niveles de transaminasas séricas) y multisistémicas (Martin AM. et al., 2005). De los HLA- Clase I, el HLA-B*14 alelo caucásico ha sido asociado con reacciones de hipersensibilidad a NVP en Sardos de Italia. Además se asocian los alelos HLA-B*35:05, que en población Tailandesa se observó en el 17,5% de los pacientes con erupción cutánea inducida por nevirapina, en comparación con sólo el 1,1% observado en pacientes tolerantes a nevirapina (Chantarangsu, Soranun et al, 2009).

Además en el locus C, los alelos HLA-C*04 y HLA-C*08 han mostrado asociación robusta con las reacciones de hipersensibilidad a nevirapina en afroamericanos, chinos (Pavlos R, Mallal S, & Phillips E, 2012) y población tailandesa en donde se observó significativamente más frecuente en los casos de erupción inducida por nevirapina que en el grupo tolerante a nevirapina, con frecuencias de 20,51% y 7,50%, respectivamente, (Sirirat Likanonsakul et al., 2009).

Un estudio de caso control realizado en Japón reveló que la frecuencia de los pacientes con HLA-C*08 positivos en el grupo con hipersensibilidad a la nevirapina

fue del 42%, significativamente superior a la del grupo tolerante a la nevirapina (10%) y a la población general japonesa (9-14%) (Gatanaga Hiroyuki et al., 2007). Existe suficiente evidencia científica que relaciona en individuos portadores del VIH-1, la delección CCR5 Δ 32 y los alelos del sistema HLA como factores genéticos que están involucrados en diferentes puntos del desarrollo de la infección tales como, la entrada del virus al interior de las células diana, los procesos de replicación del virus, el ritmo de progresión a sida, la aparición de determinadas infecciones o enfermedades oportunistas, así como determinadas reacciones adversas frente a los medicamentos antiretrovirales. Además se ha expuesto que el origen étnico puede ser un factor importante en el establecimiento de la infección y el desarrollo de enfermedad, ya que la frecuencia de estos factores genéticos varía según la población, por lo que no es posible extrapolar los resultados obtenidos en otras cohortes. La mayoría de las investigaciones se han realizado en poblaciones caucásicas y asiáticas, por lo que existe limitada información sobre la frecuencia de estos factores y su asociación con enfermedad en población amerindia, por ende, es necesario que se estudien estos polimorfismos genéticos con las características propias de cada población.

Por tales razones consideramos necesario iniciar la descripción de las frecuencias alélicas de los HLA y de polimorfismo genéticos como la delección CCR5 Δ 32 en la población hondureña, ya que estos datos serán de mucha utilidad en futuras investigaciones de asociaciones en la progresión de VIH-1 y otras enfermedades crónicas e infecciosas. Por lo que realizamos el primer estudio en Honduras que describe la frecuencia de factores genéticos asociados con progresión a

enfermedad e hipersensibilidad a fármacos antirretrovirales en población VIH-1 positiva, ya que la población hondureña se considera heterogénea debido a la alta diversidad étnica que posee se procedió a comparar dichas frecuencias en individuos procedentes de tres diferentes regiones geográficas del país. Se determinó la frecuencia de la delección CCR5 Δ 32 y de los alelos HLA-Clase I de los loci: A, B y C y se relacionaron dichas frecuencias con los parámetros clínicos utilizados como pronóstico de la progresión de la infección por VIH-1: el recuento de linfocitos T CD4, la determinación de carga viral y el Z-score, además se determinó la frecuencia de los alelos HLA asociados con hipersensibilidad al abacavir y nevirapina, fármacos utilizados en los esquemas de tratamiento antirretroviral en el país.

CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA

3.1 OBJETIVOS

3.1.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la frecuencia de factores genéticos asociados con progresión a enfermedad e hipersensibilidad a fármacos antirretrovirales en población VIH-1 positiva de tres regiones geográficas de Honduras durante los años 2013 al 2015.

3.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la frecuencia de la delección de 32 pares de bases en el correceptor CCR5 ($CCR5\Delta32$) en individuos VIH-1 positivos previo al inicio de tratamiento de tres regiones geográficas de Honduras durante los años 2013-2015.
2. Determinar la frecuencia de los alelos HLA de Clase I (loci: A, B, C) en individuos VIH-1 positivos previo al inicio de tratamiento, de tres regiones geográficas de Honduras durante los años 2013-2015.
3. Relacionar la frecuencia de los alelos reportados como “protectores” o de “riesgo” en la progresión a sida con recuento de linfocitos T CD4+, determinación de carga viral y z-score en individuos VIH-1 positivos previo al inicio de tratamiento de tres regiones geográficas de Honduras durante los años 2013-2015.
4. Conocer la frecuencia de los alelos HLA de clase I (loci: A, B, C) asociados con hipersensibilidad a fármacos antirretrovirales en los individuos VIH-1

positivos previo al inicio de tratamiento de tres regiones geográficas de Honduras durante los años 2013-2015.

3.2 DISEÑO DEL ESTUDIO

3.2.1 Tipo de Estudio

Se realizó un estudio multicéntrico, observacional, retrospectivo y transversal para evaluar la frecuencia de los alelos HLA clase I (loci A, B, C) en portadores del VIH-1 en tres regiones de Honduras. Se incluyeron pacientes de cinco Centros de Atención Integral (CAI) de tres regiones geográficas de Honduras donde se atiende la mayor proporción de individuos seropositivos del país.

3.2.2 Periodo del estudio

El estudio se llevó a cabo desde abril del año 2016 hasta marzo del año 2017, se incluyeron muestras de pacientes colectadas desde el año 2013 al 2015.

3.2.3 Población de estudio

Se invitó a participar de manera voluntaria en el proyecto a individuos, que presentaron diagnóstico confirmado de VIH-1 sin tratamiento antirretroviral previo, que asistían a los 5 centros de atención integral participantes.

Se incluyeron pacientes de tres regiones del país:

1. Zona Norte: San Pedro Sula: CAI Hospital Mario Catarino Rivas, La Ceiba: CAI Unidad de Salud Metropolitana.
2. Zona Centro: Tegucigalpa: CAI Hospital Escuela Universitario y CAI Instituto Nacional Cardiopulmonar.

3. Zona Sur: CAI Hospital del Sur.

TAMAÑO DE LA MUESTRA

3.3.1 Cálculo del tamaño de muestra

El tamaño de la muestra fue de 402 participantes. Se realizó el cálculo de tamaño de muestra para cada CAI, se determinó mediante fórmula estadística con 90% de Nivel de Confianza y con un Intervalo de Confianza de 10%. El número de participantes colectados en cada CAI se muestran en la tabla 3 y la distribución de los participantes durante el período de estudio se muestra en la tabla 4. El tamaño de muestra fue realizado utilizando la siguiente fórmula estadística:

$$n = \frac{N \cdot Z^2 \cdot \sigma^2}{(N - 1) \cdot e^2 + Z^2 \cdot \sigma^2}$$

Tabla 3. Cálculo del tamaño de la muestra.

| CAI | Cohorte de pacientes adultos | Tamaño de muestra | Muestra colectada |
|--------------|------------------------------|-------------------|-------------------|
| INCP | 900 | 63 | 83 |
| *HEU | 788 | 63 | 38 |
| HMCR | 1200 | 64 | 136 |
| UMS | 530 | 60 | 86 |
| HS | 470 | 59 | 59 |
| Total | 3888 | 309 | 402 |

CAI: Centro de atención integral, INCP: Instituto Nacional Cardiopulmonar, HEU: Hospital Escuela Universitario, HMCR: Hospital Mario Catarino Rivas, UMS: Unidad de Salud Metropolitana, HS: Hospital del Sur. *En el CAI del HEU no fue posible completar la muestra propuesta.

Tabla 4. Distribución de los participantes durante el período de estudio.

| <i>Región</i> | Centro n=121 | | Norte n= 220 | | Sur n=59 |
|-------------------|---------------------|------------|---------------------|-----------|-----------------|
| <i>Año/Centro</i> | HEU n=38 | INCP n= 83 | HMCR n=135 | USM n= 85 | HS n= 59 |
| 2013 | 22 | 44 | 52 | 56 | 29 |
| 2014 | 14 | 30 | 71 | 30 | 16 |
| 2015 | 2 | 9 | 12 | 0 | 14 |

Número de muestras colectadas por año y por región en los diferentes centros de atención integral.

3.3.2 Criterios: inclusión, exclusión y eliminación

Criterio de inclusión

1. Pacientes VIH-1 positivo con diagnóstico laboratorial confirmatorio de VIH-1.
2. Que no hubieran iniciado tratamiento antirretroviral.
3. Que aceptaran participar en el estudio, firmando el consentimiento informado.

Criterios de exclusión

1. Pacientes VIH-1 positivos menores de 18 años.
2. Pacientes VIH-1 positivos mayores de 18 años que no tuvieran diagnóstico confirmado.
3. Pacientes que no aceptaran participar en el estudio.

Criterios de eliminación

1. Inconsistencia en los antecedentes clínicos.
2. Etiquetado defectuoso de los tubos con muestras.
3. Consentimiento informado incompleto.

3.3.3 RECOLECCIÓN DE LA INFORMACIÓN

Se socializó el proyecto con los médicos, enfermeras y pacientes de los centros en estudio, los médicos tratantes fueron los encargados de invitar y citar a los participantes, el personal del laboratorio de virología de la UNAH se encargó de realizar las entrevistas, aplicación del consentimiento informado y la extracción de la muestras.

3.3.3.1 *Ficha epidemiológica*

Después de entender y firmar el consentimiento informado, revisado y aceptado por los comités de ética pertinentes para cada caso, se realizó una entrevista al participante donde se le pidió que completara una ficha que consta de tres partes: datos generales, datos socio demográficos y datos clínicos.

3.3.3.1.1 Datos generales y sociodemográficos

Datos generales como: nombre, edad, sexo, estado civil y centro de atención, además de datos sociodemográficos como: lugar de nacimiento, fecha de nacimiento, lugar de residencia actual, ocupación y situación laboral. Ver anexo 2.

3.3.3.1.2 Datos clínicos

Para recolectar la información clínica se preguntó al participante si aceptaba se hiciera uso de su expediente clínico para coleccionar la siguiente información: factor de riesgo o tipo de exposición al VIH, si conocía la fecha aproximada de su infección, fecha y método de diagnóstico de infección y confirmación de la misma. Presencia de signos/síntomas clínicos o curso de alguna enfermedad, terapia antirretroviral, estadio clínico de la infección por VIH, datos más recientes de

laboratorio: recuento de linfocitos T CD4+, determinación de carga viral de VIH-1, y presencia de infecciones oportunistas. Ver anexo 2.

3.4 MÉTODOS

3.4.1 Obtención de la muestra

Para cada participante se obtuvo una muestra de 15 mililitros de sangre periférica de una vena del brazo en una única sesión de toma de muestra, con sistema vacutainer. Se colectó 1 tubo Cytochex de 5 ml con conservador de marcadores celulares de superficie para conteo de linfocitos T CD4+, 1 tubo PPT (*plasma preparation tube*) con gel separador para obtención de plasma para determinar la carga viral de VIH-1 y 1 tubo con EDTA con anticoagulante para obtención de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) para extracción de ADN.

3.4.2 Determinación de carga viral de VIH-1

La determinación de carga viral del VIH-1 se realizó por la Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa en tiempo real (PCR-RT) utilizando el sistema m2000 (Abbott, Abbott Park, IL).

3.4.3 Recuento de linfocitos T CD4+

El conteo de linfocitos T CD4+ se realizó por citometría de flujo con el estuche de reactivos Trucount en un equipo FACSCalibur (BD Biosciences, San José, CA).

3.4.4 Cálculo del Z-score de VIH

El Z-score es una variable de progresión de enfermedad que relaciona el recuento de linfocitos T CD4+ y la carga viral de VIH, descrita por Garrido-Rodríguez y

colaboradores. Los valores positivos (>0) se asocian con individuos de mejor pronóstico (menor progresión a sida) mayor recuento de linfocitos T CD4+ y carga viral baja, los valores de Z-score negativos (<0) representan lo contrario. (Garrido-Rodriguez et al, 2016).

Para obtener el calculo de Z- score, a cada individuo se realiza la siguiente fórmula:

$$\left(\frac{CD4 - \text{media } CD4}{DS \text{ } CD4}\right) - \left(\frac{\text{carga viral} - \text{media carga viral}}{DS \text{ carga viral}}\right) / 2$$

3.4.5 Extracción de ADN genómico

El ADN fue extraído a partir de 140 μ l de *buffy coat* (al menos 6×10^6 PBMCs) utilizando el estuche de reactivos de QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Valencia, US) siguiendo las especificaciones del fabricante, posteriormente el ADN se almacenó a una temperatura de -80°C hasta su análisis.

3.4.6 Determinación de la delección CCR5 Δ 32

Para evaluar la presencia de la delección CCR5 Δ 32 se utilizó la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) convencional siguiendo el método publicado por *Trecarichi et al., 2006* las secuencias de los *primers* utilizados fueron:

CCR5-D32-F 5' CTTCATTACACCTGCAGCT 3'

CCR5-D32-R 5'TGAAGATAAGCCTCACAGCC 3'

Los reactivos y concentraciones utilizadas para la mezcla de reacción se muestra fueron:

| Reactivo | Concentración |
|-------------------|---------------|
| Buffer | 1x |
| MgCl ₂ | 1.6 mM |

| | |
|---------------------------------|------------------------|
| Mix dNTPS | 0.2 mM |
| Primer F | 0.4 μ M |
| Primer R | 0.4 μ M |
| Taq pol | 2 U/Rx |
| DNA | 100 ng/ μ l |
| H ₂ O estéril Mili Q | Completar a 25 μ l |

Para la amplificación se utilizó el termociclador Veriti® de Applied biosystems, utilizando el siguiente programa de amplificación;

| | | |
|---------------------------|---------------|-----------|
| Desnaturalización inicial | 94 ° C/ 5 min | |
| Desnaturalización | 94° C /15s | 40 ciclos |
| Hibridación | 55° C /15s | |
| Extensión | 72° C/ 30 s | |
| Extensión final | 72° C / 7 min | |
| Enfriamiento | 4° C ∞ | |

Posteriormente los productos amplificados fueron visualizados en geles de agarosa al 2%, utilizando 5 μ l de redgel por cada 100 ml de gel, se utilizaron 5 μ l del producto de PCR y 10 μ l de buffer de carga, se realizó la corrida electroforética a 100 voltios por 40 minutos con buffer TBE 1X utilizando un marcador de peso molecular de 1000 pb, para su posterior visualización en el transiluminador. Para los individuos que no presentan la mutación se espera una banda de 196 pb, para los individuos heterocigotos para CCR5 Δ 32 dos bandas una de 196 pb y una de 164 pb, y para los homocigotos para CCR5 Δ 32 una unica banda de 164 pb. (Ver figura 12).

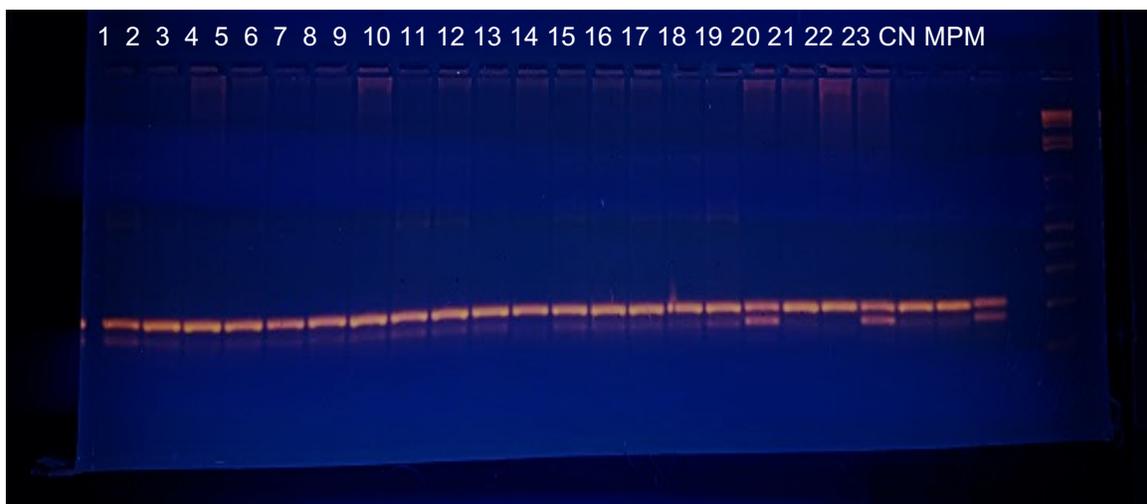


Figura 12. Ejemplo representativo de muestras a las que se determinó la delección CCR5 Δ 32.

Homocigoto sin delección se detecta mediante una banda de 196pb (muestras: 1-16, 18, 19, 21, 22). Un heterocigoto con la delección se detecta mediante una banda de 196pb y una de 164pb (muestra 17, 20 y 23). Un homocigoto con la delección se detecta mediante una banda de 164pb. Se observan 23 muestras, un control negativo y el marcador de peso molecular.

3.4.7 Tipificación de alelos HLA de Clase I a alta resolución

La tipificación de los alelos HLA de Clase I a alta resolución se llevó a cabo por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) anidada modificando un protocolo previamente publicado por (Cotton et al., 2012). La técnica se basa en la amplificación de aproximadamente 1000 pb de los exones 2 y 3 de los genes HLA (A, B y C) en reacciones separadas de PCR para cada gen y utilizando la enzima High Fidelity PCR system (Roche Applied Science, Laval, PQ).

Los *primers* utilizados para la primera vuelta, segunda vuelta y secuencia se encuentran en la Tabla 4. Para la primera vuelta de PCR, se realizaron mezclas con un volumen final de 25 μ l que contenían: 0.87 U de High Fidelity Enzyme mix (3.5 U/ μ l), 2.5 mM de MgCl₂, 0.25 mM de dNTP y 0.6 μ M del *primer forward* y

reverse (Tabla 4) agregando a cada reacción 4 µl del ADN extraído. Solo para el gen HLA-A se agregó 5% de dimetil-sulfóxido (DMSO) en la primera y segunda vuelta. El programa de amplificación fue: 1 ciclo a 96°C por 3 minutos seguidos de 35 ciclos de 95°C por 20 s, 60°C por 20 s y 72°C por 7 min. El volumen final de la segunda vuelta fue de 25 µl y contenía: 1.015 U/µl de la enzima High Fidelity Enzyme mix (3.5 U/µl), 2.2 mM de MgCl₂, 0.2 mM de la mezcla de dNTP, y 0.55 mM de cada *primer* de segunda vuelta (Tabla 4). Se incluyeron controles negativos en cada reacción de amplificación.

Los productos de la segunda vuelta de PCR se cargaron en un gel de agarosa al 1% para verificar la amplificación. Todas las muestras que contenían producto de PCR con las bandas en 875 pb para HLA-A, 860 pb para HLA-B y 850 pb para HLA-C (Figura 6), se purificaron por columna de sílice usando el estuche de reactivos QIAquick PCR Purification kit (QIAGEN). Las muestras se diluyeron 1:20 con agua de grado molecular para realizar las reacciones de secuencia usando la química Bigdye Terminator v3.1 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), se utilizó el equipo 3730xl Genetic Analyzes instrument (Life Technologies) para generar las secuencias. La asignación de los alelos HLA se realizó usando el programa uTYPEv6 (*Life Technologies*) por comparación con la base de datos IMGT/HLA.

Tabla 5. *Primers* utilizados para la tipificación de los alelos HLA Clase I (A, B, C).

| HLA | <i>Primers</i> primera vuelta | <i>Primers</i> segunda vuelta | <i>Primers</i> de secuencia |
|---------|---------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|
| HLA - A | AF: GAAACSGCCTCTGYGGGGAGAAG CAA | AS1F: AGCCGCGCCKGGASGAGGGTC | AS2R: GGCCCGTCCGTGGGGGATGAG |
| | | | AS4R: (el mismo para segunda vuelta) |
| | | | AS5F: |

| | | | |
|--|-----------------------------------|--------------------------------------|--|
| | | | CTACGTGGACGACACGCAGTT |
| | AR: TGTTGGTCCCAATTCTCTCCCTC | AS4R: TGTGGGAGGCCAGCCCGGGAG A | AS6F: ACAGTCTCCGGGTCCGAGAT |
| | | | AS7R: TTTGGCCTMAACYAAAAATGAAAC |
| | | | AS8R: TTCCCGTTCTCCAGGTRTCTGC |
| HLA – B | BF_mod: GGGAGGAGMRAGGGGACCSCAG | BnewF: GCAGGCGGGGGCGCAGGACC | BS1F: GGAGCCGCGCCGGGAGGAGGGTC |
| | | | BS2R: GGATGGGAGTCGTGACCT |
| | | | BS3F: ACKGKGCTGACCGCGGGG |
| | BR: GGAGGCCATCCCCGGCGACCTAT | BS4R: GGAGATGGGGAAGGCTCCCCAC T | BS11R: CGGGGTCACTACCGKCCTC |
| | | | BS12F: GGSCKGGGCCAGGGTCTCAC |
| | | | BS13R: ACTGCCCTGGTACCMGCGC |
| HLA – C | CF: ARCGAGGKGCCCKCCCGGCGA | CS1F: GGAGCCGCGCAGGGAGGWGG TC | CS1F (el mismo para la segunda vuelta de PCR) |
| | | | CS7R: GGCTCCCCACTGCCCYTGGTAC |
| | | | CS8F: CGGGTCTCAGCCMCTCCTC |
| | CR: GGAGATRGGGAAGGCTCCCCACT | CS7R: GGCTCCCCACTGCCCYTGGTAC | CS9R: TGGATCTCAGACSGGGAGACT |
| | | | CS10F: GGGCTGACCRCGGGGGCG |
| | | | CS11F: CGGGGCCAGGKTCTCACAYC |
| Todos los primers están enlistados en dirección 5' → 3'. Ninguno de los primers fue modificado y corresponden a los primers publicados en (7). | | | |

3.4.7.1 Electroforesis en geles de agarosa

Los productos amplificados se visualizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidas con red-gel. Se añadieron 5 µl de las muestras y se corrieron utilizando TAE 1X como buffer. Como se muestra en la figura 13.

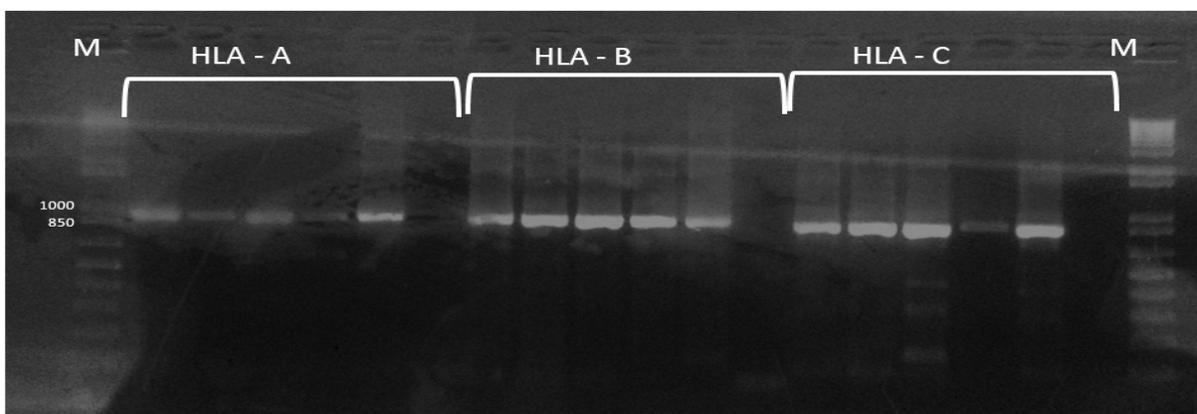


Figura 13. Patrón de bandas de amplificación de los genes HLA (A, B, C) por electroforesis.

Muestras representativas de la amplificación de los genes HLA-A, HLA-B y HLA-C. Se muestran 5 muestras y un control negativo para los tres genes. Se observan las bandas 875 pb para HLA-A, 860 pb para HLA-B y 850 pb para HLA-C. M: Marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

3.4.7.2 Purificación de los amplicones de PCR

Con el fin de degradar los *primers* no incorporados e hidrolizar los dNTPs sobrantes, los amplicones se purificaron con el kit comercial ExoSAP-IT™. Se añadieron 4 µl de ExoSAP-IT™ a los tubos de amplificación con productos positivos, posteriormente se centrifugaron brevemente, se mezclaron por vortex y se procedió a realizar el siguiente programa en el termociclador.

Programa purificación ExoSAP-IT™

| Paso | Nº ciclos | Temperatura | Tiempo |
|---------------|-----------|-------------|------------|
| Ciclo | 1 | 37°C | 20 minutos |
| | | 80°C | 20 minutos |
| Mantenimiento | 1 | 4°C | Infinito |

3.4.7.3 Reacción de secuenciación

El número de reacciones para secuenciación dependió del patrón de reacciones positivas, cuando las tres reacciones de amplificación fueron positivas se realizaron las reacciones de las secuencias *forward* y *reverse* para los exones 2 y

3 para todos los productos de la reacción, utilizando los siguientes componentes en la reacción de amplificación y ciclaje en el termociclador.

Componentes de la mezcla de PCR de secuenciación:

| Reactivo | Volumen | Reactivo | Volumen |
|----------------|---------|---------------|---------|
| Agua destialda | 2 ul | Primer 2 mM | 2 ul |
| Buffer 5X | 3.5 ul | ADN | 3.5 ul |
| Big Dye v3.1 | 0.5 ul | Volumen final | 10ul |

Programa del PCR de secuenciación

| N° ciclos | Temperatura | Tiempo |
|-----------|-------------|-------------|
| 1 | 96°C | 1 minuto |
| 25 | 96°C | 10 segundos |
| | 50°C | 5 segundos |
| | 60°C | 1 minuto |
| 1 | 4°C | Infinito |

3.4.7.4 Precipitación con etanol

En cada placa de PCR de secuenciación se agregaron 1.5 µl de acetato de sodio y 50 µl de etanol 100% y se mezcló en vortex (1500 rpm) durante 1 min. Se realizó un breve centrifugado para asegurar que el contenido se mezclara correctamente y se depositara en el fondo del pocito. Luego se centrifugó la placa a 2,000 rpm por 20 minutos, se descartó el contenido, invirtiendo la placa en un papel toalla y centrifugando a 150 rpm por 1 minuto.

Posteriormente se agregan 150 µl de etanol al 70% (fresco) a todos los pocitos, agitando en vortex por 60 segundos y se luego se centrifugó durante 5 minutos a 2000 rpm, se retiró la tapa y se colocó invertida sobre una toalla de papel para eliminar la mayor cantidad de líquido posible y se centrifugó a 500 rpm por 2

minutos. Se dejó secar al aire libre durante 10 minutos se añadieron 15 μ l de formamida, y se colocaron en el termociclador para la desnaturalización a 96°C durante 2 minutos, y para estabilizar se dejó en la refrigeradora 4°C por 1 minuto y posteriormente se colocaron las placas en el secuenciador para su análisis.

3.4.7.5 Análisis de los datos

Para el análisis de los resultados se utilizó el software *Sequencing analysis* con el fin de procesar los datos recopilados y crear los archivos de secuencia. Finalmente se utilizó el software uTYPE v6 SBT para procesar los archivos y crear el tipaje de los alelos HLA.

3.4.8 Análisis estadístico

Las variables continuas (cuantitativas) se expresaron como mediana con su rango intercuartílico (IQR), mientras que las variables categóricas (cualitativas) se resumieron con porcentajes con su respectivo intervalo de confianza de 95% (IC95%). Las variables continuas con una distribución normal fueron comparadas utilizando la prueba t Student; de lo contrario se aplicó la prueba U de Mann-Whitney, para la comparación de 3 poblaciones distintas se utilizó el análisis de varianza ANOVA. Se consideran estadísticamente significativos valores de $p \leq 0.05$. Las frecuencias alélicas de HLA y comparaciones entre regiones se obtuvieron con la herramienta Análisis de Frecuencias HLA de la Base de Datos de VIH de Los Álamos www.hiv.lanl.gov/content/immunology/tools-links.html.

3.5 ORGANIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

3.5.1 Recursos

Posterior a la extracción las muestras de sangre fueron llevadas rápidamente al Laboratorio de Virología-UNAH, y el Centro de Investigaciones Genéticas (CIG) donde fueron separadas, y posteriormente fueron enviadas al laboratorio de diagnóstico virológico del Centro de Investigación en enfermedades Infecciosas (CIENI) del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) de la Ciudad de México, donde fueron analizadas. Estos laboratorios cuentan con la infraestructura y los niveles de bioseguridad necesarios para la realización de las pruebas de laboratorio realizadas en el estudio.

3.6 CONSIDERACIONES ÉTICAS

Este estudio contó con la aprobación del Comité de Ética de Investigaciones Biomédicas de la Unidad de Investigación Científica (CEIB-UIC) de la UNAH y el Comité de Ciencia y Bioética del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias de México.

3.6.1 Consentimiento informado

Todos los participantes invitados a participar en el proyecto de investigación fueron previamente informados de los objetivos, riesgos y beneficios de su participación a través de comunicación directa con los investigadores y/o médicos responsables. Todo individuo que voluntariamente decidió participar en el estudio firmó una forma de consentimiento informado aprobado por comités de ética antes

mencionados. Se recalcó el carácter voluntario de la participación en el presente estudio, así como la posibilidad de retirarse del mismo en cualquier momento sin que esto afectara la atención clínica recibida de ningún modo.

La forma del consentimiento informado fue adaptada para que fuera claramente entendido por todos los participantes independientemente del nivel de educación que estos presentaron.

3.6.2 Procedimientos, riesgos y beneficios

La participación en este proyecto de investigación no modificó ni interfirió con el seguimiento clínico y tratamiento de los participantes.

Se obtuvieron 15 ml de sangre periférica por personal calificado siguiendo todas las precauciones y medidas de bioseguridad necesarias. La extracción de sangre está clasificada como un procedimiento de bajo riesgo, no existieron complicaciones y la cantidad de sangre extraída no representó riesgo para la salud.

Los participantes no obtuvieron beneficios económicos directos por la participación en el estudio. Algunas pruebas de laboratorio necesarias para la realización del proyecto (ejemplo: recuento de linfocitos T CD4+, la determinación de carga viral de VIH-1) son útiles para el seguimiento clínico de los pacientes, los resultados fueron entregados sin costo a las personas participantes a través de los médicos tratantes.

3.6.3 Confidencialidad

Todos los datos clínicos e identidades de los participantes fueron manejados con estricta confidencialidad, dándoseles una clave alfanumérica a todos los participantes desde el inicio de su participación en el estudio.

Los registros médicos donde los participantes pueden ser identificados así como el consentimiento informado firmado, podrían ser requeridos en caso de inspección o auditoria por alguna institución autorizada, incluyendo comités de ética, secretaría de salud, entre otros. Estas instituciones podrían conocer la identidad del paciente, pero siempre respetando su privacidad. Los expedientes se han mantenido en un archivo cerrado en el laboratorio de virología, con acceso solo del investigador principal. El participante no ha sido ni será identificado en ningún caso si los resultados de este estudio se presentan en reuniones científicas o en publicaciones.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

4.1 CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

Un total de 402 individuos con diagnóstico confirmado de VIH-1 previo al inicio de tratamiento antirretroviral fueron enrolados en 5 centros asistenciales de referencia durante los años 2013-2015. En la tabla 4 se muestra la distribución de los participantes durante el período de estudio. Los participantes se captaron en 3 regiones geográficas con mayor prevalencia de VIH-1 en Honduras, zona centro en Tegucigalpa: Instituto Nacional Cardiopulmonar (INCP) y Hospital Escuela Universitario (HEU); zona norte en San Pedro Sula: Hospital Mario Catarino Rivas (HMCR); y La Ceiba: Unidad de Salud Metropolitana (USM); y la zona sur en Choluteca: Hospital del Sur (HS).

4.1.1 Características epidemiológicas de la población de estudio

La mediana de edad del total de participantes incluidos fue de 34 años, con rango intercuartílico IQR (26-42) años, el grupo de edad comprendido entre 18 a 35 años fue el más frecuente abarcando el 55% (n=223) de la población de estudio. Del total de pacientes incluidos, el 57% resultaron ser hombres (n=229) y el 43% mujeres (n=173), para ambos grupos la mediana de edad fue de 34 años. Según el estado civil el 59% de la población indicó ser casado, el 31% estar en unión libre y un 10% ser soltero. En cuanto al grado académico, el 60% corresponden a individuos analfabetos, que leen y escriben o que solo terminaron la primaria, el 28.5% indicó haber culminado la secundaria y un 11.5% la universidad. El 52% reportó estar desempleado, el 42% poseía un empleo y un 6% estudiaba al

momento de la entrevista. En la tabla 6 se muestran las características demográficas de la población de estudio por región geográfica.

Tabla 6. Características demográficas por región

| Característica | Centro | Norte | Sur |
|------------------------|---------------|--------------|------------|
| Edad | | | |
| Años | 35 (26-45) | 34 (27-41) | 32 (26-37) |
| Sexo | | | |
| Masculino | 80 (66%) | 106 (48%) | 43 (73%) |
| Femenino | 41 (34%) | 116 (52%) | 16 (23%) |
| Estado Civil | | | |
| Casado | 81 (67%) | 121 (55%) | 35 (60%) |
| Soltero | 10 (8%) | 27 (12%) | 4 (5%) |
| Unión libre | 30 (25%) | 74 (33%) | 20 (35%) |
| Grado académico | | | |
| Leer-escribir/ninguno | 17 (14%) | 17 (7%) | 8 (14%) |
| Primaria | 57 (47%) | 111 (50%) | 32 (54%) |
| Secundaria | 33 (27%) | 64 (29%) | 17 (29%) |
| Universidad | 14 (12%) | 30 (14%) | 2 (3%) |
| Ocupación | | | |
| Desempleado | 69 (57%) | 119 (54%) | 21 (36%) |
| Empleado | 40 (33%) | 93 (42%) | 36 (61%) |
| Estudiante | 12 (10%) | 10 (4%) | 2 (3%) |

Región centro n= 121, región norte n=222 y región sur n=59. Variables continuas se expresan como mediana con su rango intercuartílico (IQR), variables categóricas en porcentajes.

4.1.2 Características clínicas y analíticas de la población de estudio

El patrón de transmisión más frecuente corresponde a la transmisión sexual con un 98.2% (n=395), de estos la mayoría fue por vía heterosexual (82.3%), 14.5% eran hombres que tienen sexo con hombres y un 3.2% reportó ser bisexual; en un reducido porcentaje, 1.8% (n=7) la transmisión fue de madre a hijo, este grupo corresponde a jóvenes infectados desde el nacimiento que descontinuaron el tratamiento.

La mediana del recuento de linfocitos T CD4+ fue de 298 cel/ μ L IQR (96-509), el 40% de los participantes del estudio (n=159) presentaban recuento de linfocitos T CD4+ <200 cel/ μ L lo que indica que están en infección avanzada de VIH-1, mientras el 26% (n=105) presentó recuento >500 cel/ μ L, que según las directrices vigentes en ese momento no eran candidatos para comenzar la terapia antirretroviral por presentar un control efectivo de la infección, ya que esta se indicaba a las personas con recuento de linfocitos T CD4+ < 500 cel/ μ L.

La mediana de la determinación de carga viral de VIH-1 fue de 4.46 log QR (3.61-5.16), en cuanto al Z-score la mediana fue de -0.00529 IQR (-0.681-0.715), por ser negativo, se interpreta como mal pronóstico de progresión a enfermedad.

El 100% de las muestras corresponden a individuos infectados por el VIH-1, al 93% (n=373) de las muestras se le realizó el genotipaje, de estos, la mayoría, el 98.6% (n=368) fueron subtipo B, solo 1.4% encontradas en la población del centro y norte se clasificaron como recombinantes: el 0.8% (n=3) formas recombinantes únicas URF_BD, un 0.3% (n=1) resultó ser un subsubtipo A1, y un 0.3% (n=1) una forma recombinante circulante CFR_12_BF.

En la tabla 7 se observan las características clínicas y analíticas clasificadas por región geográfica. Un dato importante a resaltar es que el recuento de linfocitos T CD4+ en los participantes de la región norte es más alto que las regiones centro y sur ($p=0.014$) (378 cel/ μ L promedio en la zona norte contra 190 cel/ μ L en zona centro y 184 cel/ μ L en zona sur). Además se observó que la mediana del Z-score de la población del centro es negativo sugiriendo mal pronóstico en la progresión a enfermedad y en las del norte y sur se encuentra más cerca de 1, representando un mejor pronóstico. Es importante resaltar que en la zona sur no se encontraron variantes no B de VIH-1 ni recombinantes.

Tabla 7. Características clínicas y analíticas por región

| Característica | Centro | Norte | Sur |
|-------------------------|---------------------|-------------------|-------------------|
| Factor de riesgo | | | |
| Heterosexual | 103 (85%) | 178 (80%) | 44 (75%) |
| HSH | 15 (12%) | 33 (15%) | 9 (15%) |
| Bisexual | 2 (2%) | 5 (2.3%) | 6 (10%) |
| TMH | 1 (1%) | 6 (2.7%) | - |
| CVP VIH-1 | | | |
| Log | 4.7 (3.77-5.27) | 4.44 (3.65-5.09) | 4.3 (2.9-5.07) |
| LT CD4+ | | | |
| cel/ μ L | 190 (64.5-500) | 378 (151-524) | 184 (56-306) |
| % CD4+ | 12.5 (6-22) | 15 (9-22) | 11 (5-17) |
| Z-score | -0.229 (-0.77-0.56) | 0.78 (-0.52-0.74) | 0.99 (-0.74-0.64) |
| Subtipo VIH | | | |
| Subtipo B | 115 (98%) | 201 (98.5%) | 52 (100%) |
| No B | 2 (2%) | 3 (1.5%) | - |

HSH=hombres que tienen sexo con hombres, TMH=transmisión madre a hijo, CVP VIH-1= carga viral en plasma de VIH-1, LT CD4+= recuento de linfocitos T CD4+, No B= (3)URF_BD, (1) VIH-1-A_A1, (1) CRF_12_BF. Variables continuas se expresan como mediana con su rango intercuartílico (IQR), variables categóricas en porcentajes.

4.2 DETERMINACIÓN DE LA FRECUENCIA DE LA DELECIÓN CCR5 Δ 32

De las 402 muestras analizadas, el 99% (n=398) lograron amplificar en la técnica de amplificación del gen CCR5. Veintinueve individuos presentaron la delección CCR5 Δ 32, obteniéndose una frecuencia global de 7.2% (IC95%: 4.7-9.8), encontrándose en heterocigosis en todos los casos. En la tabla 8 se observa la distribución de la frecuencia de CCR5 Δ 32 encontradas en los participante de las tres regiones de estudio. El centro asistencial que mostró mayor frecuencia de está mutación es el HMCR con 10% (IC95%: 4.7-14.7); no se encontró la delección en los pacientes analizados del HEU, la población con mayor frecuencia corresponde a la región norte con 8.7% (IC95%: 5.0-12.5).

Tabla 8. Distribución de las frecuencias de la delección CCR5 Δ 32.

| REGIÓN | CENTRO | | NORTE | | SUR | TOTAL |
|-----------------------|-----------|----------|-----------|----------|-----------|-------------|
| <i>Gen CCR5</i> | HEU | INCP | HMCR | USM | HS | |
| (CCR5wt/wt) | 38 (100%) | 76 (92%) | 121 (90%) | 78 (93%) | 56 (95%) | 369 (92.7%) |
| (CCR5wt/ Δ 32) | 0 (0%) | 7 (8%) | 13 (10%) | 6 (7%) | 3 (5%) | 29 (7.2%) |
| <i>TOTAL</i> | 7/121 | (5.7%) | 19/218 | (8.7%) | 3/59 (5%) | |

CCR5wt/wt=(del inglés Wild Type)="silvestre" homocigoto sin delección, CCR5wt/ Δ 32= heterocigoto para la delección, HEU= Hospital Escuela Universitario, INCP= Instituto Nacional Cardiopulmonar, HMCR= Hospital Mario Catarino Rivas, USM= Unidad de Salud Metropolitana, HS= Hospital del Sur. No se encontraron individuos homocigotos para la delección CCR5 Δ 32.

En los 29 individuos que presentan la delección CCR5 Δ 32 la mediana de edad fue de 35 años IQR (28.5-42) años, el 41% (n=12) corresponde a mujeres y el 59%

(n=17) a hombres, la mediana del recuento de linfocitos T CD⁺ fue de 248 cel/ μ L. IQR (89.5-492.5), la carga viral fue de 4.44 log pvl (3.7-5.13) y el Z-score de -0.143 IQR (-0.617-0.687), el 100% resultó estar infectado por el VIH-1 subtipo B.

El 62% (n=18) poseían al menos 1 alelo HLA considerado de riesgo para progresión a enfermedad, aún así el 38% (n=7) de este grupo mantienen sus recuentos de linfocitos T CD⁴⁺ > 500 cel/ μ L, carga viral \leq 6 log y un Z-score positivo.

4.3 DETERMINACIÓN DE LAS FRECUENCIAS ALÉLICAS HLA CLASE I (A, B, C)

4.3.1 Distribución de los alelos HLA-A, B y C en la población de estudio

Al total de pacientes incluidos en este estudio (n=402) se les realizó la tipificación de alta resolución de los loci HLA de clase I (A, B y C). Dos muestras no amplificaron para los loci A y C (n=400), y 3 muestras no amplificaron el locus B (n=399).

Se obtuvieron 140 alelos diferentes en los tres loci (tabla 9). Para el locus A se encontraron 42 alelos distintos, los que mostraron mayor frecuencia alélica fueron: A*02:01, A*24:02 y A*03:01 con frecuencias de 16.6% (IC95%: 14-19.2), 14.1% (IC95%: 11.7-16.5), y 7.5% (IC95%: 5.9-9.6) respectivamente. Entre los alelos menos frecuentes podemos mencionar: A*01:02 y A*24:01 ambos con frecuencia de 0.12% (IC95%: 0.1-0.4); el resto de los alelos presentaron una frecuencia entre 0.12% y 6.72%, y se detallan en la figura 14.

El locus B mostró mayor variabilidad alélica presentando 69 alelos distintos, siendo los más frecuentes B*35:01, B*07:02 y B*40:02 con frecuencias de 11.6%

(IC95%: 9.4-13.9), 7.0% (IC95%: 5.2-8.8), y 6.0% (IC95%: 4.4-7.7) respectivamente. Entre los alelos que presentan menor frecuencia están: B*13:01 y B*27:02 ambos con frecuencia de 0.12% (IC95%: 0.1-0.4); el resto de los alelos presentaron una frecuencia entre 0.12% y 4.86%, como se muestra en la figura 15.

Sin embargo en el locus C parece mostrar menor variabilidad alélica encontrándose 29 variantes, de estos los alelos C*04:01, C*07:02 y C*07:01 con frecuencias de 15.25% (IC95%: 12.8-17.7), 14.1% (IC95%: 11.7-16.5) y 10.75% (IC95%: 8.6-12.9) respectivamente, fueron los más frecuentes. En cambio los alelos C*04:03 y C*08:04 fueron los menos frecuentes (0.12% [IC95%: 0.1-0.4]); el resto de los alelos presentaron frecuencias entre 0.5% y 7.59%. Las frecuencias del resto de los alelos se muestran en la figura 16.

Se encontraron 14 haplotipos con significancia estadística ($p < 0.05$); de estos, los que presentan una robusta asociación estadística son: A*01:01-B*08:01-C*07:01, A*03:01-B*07:02-C*07:02 y A*25:01-B*18:01-C*12:03, todos ellos con $p < 0.001$.

Tabla 9. Frecuencia de alelos HLA Clase I (A, B, C) en portadores del VIH-1 de Honduras.

| N | HLA-A | Frecuencia alélica % | HLA-B | Frecuencia alélica % | HLA-C | Frecuencia alélica % |
|----|---------|----------------------|---------|----------------------|---------|----------------------|
| 1 | A*01:01 | 5.47 | B*07:02 | 6.98 | C*01:02 | 7.59 |
| 2 | A*01:02 | 0.12 | B*08:01 | 3.49 | C*02:02 | 3.11 |
| 3 | A*02:01 | 16.79 | B*13:01 | 0.12 | C*02:10 | 1.12 |
| 4 | A*02:02 | 0.87 | B*13:02 | 1.12 | C*03:02 | 1.12 |
| 5 | A*02:04 | 0.25 | B*14:01 | 1 | C*03:03 | 1.74 |
| 6 | A*02:05 | 1.49 | B*14:02 | 3.74 | C*03:04 | 4.98 |
| 7 | A*02:06 | 1.74 | B*15:01 | 2 | C*03:05 | 6.47 |
| 8 | A*02:11 | 0.12 | B*15:03 | 2.12 | C*03:38 | 0.12 |
| 9 | A*02:33 | 0.25 | B*15:04 | 0.12 | C*04:01 | 15.17 |
| 10 | A*03:01 | 7.71 | B*15:07 | 0.12 | C*04:03 | 0.12 |
| 11 | A*03:02 | 0.62 | B*15:10 | 1 | C*05:01 | 3.11 |

| | | | | | | |
|----|---------|-------|---------|-------|---------|-------|
| 12 | A*11:01 | 3.73 | B*15:16 | 0.12 | C*06:02 | 4.98 |
| 13 | A*23:01 | 3.86 | B*15:17 | 0.37 | C*07:01 | 10.7 |
| 14 | A*24:01 | 0.12 | B*15:18 | 0.12 | C*07:02 | 14.18 |
| 15 | A*24:02 | 14.05 | B*15:20 | 0.12 | C*07:04 | 0.5 |
| 16 | A*24:03 | 0.12 | B*18:01 | 2.74 | C*07:17 | 0.75 |
| 17 | A*25:01 | 0.87 | B*27:02 | 0.12 | C*08:01 | 1 |
| 18 | A*26:01 | 2.99 | B*27:03 | 0.12 | C*08:02 | 4.48 |
| 19 | A*26:07 | 0.12 | B*27:05 | 1 | C*08:04 | 0.12 |
| 20 | A*26:08 | 0.12 | B*35:01 | 11.85 | C*12:02 | 1.37 |
| 21 | A*29:02 | 3.36 | B*35:02 | 0.87 | C*12:03 | 4.85 |
| 22 | A*30:01 | 2.49 | B*35:03 | 0.5 | C*14:02 | 1.12 |
| 23 | A*30:02 | 3.36 | B*35:08 | 0.25 | C*14:03 | 0.25 |
| 24 | A*30:04 | 0.12 | B*35:11 | 0.12 | C*15:02 | 2.61 |
| 25 | A*30:07 | 0.12 | B*35:12 | 3.24 | C*15:05 | 1 |
| 26 | A*30:10 | 0.12 | B*35:16 | 0.12 | C*15:09 | 0.75 |
| 27 | A*31:01 | 5.35 | B*35:17 | 1.12 | C*16:01 | 4.1 |
| 28 | A*31:02 | 0.12 | B*35:20 | 0.37 | C*17:01 | 1.49 |
| 29 | A*32:01 | 2.49 | B*35:43 | 3.99 | C*18:01 | 1.12 |
| 30 | A*33:01 | 1.49 | B*37:01 | 0.37 | | |
| 31 | A*33:03 | 1.37 | B*38:01 | 2.87 | | |
| 32 | A*34:02 | 0.12 | B*39:01 | 1.5 | | |
| 33 | A*36:01 | 0.37 | B*39:02 | 0.62 | | |
| 34 | A*66:01 | 0.75 | B*39:05 | 2.74 | | |
| 35 | A*68:01 | 5.72 | B*39:06 | 0.62 | | |
| 36 | A*68:02 | 2.11 | B*39:08 | 1.87 | | |
| 37 | A*68:03 | 6.72 | B*39:11 | 1.62 | | |
| 38 | A*68:05 | 0.62 | B*40:01 | 1 | | |
| 39 | A*68:30 | 0.12 | B*40:02 | 5.99 | | |
| 40 | A*68:31 | 0.12 | B*40:11 | 0.12 | | |
| 41 | A*69:01 | 0.37 | B*40:27 | 0.12 | | |
| 42 | A*74:01 | 1.12 | B*41:01 | 0.5 | | |
| 43 | | | B*41:02 | 0.12 | | |
| 44 | | | B*42:01 | 0.5 | | |
| 45 | | | B*42:02 | 0.12 | | |
| 46 | | | B*44:02 | 1.37 | | |
| 47 | | | B*44:03 | 3.62 | | |
| 48 | | | B*45:01 | 2.24 | | |
| 49 | | | B*47:01 | 0.12 | | |
| 50 | | | B*48:01 | 1.25 | | |
| 51 | | | B*49:01 | 2.49 | | |
| 52 | | | B*50:01 | 0.5 | | |
| 53 | | | B*51:01 | 4.86 | | |

| | | | | | | |
|-----------|--|--|---------|------|--|--|
| 54 | | | B*51:02 | 0.25 | | |
| 55 | | | B*51:07 | 0.37 | | |
| 56 | | | B*52:01 | 2.99 | | |
| 57 | | | B*53:01 | 2 | | |
| 58 | | | B*53:05 | 0.12 | | |
| 59 | | | B*55:01 | 0.75 | | |
| 60 | | | B*56:01 | 0.62 | | |
| 61 | | | B*57:01 | 1.75 | | |
| 62 | | | B*57:02 | 0.12 | | |
| 63 | | | B*57:03 | 0.5 | | |
| 64 | | | B*57:30 | 0.12 | | |
| 65 | | | B*58:01 | 1.87 | | |
| 66 | | | B*58:02 | 1.12 | | |
| 67 | | | B*67:01 | 0.12 | | |
| 68 | | | B*73:01 | 0.37 | | |
| 69 | | | B*81:01 | 0.75 | | |

Frecuencia de alelos HLA Clase I (A, B, C) en portadores del VIH-1 de Honduras.

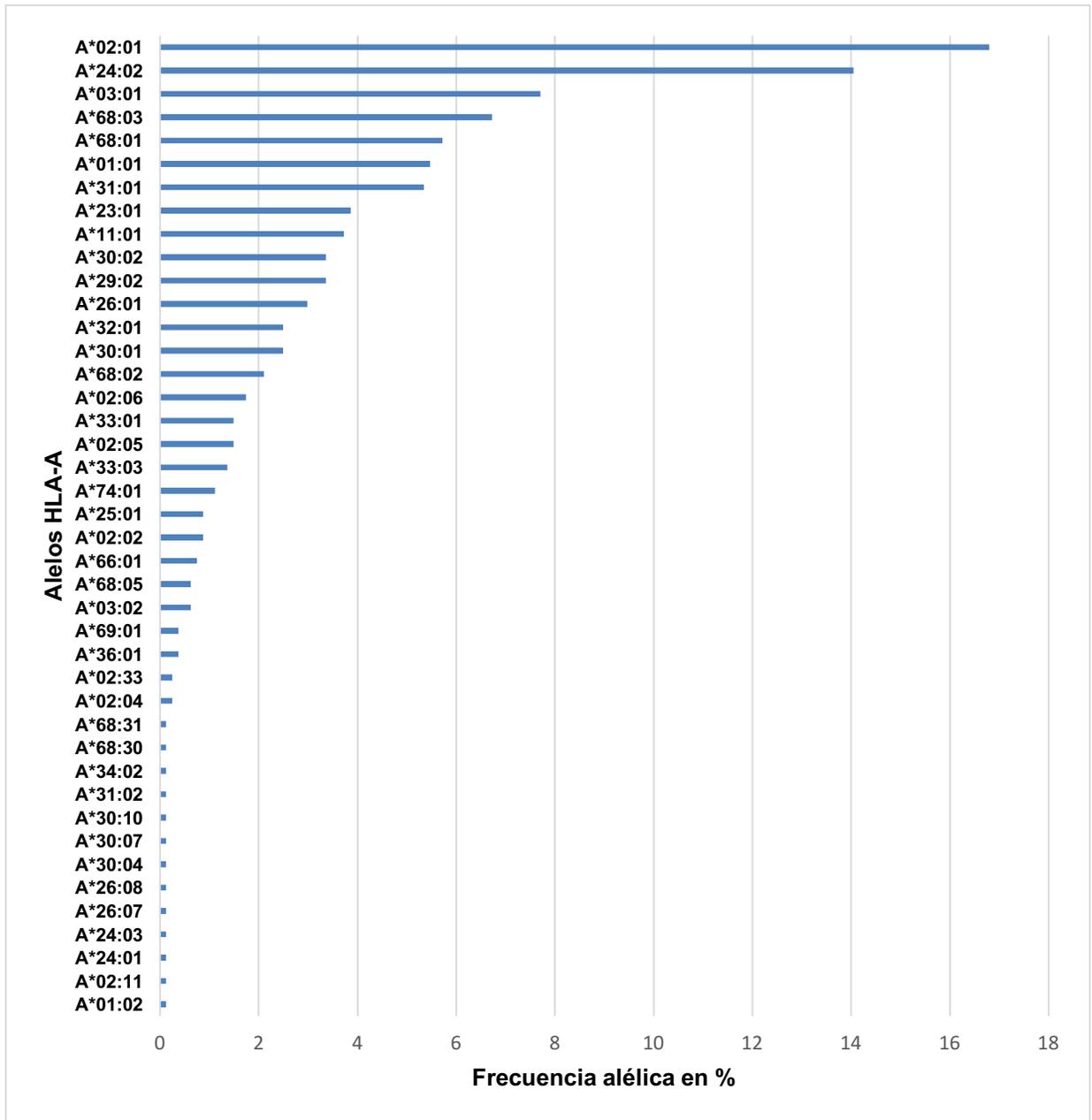


Figura 14. Frecuencia de alelos HLA- A.

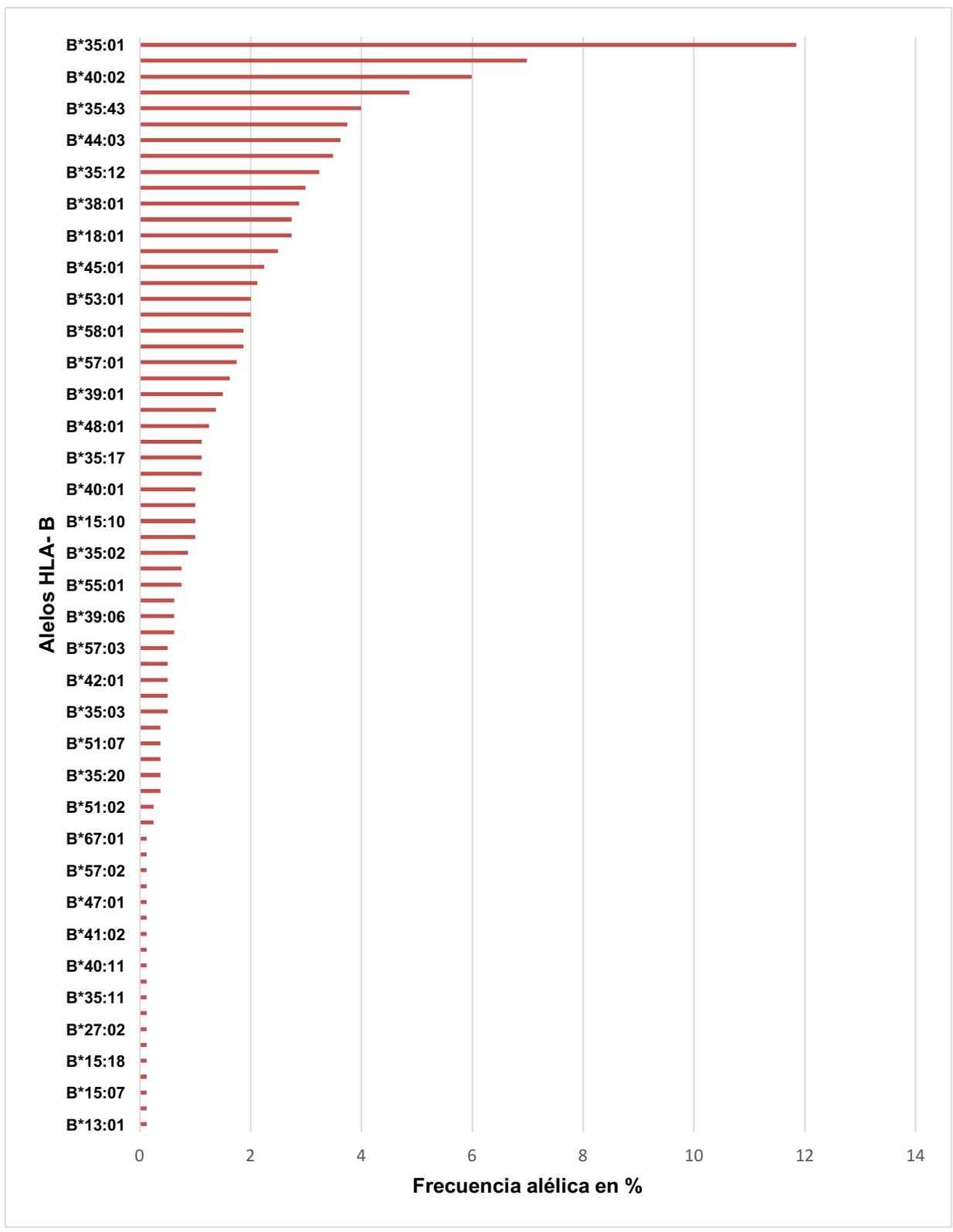


Figura 15. Frecuencia alelos HLA-B.

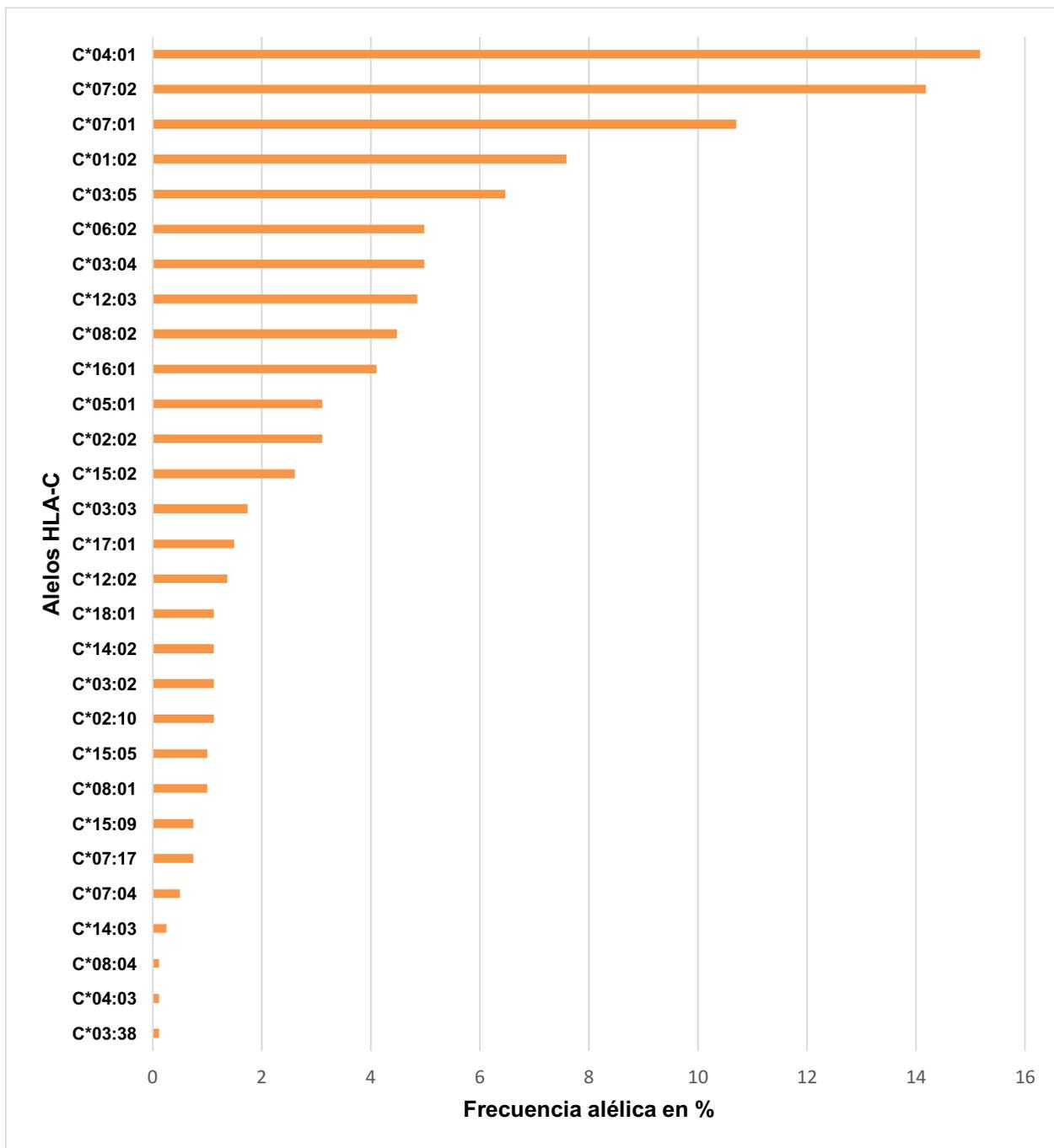


Figura 16. Frecuencia de alelos HLA-C.

4.3.2 Comparación de las frecuencias alélicas HLA Clase I (A, B, C) en portadores del VIH-1 procedentes de tres regiones geográficas de Honduras

4.3.2.1 Comparación de los alelos HLA-A en portadores del VIH-1 procedentes de las regiones centro, norte y sur de Honduras

Al comparar las frecuencias alélicas de los HLA del locus A en las poblaciones analizadas según su procedencia (región centro, norte y sur), encontramos que las poblaciones de las tres regiones comparten el primer y segundo alelo más frecuente siendo estos: A*02:01 con frecuencias de 15.3% en la población del centro, 16.4% en la norte y 21.2% en la sur; y el alelo A*24:02 con frecuencias de 14.5%, 13.6% y 16.1% en las poblaciones del centro, norte y sur respectivamente. Sin embargo el tercer alelo más frecuente varía en cada región, en la población del centro es el A*68:03 (8.26%), en la del norte A*03:01 (8.41%) y en la del sur A*68:01 (8.47%).

Al comparar las variantes alélicas de los participantes de la región centro contra los de la región norte se encuentran diferencias en los siguientes alelos, puesto que sus frecuencias son mayores en la población del centro: A*01:01 (7.8% vs 3.6%), A*02:06 (3.31% vs 0.91%). Sin embargo se encontró la presencia de los alelos: A*03:02 (0.85%) y A*68:05 (2.54%) en la población del sur, pero estos alelos no fueron encontrados en los participantes del centro. Además se observó que el alelo A*30:01 está presente en la población del norte (3.41%) y ausente en la población del sur. Aunque en las comparaciones de todos los alelos mencionados se obtuvo un valor $p < 0.05$, su significación estadística se perdió tras

la corrección ($q > 0.2$). En la figura 17 se detalla la comparación de frecuencias de los alelos HLA-A por región.

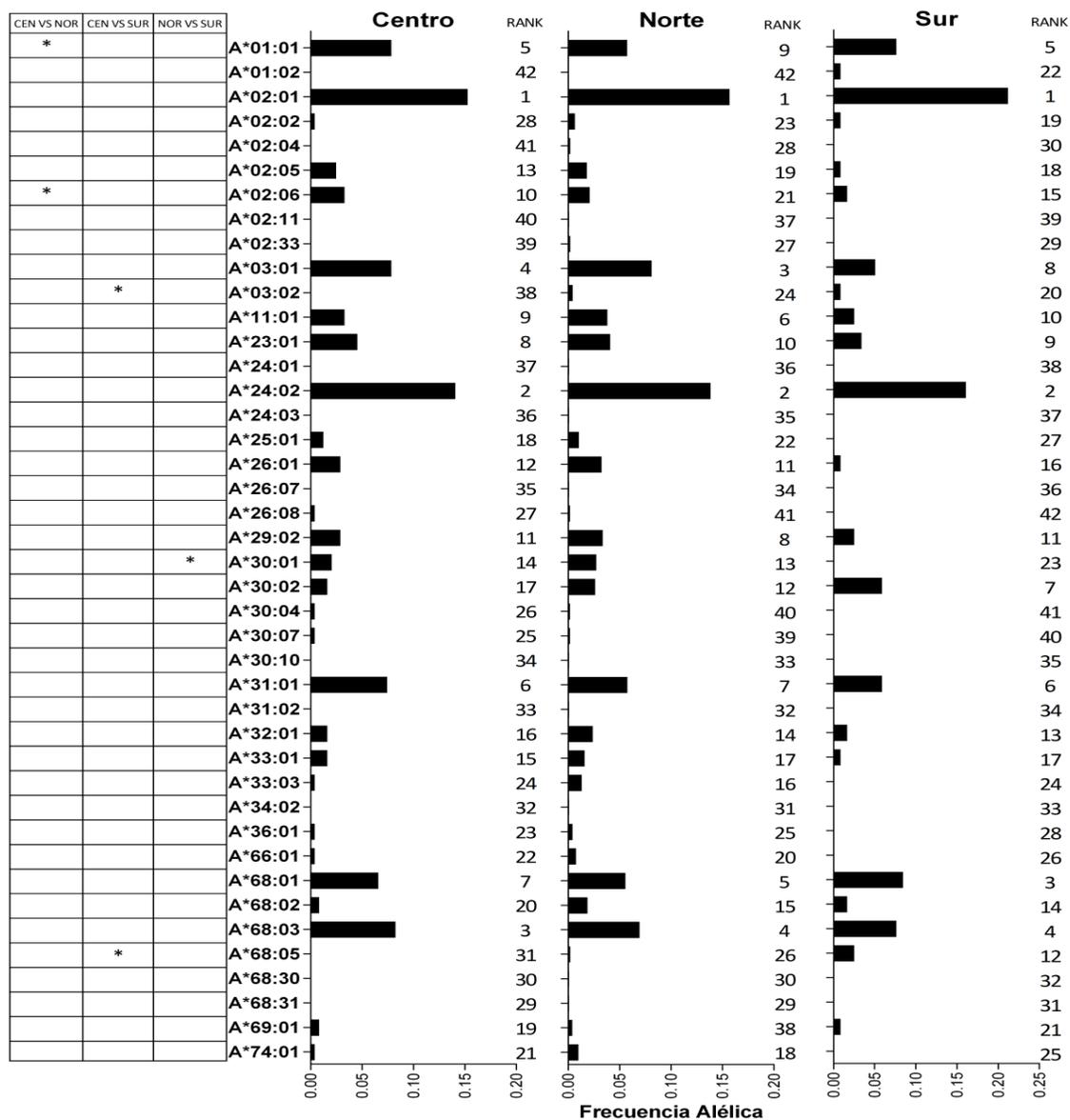


Figura 17. Comparación de frecuencias alélicas HLA-A en portadores del VIH-1 procedentes de las regiones centro, norte y sur de Honduras.

A la izquierda: comparación de las frecuencias entre regiones, eje X: frecuencia alélica, eje Y: alelos HLA-A, a la derecha: el Rank (posición del alelo según frecuencia).
* valor $p < 0.05$.

4.3.2.2 Comparación de los alelos HLA-B en portadores del VIH-1 procedentes de las regiones centro, norte y sur de Honduras

Al comparar las frecuencias alélicas HLA del locus B por región geográfica (figura 18), encontramos que las tres poblaciones de estudio comparten a B*35:01 como alelo más frecuente coincidiendo con frecuencias de 11.6%, 11.8% y 11.02% en las regiones centro, norte y sur, respectivamente.

El segundo alelo más frecuente en la población del centro es el B*14:02 (7.1%), seguido del B*40:02 (6.7%); en cambio en la del norte se observó mayor frecuencia de los alelos B*07:02 (7.9%) y B*51:01(5.2%); y en la del sur los alelos B*40:02 (11%) y B*07:02 (7.6%) fueron los más frecuentes.

En la comparación de las frecuencias alélicas de la población del centro contra la del norte, encontramos diferencia estadísticamente significativa en el alelo B*14:02 puesto que es más frecuente en la población del centro (7.1% vs 2.1%) ($p=0.026$ y $q=0.12$); además el alelo B*35:43 también se encontró con mayor frecuencia en esta población (6.3% vs 2.9%), mientras que el B*35:03 presentó una frecuencia de 1.25% en la población del centro y estuvo ausente en la del norte, pero en ambos casos la significación estadística se pierde tras corrección.

En sentido contrario se encontró mayor frecuencia de los alelos B*39:08 (2.7% vs 0.42%) y B*57:01 (2.5% vs 0.42%) en la población del norte respecto a la del centro. No se encontraron diferencias significativas al comparar los alelos HLA-B de la población del centro contra la del sur. Sin embargo se observó frecuencia aumentada del alelo B*40:02 (11% vs 4.3%) en la población del sur comparada con la del norte, pero sin significación estadística tras corrección.

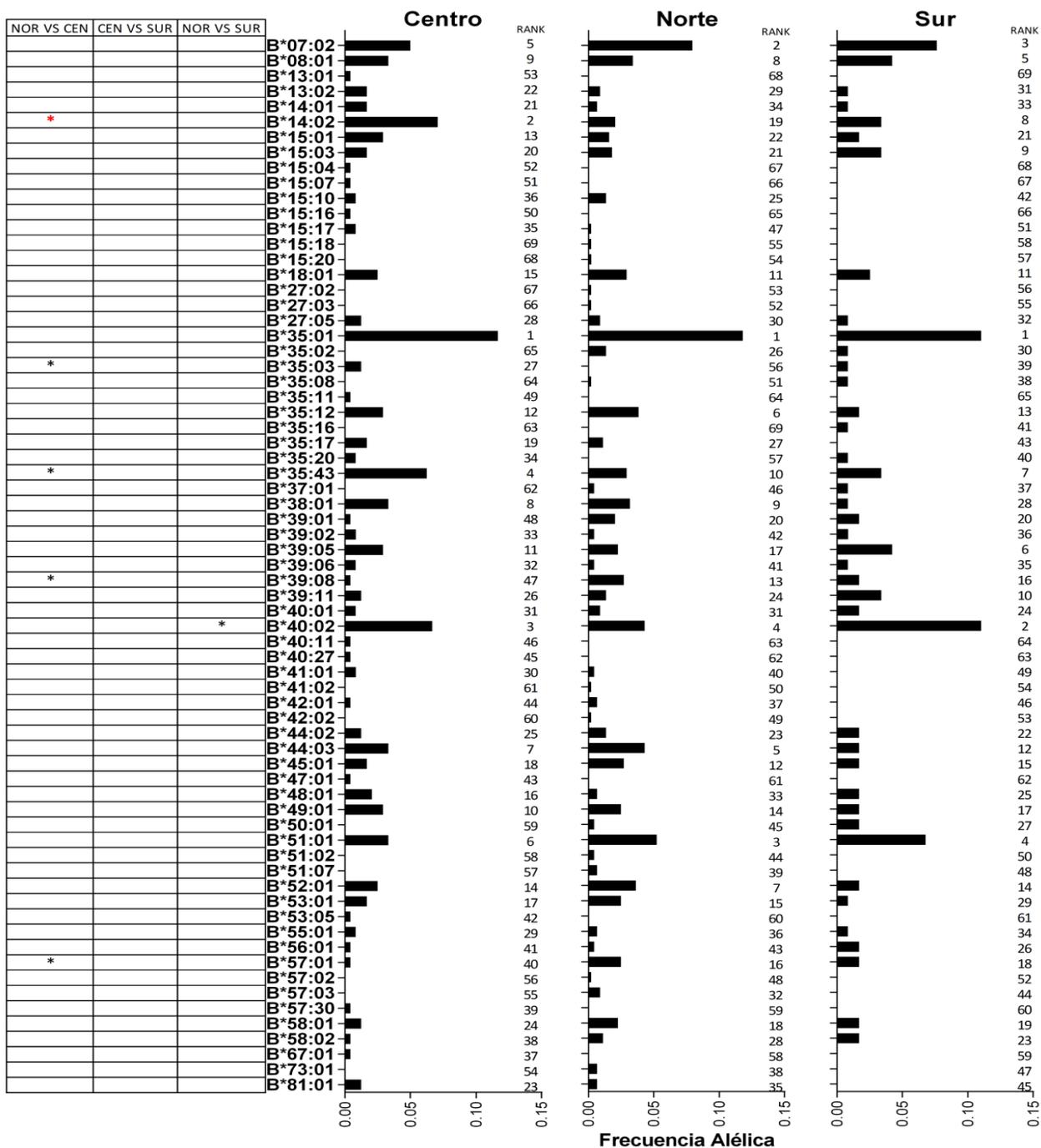


Figura 18. Comparación de frecuencias alélicas HLA-B en portadores del VIH-1 procedentes de las regiones centro, norte y sur de Honduras.

A la izquierda: comparación de las frecuencias entre regiones, eje X: frecuencia alélica, eje Y: alelos HLA-B, a la derecha: el Rank (posición del alelo según frecuencia).
 * valor $p < 0.05$. * valor $p < 0.05$ y $q < 0.2$.

4.3.2.3 Comparación de los alelos HLA-C en portadores del VIH-1 procedentes de las regiones centro, norte y sur de Honduras

En la comparación de las frecuencias alélicas del locus C (figura 19) encontramos que las poblaciones de las regiones centro y norte comparten los tres alelos más frecuentes, siendo estos: el C*04:01, C*07:02 y C*07:01 con frecuencias del 15.7%, 12.5% y 12%, respectivamente en la población del centro, y 16.8%, 13.4% y 10.7% en la del norte. En cambio en la población del sur el alelo más frecuente es el C*07:02 (19.5%), seguido del C*01:02 (11.9%) y C*03:05 (10.2%).

Al comparar las frecuencias de los alelos encontrados en la población del centro contra la del norte, únicamente el C*08:02 parece ser más frecuente en la del centro (7% vs 3.2%). En la comparación de la población del centro contra la del sur observamos que el alelo C*04:01 fue más frecuente en la del centro (15.7% vs 8.5%). En sentido contrario se encontró mayor frecuencia de los alelos C*01:02 (11.9% vs 5.9%) y C*03:05 (10.2% vs 4.7%) en la población del sur con respecto a la del norte, sin embargo el C*04:01 mostró menor frecuencia en la población del sur (15.7% vs 8.5%). Aunque todas las comparaciones pierden la significación estadística tras la corrección.

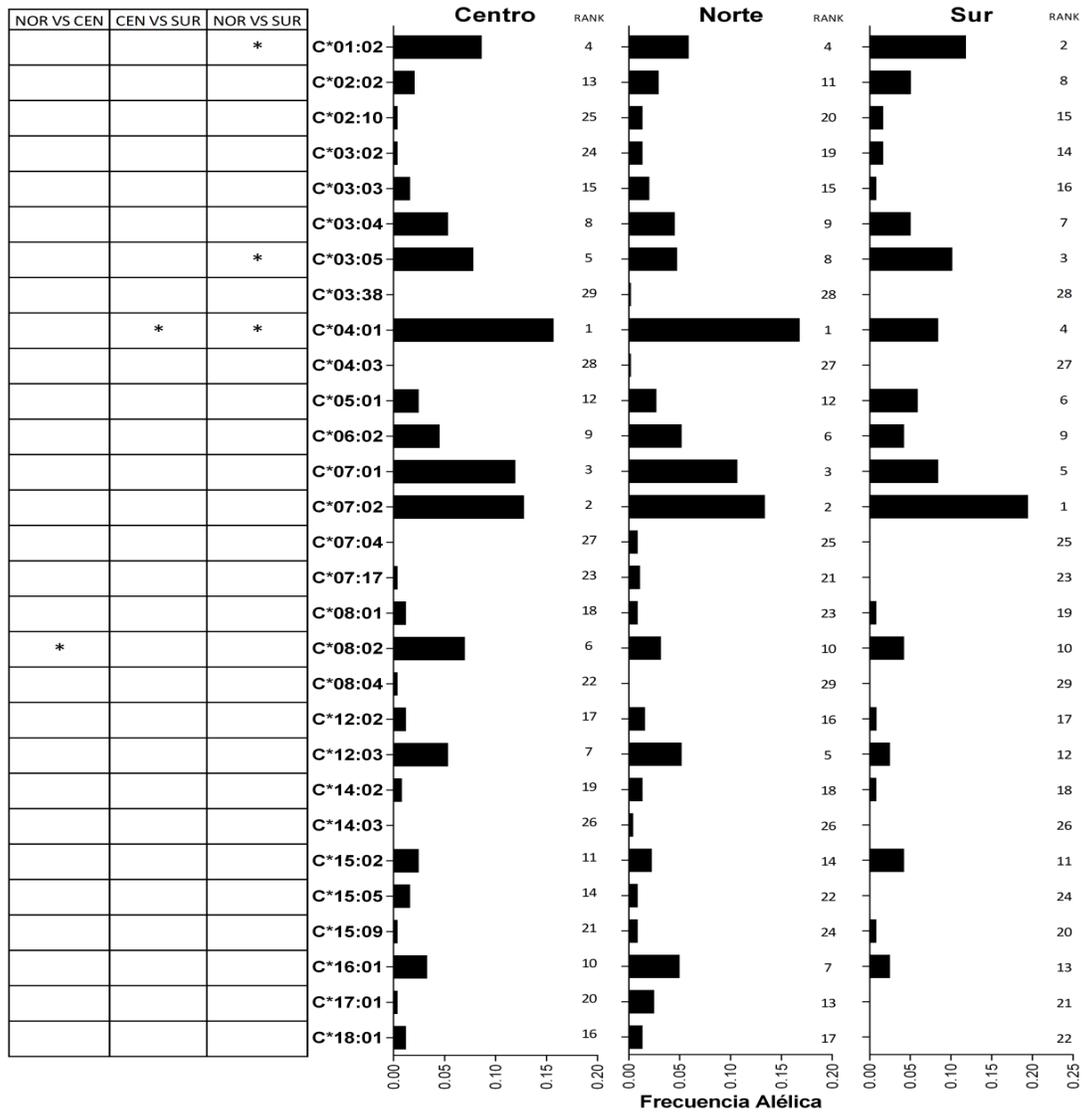


Figura 19. Comparación de las frecuencias alélicas HLA en portadores del VIH-1 procedentes de las regiones centro, norte y sur de Honduras.

A la izquierda: comparación de las frecuencias entre regiones, eje X: frecuencia alélica, eje Y: alelos HLA-C, a la derecha: el Rank (posición del alelo según frecuencia).
* valor $p < 0.05$.

4.4 RELACIÓN DE LOS ALELOS HLA DE RIESGO O PROTECCIÓN CON PARÁMETROS CLÍNICOS DE VIH

Con el objetivo de comprobar si los alelos que en otras poblaciones han sido reportados como alelos de “riesgo” ó alelos “protectores” tienen el mismo efecto en nuestra cohorte, hemos relacionado los alelos descritos por Goulder y colaboradores (Goulder & Walker, 2012) con variables analíticas que determinan la progresión a enfermedad en la infección por VIH-1 como lo son: el recuento de linfocitos T CD4+ (cel/ μ L), la determinación de carga viral (log copias/mL) y el Z-score.

Observamos que 71 individuos presentaron 14 alelos de los reportados como alelos “protectores”, entre ellos los encontrados con mayor frecuencia fueron: HLA-B*44:03, B*58:01 y B*57:03 con frecuencias alélicas en este grupo de estudio (n=71) de 22.5%, 15.4% y 7% respectivamente. En el locus A el alelo A*25:01 mostró una frecuencia de 1.4%, A*32:01 y A*74:01 ambos con 8.4% de frecuencia alélica.

Cientocuarenta y cinco individuos presentaron alelos de riesgo siendo los más frecuentes en el locus B: el alelo B*35:01 (37.2%), B*51:01 (20%) y B*07:02 (17.2%). En el locus A, se encontró el A* 36:01 con 2% de frecuencia.

Al relacionar individualmente cada uno de los alelos con la carga viral, el recuento de linfocitos T CD4+ y el Z-score, como se muestra en la figura 20, se observa una tendencia en los portadores de alelos “protectores” presentan carga viral por debajo de la mediana, recuento linfocitos T CD4+ y Z-score por encima de la mediana y en los portadores de alelos de “riesgo” ocurre lo contrario.

En cuanto a la carga viral individuos portadores de los alelos: B*14:02, B*44:03, B*52:01, B*57:01/02/03, B*58:01, B*81:01 y A*74:01 presentan carga viral por debajo de la mediana (<4.3 log), en sentido contrario los portadores de los alelos: B*35:01/02, B*45:01, B*51:01, B*53:01 y A*36:01 presentan carga viral por encima de la mediana (>4.3 log) observándose el mismo efecto que ha sido reportado en otras poblaciones.

Con respecto al recuento de linfocitos T CD4+ los portadores de los alelos B*13:02, B*14:02, B*42:01, B*44:03, B*57:01/02/03 y A*74:01 presentaron recuento de linfocitos T CD4+ arriba de la mediana (>385 cel/ μ L) y los portadores de los alelos: B*07:02, B*18:01, B*35:02, B*45:01 y B* y los alelos: B*07:02, B*18:01, B*35:02, B*45:01, B*53:01 y A*36:01 presentan recuento por debajo de la mediana (<385 cel/ μ L) lo que sugiere que estos alelos en nuestra población también presentan algún tipo de protección o riesgo en la progresión a enfermedad.

En el caso del parámetro de evolución que relaciona tanto la carga viral como el recuento de linfocitos T CD4+ denominado Z-score los portadores de los alelos: B*13:02, B*14:02, B*44:03, B*57:01/02/03 y A*74:01 presentaron un valor por encima de la mediana (>0.2), lo que se interpreta como un buen pronóstico ya que es positivo, en contraste los portadores de los alelos: B*18:01, B*35:02, B*45:01 y A*36:01 mostraron un Z-score por debajo de la mediana (<0.2) siendo este negativo lo que indica mal pronóstico en la progresión a enfermedad. Sin embargo, en ningún alelo se encontró diferencia estadísticamente significativa, esto puede explicarse debido al alto polimorfismo observado, el número de individuos que presentan estos alelos es bajo como para poder encontrar fuertes asociaciones.

Por esta razón se agruparon los 71 individuos que presentaban alelos que han sido asociado con lenta progresión a sida a los cuales hemos denominados “HLA protección” y los 145 que presentaban alelos que han sido relacionados con rápida progresión a enfermedad denominado “HLA riesgo”; y ambos grupos se compararon con 58 individuos que no presentaban ni alelos de riesgo ni alelos protectores a los que hemos denominado “el resto”; excluyendo aquellos que presentaron tanto alelos protectores como de riesgo debido a que por el efecto aditivo que presentan los alelos HLA al encontrarse en un individuo alelos protectores y de riesgo se anulan dichos efectos, por lo que en estos individuos es difícil encontrar asociación con los parámetros de evolución a enfermedad: carga viral, recuento linfocitos T CD4+ y Z-score.

Al comparar la mediana de carga viral de VIH-1, del recuento de linfocitos T CD4+, y del Z score de los “HLA protección” contra los “HLA riesgo” y “el resto”; se observó que los “HLA protección” presentan carga viral menor que la que presentan los “HLA riesgo” ($p=0.002$) y menor que la que se observa en “el resto” ($p=0.022$); recuento de linfocitos T CD4+ mayor que la que presentaron los “HLA riesgo” ($p=0.006$) y “el resto” ($p=0.021$) y Z-score positivo mayor que el valor observado en los “HLA riesgo” ($p=0.022$) y “el resto” ($p=0.0033$). Sin embargo no se encontró diferencia significativa al comparar las medianas de los parámetros antes descritos entre los portadores de alelos asociados con progresión a sida “HLA riesgo” y aquellos que no presentaron alelos asociados con progresión “el resto”.

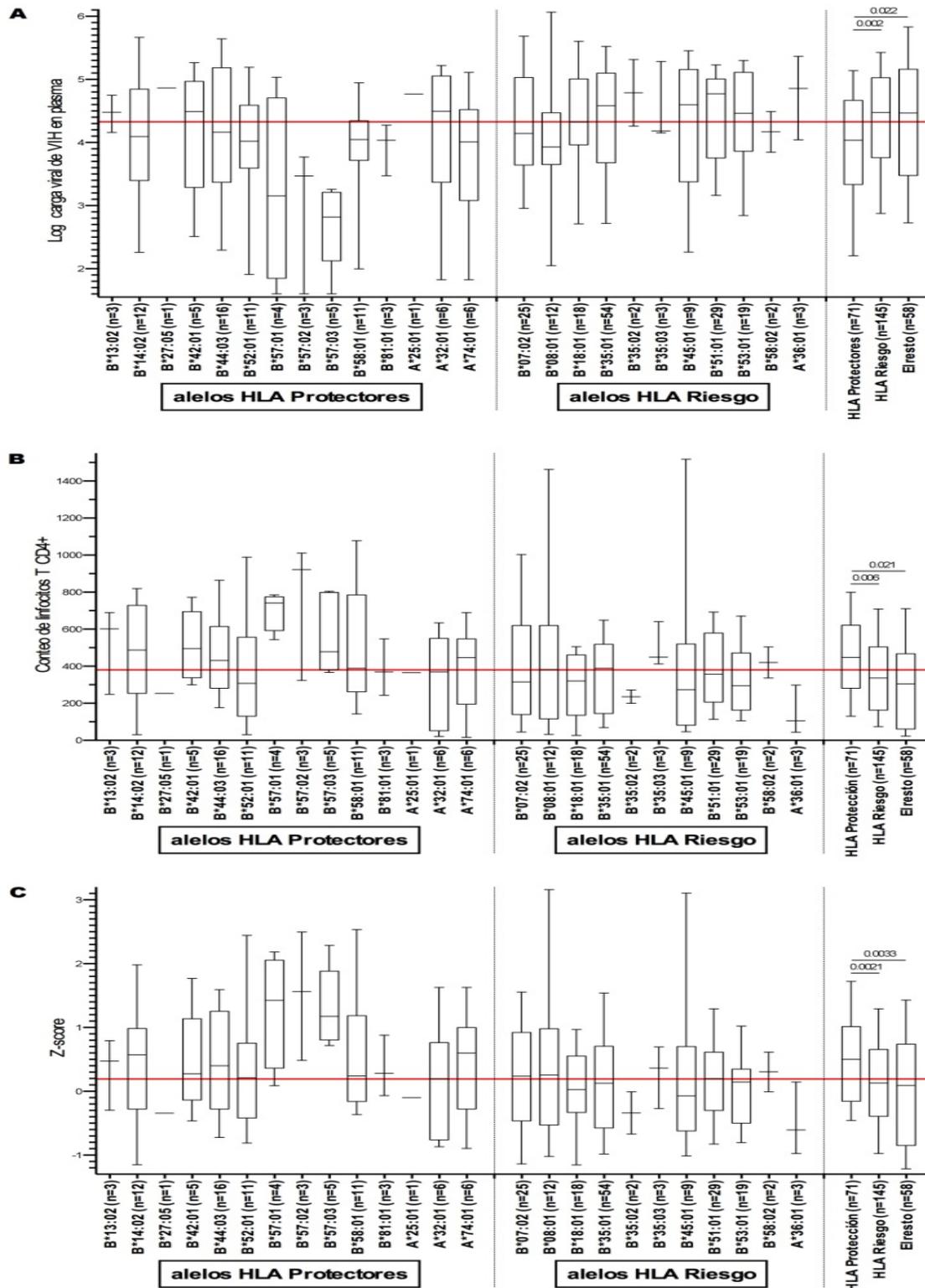


Figura 20. Relación de alelos HLA de “riesgo/protección con variables analíticas que determinan progresión a enfermedad en la infección por VIH-1.

El tamaño de la caja indica el recorrido intercuartílico, la línea media horizontal indica la mediana, las líneas exteriores indican los valores máximos y mínimos. A: Asociación de alelos HLA con carga viral plasmática, izquierda: con alelos protectores, centro: con alelos de riesgo, derecha: comparación entre grupos (“HLA protección”: individuos portadores de alelos protectores”, “HLA riesgo”: individuos portadores de alelos de riesgo” y “el resto”: individuos que no presentan alelos protectores ni de riesgo. B: Asociación de alelos HLA con el recuento de linfocitos T CD4+. C: Asociación de la variable de progresión Z-score.

4.5 DETERMINACIÓN DE FRECUENCIAS DE ALELOS HLA ASOCIADOS CON HIPERSENSIBILIDAD A FÁRMACOS ANTIRRETROVIRALES

4.5.1 Alelos HLA-B*57:01 asociado con hipersensibilidad al abacavir

En los 399 individuos que amplificaron para la genotipificación del locus HLA-B encontramos una frecuencia alélica global de 1.75% del alelo B*57:01 fuertemente asociado con síndrome de hipersensibilidad al abacavir (IC95%: 0.8-2.7%). Al comparar la frecuencia entre las poblaciones de las tres regiones, se observó que en la región norte se encontró con más frecuencia 2.5% (IC95%: 1.4-3.6%) seguido de la población del sur con 1.69% (IC95%: 0.8-2.6%) y la del centro con 0.42% (IC95%: 0-1%).

4.5.2 Alelos HLA asociados con hipersensibilidad a nevirapina

Los alelos que han sido relacionados con hipersensibilidad a nevirapina y que fueron estudiados en esta cohorte son: HLA-B*14 el cual presenta una frecuencia global de 4.7% (IC95%: 3.3-6.2%), y frecuencias de 8.75% (IC95%: 6.8-10.7%) en la población del centro, 2.73% (IC95%: 1.6- 3.9%) en la norte y 4.24% (IC95%: 2.9-5.6%) en la población del sur. Así mismo se observó una frecuencia global de 15.3% (IC95%: 12.9%-17.9%) del alelo C*04 y frecuencias de 15.7% (IC95%:

13.1-18.2%), 17% (IC95%: 14.4-19.9%) y 8.47% (IC95%: 6.6-10.4%) en las poblaciones de la región centro, norte y sur respectivamente. Otro alelo fuertemente asociado con síndrome de hipersensibilidad a nevirapina es el C*08 del cual se obtuvo una frecuencia global de 5.6% (IC95%: 4-7.2%) y en las poblaciones de las tres regiones geográficas de: 8.67% (IC95%: 6.7-10.6%) en el centro, 4.09% (IC95%: 2.7-5.5%) en el norte y 5.09% (IC95%: 3.6-6.7%) en el sur.

CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN

Este es el primer estudio a nivel nacional que describe la frecuencia de factores genéticos relacionados con la protección o progresión a enfermedad, por medio de la tipificación de alta resolución de los alelos HLA clase I (loci: A, B y C). Así mismo, constituye un esfuerzo inicial en reportar la frecuencia de la delección de 32 pares de bases en el correceptor CCR5 denominada CCR5 Δ 32 mediante la amplificación del gen CCR5 por PCR en punto final, en portadores del VIH-1 procedentes de tres regiones de Honduras que reportan las mayores prevalencias de VIH-1.

Estos factores genéticos han sido ampliamente estudiados en poblaciones caucásicas, asiáticas y africanas, logrando asociarlos con diferentes entidades clínicas. Sin embargo, existen pocos estudios que describan la frecuencia de estos polimorfismos genéticos en países Centro y Suramericanos. La población de Honduras presenta un bagaje genético heterogéneo debido a la variedad del origen de sus ancestros (amerindios, caucásicos y afrodescendientes).

El interés de este estudio descriptivo, transversal y multicéntrico radica en aportar información sobre la diversidad de estos alelos en población mestiza, como es el caso de la población hondureña, su comparación en tres poblaciones diferentes de las regiones centro, norte y sur del país; la relación de los alelos descritos como “protectores” o de “riesgo” en la progresión de la infección por VIH-1 con la carga viral, el recuento de LT CD4+ y Z-score, variables analíticas empleadas en la evaluación de la progresión a sida; además, también, la descripción de las frecuencias de los alelos HLA con implicaciones en farmacogenética. Todo ello,

hace que este estudio pueda ser de un interés especial para la comunidad científica y establecer las bases para futuros estudios de asociación, ya que por el diseño de este estudio no es posible determinar alelos HLA como “protectores” o de “riesgo”, pues para esto se necesita una cohorte de pacientes en seguimiento de por lo menos 8 años y la categorización de los pacientes en progresores crónicos, progresores rápidos o no progresores a largo plazo. Sin embargo, este estudio constituye el primer esfuerzo por describir las frecuencias de estos alelos y evaluar su relación con las variables analíticas.

5.1 CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS Y CLÍNICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

Al analizar los resultados de las variables sociodemográficas de la muestra estudiada (n=402), observamos que la mayoría de los pacientes se infectaron por el VIH-1 a una edad temprana, ya que el 70% de los pacientes pertenecen al grupo etario de 18 a 39 años; este dato coincide con los informes de la Secretaría de Salud de Honduras donde reportan que la población joven, en edad reproductiva y económicamente activa es la que está principalmente afectada por la epidemia de VIH en el país (SESAL, 2015). Más del 60% de la población analizada corresponde a individuos de bajo nivel educativo y socioeconómico, como lo indican los reportes nacionales e internacionales, este hecho dificulta el control de la epidemia ya que ésta sigue estando concentrada en grupos específicos de la población para los cuales acceder y recibir los servicios de atención médica necesarios presenta varias limitaciones (OPS, Foro 2015).

El recuento de linfocitos T CD4+ es considerado un factor pronóstico de progresión clínica y de mortalidad. Además, junto con la determinación de la carga viral, sirve para establecer si el paciente inicia el TARGA, y en el caso de pacientes que ya hayan iniciado el TARGA, sirve para evaluar la eficacia del mismo (Deeks SG et al., 1999). En el análisis de las variables analíticas, observamos que la mediana del recuento de linfocitos T CD4+ fue de 298 cel./ μ L IQR (96-509), el 40% de los participantes del estudio (n=159) presentaban recuento de linfocitos T CD4+ <200 cel./ μ L, lo que indica que este grupo de pacientes se clasifican como sida inmunológico o infección avanzada de VIH-1, y concuerda con los reportes de que en países Latinoamericanos es común que los portadores del VIH-1 se encuentren en estadios relativamente avanzados de la infección cuando acuden a los sistemas de salud (Bastos FI, et al., 2008). Siendo que nuestra cohorte es de pacientes pre tratamiento, esto sugiere que el diagnóstico tardío sigue siendo común en el país, y a pesar de las campañas de concienciación para que la poblaciones en riesgo se realicen regularmente la prueba de VIH, la población infectada sigue sin conocer su condición hasta que comienza el desarrollo de manifestaciones clínicas, cuando comienza a debilitarse su sistema inmune por la pérdida progresiva de linfocitos T CD4+.

El 26% (n=105) de los analizados presentó un recuento de linfocitos T CD4+ >500 cel./ μ L, lo que indica un buen control de la infección por parte de estos pacientes o que la infección es reciente, sin embargo, esto no se puede afirmar con certeza ya que esto representa uno de los grandes desafíos para el estudio de factores genéticos en progresión del VIH-1, que no se conoce con exactitud el tiempo de

infección, por lo tanto la clasificación de portadores en los diferentes patrones de progresión siempre representa un reto en el diseño de este tipo de estudios.

Otra variable analítica ampliamente utilizada para evaluar la evolución del VIH-1 es la determinación de carga viral plasmática. En nuestra cohorte observamos que la mediana de la carga viral fue de 4.46 log QR (3.61-5.16) equivalente a 25,000 copias/mL, cifra que es considerada como carga viral intermedia. Se espera que al iniciar terapia antirretroviral tras un período medio de 3-8 semanas baje a niveles indetectables (< 50 copias/mL). Algunos pacientes, especialmente aquellos que parten con cargas virales altas (>40,000 copias/mL), pueden tardar más de 24 semanas en lograr niveles inferiores a 50 copias/ml (Hicks C. et al, 2004). Es importante lograr que el paciente alcance determinaciones de carga viral menor de 50 copias/mL, puesto que se ha comprobado que aunque siempre sigue existiendo replicación viral en el tejido linfático, si la carga viral es inferior a esta cifra no se desarrollan mutaciones de resistencia a los fármaco antirretrovirales (Nettles RE. et al., 2004).

Tanto el recuento de linfocitos T CD4+ como la determinación de carga viral son variables indispensables para establecer si la infección está evolucionando a estadios más avanzados. Por lo general, cuando un individuo presenta altos recuentos de linfocitos T CD4+ se espera que la determinación de carga viral sea baja, y viceversa. Pero esta condición no siempre se cumple, por lo que hay personas que mantienen altos recuentos de linfocitos T CD4+, y de igual manera altas cargas virales en plasma, lo cual dificulta la interpretación de la evolución de la infección por VIH-1. Debido a este fenómeno, nos propusimos utilizar un

parámetro denominado Z-score que relaciona ambas variables y nos proporciona un resultado concreto.

El Z-score es una variable de progresión de enfermedad que relaciona el recuento de linfocitos T CD4+ y la carga viral de VIH, descrita por Garrido-Rodríguez y colaboradores. Los valores positivos (>0) se asocian con individuos de mejor pronóstico (menor progresión a sida) mayor recuento de linfocitos T CD4+ y carga viral baja; los valores de Z-score negativos (<0) representan lo contrario (Garrido-Rodríguez et al, 2016). Aplicando esta ecuación a todos los participantes, encontramos que la mediana del Z-score de nuestra cohorte fue de -0.00529 IQR ($-0.681-0.715$), que por ser negativo se interpreta como mal pronóstico de progresión a enfermedad, esto puede explicarse debido a que el diagnóstico tardío es un hecho observable a través del tiempo en la mayoría de los países de Latinoamérica.

Al igual que lo reportado por otros investigadores (Murillo et al, 2013; Ávila-Ríos et al, 2015), la mayoría de las muestras de nuestra cohorte corresponden a individuos infectados por el VIH-1 subtipo-B, con baja frecuencia de formas recombinantes.

Al estratificar los resultados por región, un dato importante a resaltar es que el recuento de linfocitos T CD4+ en los participantes de la región norte es más alto que las regiones centro y sur ($p=0.014$) (378 cel./ μ L promedio en la zona norte, 190 cel./ μ L en zona centro y 184 cel./ μ L en zona sur), presenta una carga viral intermedia equivalente a 25,000 copias/mL y un Z-score positivo cercano a 1 (0.78), indicando un mejor pronóstico en la evolución a la enfermedad.

Sin embargo, la población del centro parece ser la que presenta indicadores de mayor progresión de la infección por VIH-1, ya que la media del recuento de linfocitos T CD4+ es <200 cel./ μ L indicativo de sida inmunológico, la determinación de la carga viral es alta (4.7 log) equivalente a > 50,000 copias/mL, la mediana del Z-score de es negativo sugiriendo mal pronóstico en la progresión a enfermedad.

En resumen, podemos afirmar que los pacientes analizados en este estudio presentaron características sociodemográficas similares a las publicadas por la Secretaría de Salud de Honduras y ONUSIDA. Únicamente encontramos diferencia estadísticamente significativa entre las tres poblaciones de estudio (regiones centro, norte y sur) en el recuento de linfocitos T CD4+. Sin embargo parece haber una tendencia en las características analíticas mostrando una mayor progresión a enfermedad en la población del centro en comparación con la población del norte, donde se observa el efecto contrario.

5.2 DETERMINACIÓN DE LA FRECUENCIA DE LA DELECIÓN CCR5 Δ 32

Uno de los factores genéticos ampliamente estudiado en la progresión a enfermedad en portadores del VIH-1 corresponde a la delección encontrada en el receptor de quimiocina CCR5, una proteína que en los vertebrados está codificada por el gen CCR5, miembro de la familia de receptores de beta quimiocinas de las proteínas integrales de membrana que actúa como correceptor en la entrada del VIH a los linfocitos T CD4+ (Comerford I, & McColl R, 2011). Las cepas de VIH-1 con tropismo por monocitos y linfocitos T CD4+ activados (M-trópicas o

cepas R5), utilizan como correceptor la proteína CCR5. La delección de 32 pb de este correceptor, denominada CCR5 Δ 32, en homocigosis impide la expresión de esta proteína, y en heterocigosis disminuye la expresión de la misma; por lo que esta delección juega un papel fundamental en la progresión a enfermedad (Nelson, et al., 1997). Se ha descrito que los individuos homocigotos para esta delección se consideran resistentes a la infección por VIH-1 (al menos para las cepas R5) y aquellos que son heterocigotos progresan lentamente a sida (Marmor, et al., 2015).

La prevalencia de la delección CCR5- Δ 32 varía con los diferentes grupos étnicos. Aunque se cree que esta mutación es reciente en términos evolutivos - no mayor de dos mil quinientos años -, ha alcanzado frecuencias relativamente altas en caucásicos, donde está presente en 10-20% de pobladores del norte de Europa (Poropatich K. et al., 2011); mientras que en la población asiática las prevalencias varían de 0-12% de forma heterocigota (Pereyra F. et al., 2008). Se estima que en las poblaciones donde la delección se encuentra con mayor frecuencia, como ocurre en el norte de Europa y Asia occidental, aproximadamente el 1% de los caucásicos son homocigotos (Rodríguez-Da Silva et al., 2015).

En nuestro estudio se observó que la frecuencia global de la delección CCR5 Δ 32 en la población estudiada fue de 7.2%, en heterocigosis en todos los casos. Estos resultados coinciden con los reportes de otros países Latinoamericanos como Costa Rica, en donde se reportan frecuencias en población general de 7.6% en heterocigosis y 1.4% en homocigosis (Calvo-Flores, et al., 2014). Un estudio realizado en México por Valadez y colaboradores reportó frecuencias de 17.7% de heterocigosis en población infectada con VIH, 13.7% en individuos expuestos

seronegativos y 6.2% en población general; un dato interesante, es que al clasificar los individuos VIH positivos según su patrón de evolución, el 100% de los no progresores a largo plazo presentó la delección CCR5 Δ 32, lo que apoya el papel de este factor genético en la lenta progresión a enfermedad (Valadez, González, & Lara, 2011). En Argentina se reportan frecuencias de 15.3% en heterocigosis y 2.5% en homocigosis en población general, y en población infectada con VIH de 2.5% en heterocigosis (Motta, Cibulsky, Iliovich, & Sorrentino, 2000).

Al comparar la frecuencia de la delección CCR5 Δ 32 en las poblaciones de las tres regiones geográficas, encontramos que la zona norte presenta una frecuencia de 8.7%, seguido de la región centro con 5.7% y la sur con 5%; no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre regiones.

Al analizar las características clínicas y variables analíticas utilizadas para evaluar la progresión a enfermedad, observamos que los portadores de la delección CCR5 Δ 32 presentan cifras similares en el recuento de linfocitos T CD4+, carga viral y Z-score que el resto de la población estudiada. Llama la atención que el 62% (18/29) presentaron al menos 1 alelo HLA considerado de riesgo para progresión a enfermedad, y aun así, un subgrupo que corresponde al 38% (n=7) mantiene recuentos de linfocitos T CD4+ > 500 cel./ μ L, carga viral \leq 6 log y un Z-score positivo, por lo que es necesario dar seguimiento a este grupo de pacientes para evaluar si se comportaran como progresores lentos, como lo reporta la literatura. Además en la infección por VIH la progresión a enfermedad es un proceso complejo y multifactorial; es la interacción entre estos y otros factores lo que determina la progresión o no progresión a sida.

Un meta-análisis realizado en trabajos publicados desde 1995 hasta 2015 sobre la delección CCR5 Δ 32 en 30 poblaciones brasileñas reportó una frecuencia global de 4%, y al comparar las frecuencias entre regiones encontraron frecuencias más altas de CCR5 Δ 32 entre las poblaciones de la región Sureste donde la influencia de los europeos durante la conquista fue mayor en comparación con las del Noreste de Brasil (Silva Carvalho et al., 2016). Este mismo fenómeno puede ocurrir en nuestra cohorte, por lo que consideramos, sería de gran importancia investigar la frecuencia de CCR5 Δ 32 en población general (no infectada con VIH-1) para conocer su frecuencia en homocigosis, ya que no es de extrañarse no encontrar individuos homocigotos porque como se ha expuesto anteriormente, los individuos homocigotos se consideran resistentes a la infección por VIH-1 al menos a las cepas R5 las cuales se encuentran principalmente en los primeros estadios de la infección.

Se ha descrito que esta delección está ausente o en frecuencias muy bajas entre los africanos y amerindios (Nasir IA. et al., 2015). La ausencia o rara ocurrencia de CCR5 Δ 32 entre los nativos africanos puede ser una explicación de la alta tasa de transmisión del VIH y la carga de la enfermedad en esta población. Un estudio realizado en Camerún donde se analizan diferentes polimorfismos de los correceptores celulares utilizados por el VIH, no reporta presencia de la delección CCR5 Δ 32 en la población estudiada, sin embargo, reporta alta frecuencia de otros polimorfismos asociados con rápida progresión o mayor transmisión del VIH (Nkenfou et al., 2013).

Otro estudio realizado en infantes VIH positivos de varias poblaciones, demuestra que la población africana no solo carece de alelos protectores como CCR5 Δ 32, sino que además presenta alta frecuencia de alelos de riesgo, en esta población se encontró que la mutación CCR5-59356-T, la cual está fuertemente asociada con una mayor tasa de transmisión perinatal de VIH-1, es relativamente común en afroamericanos (20,6%) y raro en caucásicos e hispanos (3,4 y 5,6%) (Kostrikis LG. et al., 2009). Esto podría explicar que además de las conductas de riesgo, el componente genético está relacionado con la alta prevalencia del VIH-1 en población garífuna de nuestro país, la cual es uno de los grupos étnicos de afro descendientes más numeroso en Honduras, por lo que es necesario el estudio de este y otros polimorfismos asociados con progresión/ tasa de transmisión en la infección por VIH-1 en esta población.

5.3 DETERMINACIÓN DE FRECUENCIAS ALÉLICAS HLA CLASE I (A, B, C)

5.3.1 Distribución de los alelos HLA Clase I (A, B, C) en la población de estudio

El polimorfismo genético hace referencia a la existencia de múltiples alelos de un gen en una población. Es decir, un polimorfismo es una variación en la secuencia de un lugar determinado del ADN entre los individuos de una población (Bajo-Arenas et al., 2009). Al sistema HLA se le atribuye ser el sistema genético más polimórfico en los humanos, sin embargo, el nivel de polimorfismo varía en cada población, debido al bagaje genético con que cuenta cada una de estas.

Se observó que la población de estudio presenta un alto nivel polimórfico, encontrándose 140 alelos distintos, 42 alelos para el locus A, 69 variantes alélicas para el locus B y 29 para el locus C. Al comparar nuestros resultados con los reportes de otras poblaciones, encontramos que en una cohorte de 1,211 individuos VIH positivo sin tratamiento antirretroviral de Sudáfrica, en la tipificación de los alelos HLA Clase I se encontraron únicamente 65 alelos distintos: 23 para el locus A, 25 para el locus-B y 17 para el locus C (Alasdair et al., 2010), menos del 50% de las variantes encontradas en nuestra población, aun cuando la muestra es tres veces más grande.

Otro estudio realizado en población japonesa en el que se analizan 504 individuos VIH positivo asintomáticos mostró una diversidad alélica de tan solo 48 variantes: 11 para HLA-A, 22 para HLA-B, y 15 para HLA-C (Naruto et al., 2012), un tercio de la diversidad alélica encontrada en nuestra población. En un estudio realizado en Panamá por Vernaza y colaboradores en el cual se incluyeron 799 participantes de población general encontraron 61 variantes alélicas para los HLA de Clase I: 19 para el locus A, 28 para el locus B y 14 para el locus C (Vernaza et al., 2014). Estos resultados ponen de manifiesto que las 140 variantes de los alelos HLA encontrados en nuestra cohorte puede considerarse con un alto nivel de variabilidad, la alta heterogeneidad de nuestra población puede explicarse debido a la influencia de genes amerindios, caucásicos y afrodescendientes, característico de las poblaciones mestizas Latinoamericanas (Silva-Zolezzi, et al., 2009). Nuestros resultados son comparables con un estudio realizado por Garrido y colaboradores donde al determinar las frecuencias de los alelos HLA de Clase I

en 511 mestizos mexicanos VIH positivos encontraron 164 alelos distintos, 43 variantes para el locus A, 87 para el locus B y 34 para el C (Garrido et al., 2016).

Al igual que en todas las cohortes antes mencionadas, nuestra población mostró mayor diversidad alélica en el locus B, lo cual no nos sorprende ya que hasta la fecha se constituye como el locus más polimórfico del genoma humano, ya que se han descrito hasta la fecha 4,828 variantes alélicas (IMGT/HLA, 2017).

Al analizar las frecuencias de los alelos HLA en toda la población de estudio (n=402) para el locus A observamos mayor frecuencia de los alelos A*02:01 (16.8%), seguido del A*24:02 (14.1%), ambos alelos amerindios reportados en población indígena de América Latina y el alelo A*03:01 (7.5%) un alelo propio de africanos (IMGT/HLA, 2017). Para el locus B, los dos principales alelos encontrados fueron: B*35:01 (11.6%) y B*07:02 (7.0%) ambos se reportan como de distribución universal, mientras que en tercer lugar el alelo B*40:02 (6.0%), un alelo amerindio. En el locus C se observó mayor frecuencia del alelo C*04:01 (15.0%), un alelo amerindio, seguido de C*07:02 (14.1%), un alelo de origen caucásico, y el alelo C*07:01 (10.75%), reportado como de distribución universal.

Estos resultados son comparables con otros estudios realizados en poblaciones con características genéticas similares a la nuestra, en donde se determinaron las frecuencias de HLA-A y HLA-B; como la población mestiza de Colombia, (Avila-Portillo et al., 2010) población mexicana (Garrido et al., 2016), argentina (Alfaro E. et al., 2004), y panameña (Vernaza et al., 2014) que mostraron como alelos más frecuentes A*02, A*24, B*35 y B*40, además en población mexicana y panameña los alelos del locus C más frecuentes fueron C*04 y C*07, coincidiendo con nuestros hallazgos.

Comparaciones realizadas por otros investigadores han demostrado que las frecuencias alélicas HLA de las poblaciones Latinoamericanas varían sustancialmente con los reportes de poblaciones europeas, canadienses y de Estados Unidos (caucásicas). Un estudio realizado por Avila-Ríos y colaboradores demostró que de los alelos HLA-A*02, A*24, A*68, B*35, B*39, C*04 y C*08 se observaron frecuencias significativamente más altas en la cohorte mexicana comparada con las cohortes caucásicas en consonancia con los reportes de alelos típicos amerindios (Godoresky et al., 2001). Por el contrario, los alelos HLA-A*01, A*03, B*27, B*44, B*57, C*05 y C*06 se observaron en frecuencias significativamente más bajas en la cohorte mexicana en comparación con las caucásicas ($p < 0,005$, $q < 0,01$), consistente con la mayor frecuencia de estos alelos entre los caucásicos (Ávila-Ríos et al., 2009).

5.3.2 Comparación de las frecuencias alélicas HLA Clase I (A, B, C) en portadores del VIH-1 procedentes de tres regiones geográficas de Honduras

Al comparar las diferentes frecuencias de los alelos HLA en poblaciones procedentes de las regiones geográficas: centro, norte y sur del país, observamos que aunque la mayoría de la población hondureña se considera mestiza, existen algunas diferencias en las distribuciones alélicas en cada una de las regiones. En la comparación de las frecuencias alélicas HLA del locus B de la población del centro contra la del norte, encontramos diferencia estadísticamente significativa en el alelo de distribución mundial B*14:02 puesto que es más frecuente en la población del centro (7.1% vs 2.1%) ($p=0.026$ y $q=0.12$). Algo importante a mencionar es que este alelo ha sido reportado como un alelo protector en la

progresión a enfermedad en la infección por VIH-1, asociado con altos recuentos de linfocitos T CD4+ y determinaciones bajas de carga viral (Goulder & Walker, 2012).

Aunque en la mayoría de las comparaciones no fue posible establecer significación estadística debido a que se perdió el poder estadístico tras la corrección a múltiples comparaciones ($p < 0.05$, pero $q > 0.2$). No obstante, al ser este el primer reporte de frecuencias HLA en Honduras, consideramos importante reportar que encontramos la presencia de los alelos: A*03:02 (0.85%), un alelo de distribución mundial, y A*68:05 (2.54%), un alelo reportado en población amerindia en la región del sur, estos alelos no fueron encontrados en los participantes del centro. Además, se observó que el alelo altamente reportado en población afrodescendiente A*30:01 está presente en la población del norte (3.41%) y ausente en la población del sur.

En cuanto al locus B, encontramos que el alelo amerindio B*35:43 se encontró con mayor frecuencia en la población del centro al compararla con la norte (6.3% vs 2.9%), mientras que el alelo de mestizos hispanos B*35:03 presentó una frecuencia de 1.25% en la población del centro y estuvo ausente en la del norte, dato interesante ya que este alelo ha sido fuertemente asociado con mayor progresión a enfermedad (Gao X, et al, 2001); esto podría explicar porque los participantes de la región del centro presenten recuentos de linfocitos T CD4+, carga viral y Z-score indicativos de mayor progresión a enfermedad al compararlos con las demás regiones. Por el contrario, se encontró mayor frecuencia de los alelos B*39:08 (2.7% vs 0.42%), un alelo amerindio y reportado únicamente en

población Centroamericana y B*57:01 (2.5% vs 0.42%) un alelo caucásico reportado como un alelo protector, asociado con altos recuentos de linfocitos T CD4+ en la población del norte respecto a la del centro; lo cual puede explicar que los participantes de la región norte presentan mayores recuentos de linfocitos T CD4+ en comparación con las regiones centro y sur ($p=0.014$), y sugiere que en nuestra cohorte, este alelo parece mostrar el mismo efecto protector que en otras poblaciones donde ha sido estudiado. Además, se observó frecuencia aumentada del alelo amerindio B*40:02 (11% vs 4.3%), en la población del sur comparada con la del norte.

Con respecto al locus C, el alelo caucásico C*08:02 (7% vs 3.2%) parece ser más frecuente en la población del centro en comparación con la del norte; y el alelo amerindio C*04:01 fue más frecuente en la región del centro (15.7% vs 8.5%) en comparación con la del sur. Además, se encontró mayor frecuencia de los alelos amerindios C*01:02 (11.9% vs 5.9%) y C*03:05 (10.2% vs 4.7%) en la región del sur al compararla con la del norte. Estos resultados ponen en evidencia la alta heterogeneidad de los alelos HLA en la población hondureña, y se demuestra la importancia del estudio de estos alelos en poblaciones de las diferentes regiones del país, ya que la distribución de estas frecuencias está muy relacionada con el origen étnico y ancestral de las poblaciones. Los diferentes patrones genéticos observados en estas tres regiones puede explicarse debido al mestizaje, el cual ha sido profundamente influenciado por las diferencias en las densidades de población y crecimiento demográfico debido a causas sociales y económicas propias de cada región (Silva-Zolezzi, et al., 2009). Por lo que cada población de

determinada región tiene su propio repertorio genético representado por estos alelos, hecho que es importante conocer debido a que la diversidad genética tiene implicaciones en cómo responden las diferentes poblaciones a las enfermedades infecciosas y no infecciosas.

5.4 RELACIÓN DE LOS ALELOS HLA DE RIESGO Ó PROTECCIÓN CON PARÁMETROS CLÍNICOS DE VIH-1

Es importante destacar que varios de los alelos encontrados en alta frecuencia en esta población han sido ampliamente estudiados y asociados con progresión a enfermedad en individuos portadores del VIH-1. Recientemente se ha asociado en adultos al alelo A*24:02 como un alelo de rápida progresión a sida (Adland, et al., 2015), el cual es el segundo alelo con mayor frecuencia en nuestra cohorte (14.2%). Un dato interesante es que de los 69 alelos encontrados en el locus B, el alelo B*35:01 es el más frecuente en nuestra cohorte (11.6%) y ha sido reportado en diferentes estudios como un alelo de riesgo ya que se relaciona con altos niveles de carga viral, bajos recuentos de linfocitos T CD4+ y consecuentemente una rápida progresión a sida (Fellay, et al., 2009). Además, se encontró en 4% la presencia del alelo B*35:43 considerada una variante autóctona, que se ha reportado en altas frecuencias en poblaciones latinoamericanas y es definido como un alelo amerindio (IMGT/HLA, 2017). Aunque todavía este alelo no ha sido asociado como alelo de riesgo o protección, es importante que se reporte su frecuencia para estudios posteriores de asociación con progresión a enfermedad. Nuestros hallazgos (alta frecuencia de alelos de riesgo y baja de alelos protectores) son comparables con poblaciones que tienen características similares

a la nuestra. Un estudio en México reportó alta frecuencia de B*35:01, alelo que está asociado con altos niveles de carga viral y rápida progresión a sida (Juarez-Molina, et al., 2014). Sin embargo, los alelos que se asocian como alelos protectores por permitir un mejor control de la infección por VIH como el alelo B*27 y B*57 se encontraron en baja frecuencia: 1.25% y 2.5%, respectivamente. Estos datos coinciden con los de países como Colombia y Bolivia donde se observan frecuencias menores a 2%. En general entre la población hispana se observa un patrón similar en cuanto a la presencia de estos alelos; alta frecuencia de B*35 y baja de B*27 y B*57 (Arrunategui, Villegas, Ocampo, Rodríguez, & Badih, 2013) (Quispe & Sosa, 2012) los cuales constituyen la triada alélica HLA en la progresión/protección a enfermedad mejor descritas en todo el mundo en relación a la infección por VIH-1. Otro estudio realizado por Juárez-Molina y colaboradores comparó las frecuencias de alelos protectores (HLA-B*27/57/58:01/81:01) en población mestiza (México) y población de las Antillas con gran influencia anglosajona (Barbados), obteniendo frecuencias de 8% y 34% respectivamente (Juarez-Molina, et al., 2014).

Al relacionar los alelos ya reportados por la literatura como alelos de “riesgo” por favorecer una rápida depleción de las células del sistema inmune y aumento de la replicación viral como los alelos B*35, B*07:02, B*51:01 y los alelos “protectores” como B*27, B*57 y B*52 descritos por (Goulder & Walker, 2012) con los parámetros de pronóstico clínico antes mencionados, ninguno de ellos mostró diferencia estadísticamente significativa en sí mismo. Probablemente porque las frecuencias de estos alelos en nuestra cohorte fueron bajas y no permitió encontrar significación estadística.

Una de las limitaciones de este estudio fue el tamaño de la muestra, aunque el cálculo de la muestra se realizó mediante fórmula estadística (intervalo de confianza del 90%), debido al alto grado de polimorfismo que muestran estos alelos se recomiendan realizar estudios en grandes cohortes para poder obtener datos para un análisis de asociación.

Sin embargo, es importante resaltar que nuestros hallazgos muestran diferencia estadísticamente significativa cuando se comparan las variables analíticas de progresión (recuento de linfocitos T CD4+, carga viral y Z-score) del grupo de pacientes que mostraron tener solo alelos protectores denominados “HLA protección” y compararlos con aquellos que únicamente presentan alelos de riesgo “HLA riesgo” y el grupo de los que presentaban alelos no relacionados con progresión a enfermedad denominados “el resto”. Poniendo en evidencia que estos alelos al igual que en otras poblaciones parecen tener el mismo efecto protector en nuestra población. Sin embargo no es posible establecer la misma conclusión con los alelos de riesgo, ya que no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre el grupo “HLA riesgo” y “el resto”.

5.5 DETERMINACIÓN DE FRECUENCIAS DE ALELOS HLA ASOCIADOS CON HIPERSENSIBILIDAD A FÁRMACOS ANTIRRETROVIRALES

Se estima que la frecuencia de hipersensibilidad relacionada con fármacos en pacientes VIH-1 positivo es 100 veces mayor que en la población general. Estos efectos adversos a los medicamentos antirretrovirales tienen origen multifactorial,

pueden influenciar factores como: la hiperactivación inmune, los cambios en los perfiles de citoquinas, estrés oxidativo, el metabolismo de fármacos, y también una predisposición genética del individuo que lo haga vulnerable a desarrollar dichos efectos (Pirmohamed M. et al, 2001).

El síndrome de hipersensibilidad al abacavir se observa hasta en el 10% de los pacientes bajo este régimen, se manifiesta como un cuadro multisistémico caracterizado por fiebre, malestar general, exantema, síntomas gastrointestinales y respiratorios. Estos signos y síntomas se suelen producir durante las primeras seis semanas tras el inicio del tratamiento y se resuelven rápidamente una vez se suspende el mismo. La reacción no obstante puede ser potencialmente mortal si se produce una re-exposición al fármaco en pacientes que hayan desarrollado una reacción de hipersensibilidad previa.

Además de estar relacionados con progresión a enfermedad, los alelos HLA se relacionan con reacciones adversas a los fármacos antirretrovirales que se utilizan en el tratamiento del VIH, uno de los más estudiados es el alelo HLA-B*57:01 fuertemente asociado con la hipersensibilidad al abacavir. Un estudio en población española mostró que el 23.1% de los pacientes a los que se les administró abacavir y presentaron reacción de hipersensibilidad presentaban el alelo B*57:01 (Pérez, Milla, Soler, Flores, & Sarria, 2009), en otro estudio realizado en Portugal se encontró que el 53% de los pacientes que discontinuaron tratamiento con abacavir por presentar reacciones adversas presentaban el alelo B:57:01 (Carolina, et al., 2016).

El alelo HLA-B*57:01 se encuentra probablemente en la mayoría de los grupos étnicos. Sin embargo, se ha encontrado en baja frecuencia (<1%) en poblaciones coreanas, afrodescendientes y amerindias. Estudios demográficos de factores de riesgo han demostrado que la hipersensibilidad a ese medicamento está ligada a la etnia, presentando los individuos de origen caucásico un alto riesgo (5-8%). Sin embargo, existen pocos estudios de la prevalencia de HLA-B*5701 en cohortes Latinoamericanas.

En nuestro estudio encontramos una frecuencia alélica de 1.75%, la cual es baja comparada con las frecuencias encontradas en España, 7.3% (Montes-Ares et al, 2015) y 7.6% (Rodríguez-Da Silva et al, 2015).

Un ensayo clínico multicéntrico denominado PREDICT-1 estableció la eficacia del tamizaje prospectivo del HLA-B*57:01 en la prevención del síndrome de hipersensibilidad al abacavir con valores predictivos positivos y negativos de 100% (Mallal, et al., 2008). Esto determinó, que desde 2008, la FDA emitiera la recomendación de realizar de rutina el cribado del alelo B*57:01 previo al tratamiento con abacavir, eventualmente limitada por su disponibilidad, costo, y la población estudiada ya que la frecuencia varía dependiendo de la región. Al ser el abacavir un fármaco comunmente utilizado como primera línea de tratamiento antirretroviral en el país, es importante realizar un estudio que valore la utilidad clínica de la determinación del alelo HLA-B*57:01 para prevenir la incidencia de reacciones de hipersensibilidad al abacavir.

Después de la hipersensibilidad al abacavir, el síndrome de hipersensibilidad a nevirapina es el segundo efecto adverso más común en los portadores del VIH bajo TARGA. Este síndrome se asocia con erupción cutánea, fiebre, eosinofilia, adenopatías y alteraciones de las transaminasas (Knudtson E. et al., 2003). Se presenta en los primeros 2 meses de tratamiento, con una mediana entre 2 y 6 semanas tras la primera dosis. Los síntomas iniciales son la erupción cutánea y la fiebre. Posteriormente el paciente desarrolla adenopatías, artritis, mialgias, manifestaciones viscerales (hepáticas) y alteraciones hematológicas como leucocitosis, eosinofilia y linfocitosis atípica, presenta una mortalidad de un 10%, fundamentalmente en relación con la alteración hepática (Marcos-Bravo et al., 2007).

Los alelos HLA-C*04 encontrados en alta frecuencia en nuestra cohorte (15.7%) y HLA-C*08 (5.6%) han mostrado asociación robusta con las reacciones de hipersensibilidad a nevirapina en afroamericanos, chinos (Pavlos R, Mallal S, Phillips E, 2012) y población tailandesa en donde se observó significativamente más frecuente en los casos de erupción inducida por nevirapina que en el grupo tolerante a nevirapina, con frecuencias de 20.51% y 7.50%, respectivamente, (Sirirat Likanonsakul et al., 2009).

Un estudio de caso control realizado en Japón reveló que la frecuencia de los pacientes con HLA-C*08 positivos en el grupo con hipersensibilidad a la nevirapina fue del 42%, significativamente superior a la del grupo tolerante a la nevirapina (10%) y a la población general japonesa (9-14%) (Gatanaga, Hiroyuki et al, 2007).

Aunque la información de nuestro trabajo es limitada ya que únicamente se describen las frecuencias de estos alelos con implicaciones farmacogenéticas en

la población de estudio, consideramos pueden ser la base para futuros estudios de asociación con las reacciones adversas a los fármacos antirretrovirales convencionales, y comenzar el desarrollo de la farmacogenética en el país, ya que estos alelos han sido fuertemente asociados con reacciones adversas a antibióticos y otros fármacos.

CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES

- Nuestro estudio es el primer reporte de la frecuencia de los marcadores genéticos involucrados en la progresión a enfermedad en la población infectada con el VIH-1 de Honduras, encontrándose una frecuencia de 7.2% para la delección CCR5 Δ 32, alto nivel de polimorfismo en la tipificación de los alelos HLA, y diferencias sustanciales en las frecuencias alélicas entre las tres poblaciones en estudio procedentes de las regiones centro, norte y sur del país.
- Encontramos que nuestra cohorte presenta alta frecuencia de alelos de riesgo: 14.2% para A*24 y 11.6% para B*35 mientras que las frecuencias de los alelos de protección fueron bajas 2.5% para B*57 y 1.24% para B*27.
- Coincidiendo con los reportes en otras poblaciones, se encontró que el grupo de personas con alelos protectores presentaron mayor recuento de linfocitos T CD4+ y menor carga viral y Z-score positivo (mejor pronóstico) que los que presentaban alelos de riesgo ($p=0.006$, 0.002 y 0.0021 respectivamente).
- Se encontró baja frecuencia del alelo B*57:01 (1.75%) asociado con síndrome de hipersensibilidad al abacavir y alta frecuencia de los alelos B*14 (4.7%), C*04 (15.7%) y C*08 (5.6%) asociados con hipersensibilidad a la nevirapina, ambos fármacos utilizados en los esquemas nacionales de tratamiento antirretroviral.
- Consideramos que estos hallazgos son de suma importancia ya que por medio de la identificación de estos alelos podríamos predecir de alguna manera la

progresión a enfermedad (sida) y el desarrollo de reacciones adversas a los medicamentos utilizados en la terapia contra el VIH-1.

CAPÍTULO 7. RECOMENDACIONES

- Es necesario continuar estudios de este tipo, ampliando el tamaño de la muestra, para conocer con mayor exactitud la frecuencia de la delección CCR5 Δ 32, tanto en heterocigosis como en homocigosis en la población hondureña.
- Se recomienda realizar estudios sobre las implicaciones farmacogenéticas de los alelos HLA: B*57:01, B*14, C*04 y C*08 en nuestra población y para determinar si es necesario la implementación de pruebas de tamizaje previas al tratamiento con fármacos antirretrovirales como abacavir y nevirapina.
- Realizar estudios de asociación para determinar si los alelos HLA propios de la población latinoamericana (amerindios) que no han sido estudiados, pueden tener un efecto en la progresión a enfermedad en los portadores del VIH-1.
- Es necesario continuar estudios de la variabilidad genética de la población hondureña, principalmente de genes del sistema HLA los cuales son de interés médico por su importancia en la investigación relacionada con trasplantes, enfermedades infecciosas y autoinmune. Por lo que se debe implementar la tecnología a nivel local que permita tener independencia para realizar estudios de esta naturaleza.

CAPÍTULO 8. LIMITACIONES

- Pequeño tamaño de la muestra que impidió alcanzar significación estadística al relacionar los alelos reportados como “protectores” y de “riesgo” con las variables analíticas que evalúan la progresión a enfermedad.
- Inicialmente se pensó incluir muestras de los años 2016 y 2017 e implementar la técnica en el país, pero por problemas de adquisición de reactivos del exterior y las limitaciones del sistema de compras de la UNAH, no se ha logrado implementar la tecnología de genotipificación de los HLA. Sin embargo, se cuenta con muestras colectados en estos años para posterior análisis.
- El diseño del estudio no permite determinar alelos HLA como “protectores” o de “riesgo” pues para esto se necesitan estudios de asociación con cohortes de pacientes en seguimiento de por lo menos 8 años y la categorización de los pacientes en progresores crónicos, progresores rápidos o no progresores a largo plazo.

CAPÍTULO 9. REFERENCIAS

- Abbas Abul K, L.A.H., Pillai Shiv., 2012. Inmunología celular y molecular.
- AIDS., D.P.o.A.W.G.o.t.O.o., 2011. Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents. Research Advisory Council.
- Allen, T.M., O'Connor, D.H., Jing, P., Dzuris, J.L., Mothé, B.R., Vogel, T.U., Dunphy, E., Liebl, M.E., Emerson, C., Wilson, N., Kunstman, K.J., Wang, X., Allison, D.B., Hughes, A.L., Desrosiers, R.C., Altman, J.D., Wolinsky, S.M., Sette, A., Watkins, D.I., 2000. Tat-specific cytotoxic T lymphocytes select for SIV escape variants during resolution of primary viraemia. *Nature* 407, 386-390.
- Bailey, J.R., Zhang, H., Wegweiser, B.W., Yang, H.-C., Herrera, L., Ahonkhai, A., Williams, T.M., Siliciano, R.F., Blankson, J.N., 2007. Evolution of HIV-1 in an HLA-B*57-Positive Patient during Virologic Escape. *Journal of Infectious Diseases* 196, 50-55.
- Barre-Sinoussi, F., Chermann, J., Rey, F., Nugeyre, M., Chamaret, S., Gruest, J., Dautet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., Montagnier, L., 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220, 868-871.
- Bello, G., Casado, C., Sandonis, V., Alonso-Nieto, M., Vicario, J.L., García, S., Hernando, V., Rodríguez, C., Romero, J.d., López-Galíndez, C., 2005. A subset of human immunodeficiency virus type 1 long-term non-progressors is characterized by the unique presence of ancestral sequences in the viral population. *Journal of General Virology* 86, 355-364.
- Betts, M.R., Ambrozak, D.R., Douek, D.C., Bonhoeffer, S., Brenchley, J.M., Casazza, J.P., Koup, R.A., Picker, L.J., 2001. Analysis of Total Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Specific CD4(+) and CD8(+) T-Cell Responses: Relationship to Viral Load in Untreated HIV Infection. *Journal of Virology* 75, 11983-11991.
- Blankson, J.N., Bailey, J.R., Thayil, S., Yang, H.-C., Lassen, K., Lai, J., Gandhi, S.K., Siliciano, J.D., Williams, T.M., Siliciano, R.F., 2007. Isolation and Characterization of Replication-Competent Human Immunodeficiency Virus Type 1 from a Subset of Elite Suppressors. *Journal of Virology* 81, 2508-2518.
- Brown, J.H., Jardetzky, T.S., Gorga, J.C., Stern, L.J., Urban, R.G., Strominger, J.L., Wiley, D.C., 1993. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 364, 33-39.
- Buckheit, R.W., Allen, T.G., Alme, A., Salgado, M., O'Connell, K.A., Huculak, S., Falade-Nwulia, O., Williams, T.M., Gallant, J.E., Siliciano, R.F., Blankson, J.N., 2012. Host factors dictate control of viral replication in two HIV-1 controller/chronic progressor transmission pairs. *Nat Commun* 3, 716.
- Buchbinder, S.P., Katz, M.H., Hessel, N.A., O'Malley, P.M., Holmberg, S.D., 1994. Long-term HIV-1 infection without immunologic progression. *AIDS* 8.
- Cabaleiro, T., Prieto-Pérez, R., Ochoa, D., Abad-Santos, F., 2013. Aplicación de la farmacogenómica y otras nuevas tecnologías al desarrollo de medicamentos. *Medicina Clínica* 140, 558-563.

Calugi, G., Montella, F., Favalli, C., Benedetto, A., 2006. Entire Genome of a Strain of Human Immunodeficiency Virus Type 1 with a Deletion of nef That Was Recovered 20 Years after Primary Infection: Large Pool of Proviruses with Deletions of env. *Journal of Virology* 80, 11892-11896.

Carrière, M., Lacabaratz, C., Kök, A., Benne, C., Jenabian, M.-A., Casartelli, N., Hüe, S., Hocqueloux, L., Lelièvre, J.-D., Lévy, Y., 2014. HIV "Elite Controllers" Are Characterized by a High Frequency of Memory CD8⁺CD73⁺ T Cells Involved in the Antigen-Specific CD8⁺ T-cell Response. *Journal of Infectious Diseases* 209, 1321-1330.

Carroll, M.C., Palsdottir, A., Belt, K.T., Porter, R.R., 1985. Deletion of complement C4 and steroid 21-hydroxylase genes in the HLA class III region. *The EMBO Journal* 4, 2547-2552.

Carter Jonh B. , S.V.A., 2007. *Virology principles and applications*. Wiley

Casado, C., García, S., Rodríguez, C., del Romero, J., Bello, G., López-Galíndez, C., 2001. Different evolutionary patterns are found within human immunodeficiency virus type 1-infected patients. *Journal of General Virology* 82, 2495-2508.

Casado, G., Thomson, M.M., Sierra, M., Nájera, R., 2005. Identification of a Novel HIV-1 Circulating ADG Intersubtype Recombinant Form (CRF19_cpx) in Cuba. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 40, 532-537.

CDC, 1993 Revised Classification System for HIV Infection and Expanded Surveillance Definition for AIDS Among Adolescents and Adults," *Morbidity and Mortality Weekly*, pp. pp. 1-19.

Coloccini, R.S., Dileria, D., Ghiglione, Y., Turk, G., Laufer, N., Rubio, A., Socías, M.E., Figueroa, M.I., Sued, O., Cahn, P., Salomón, H., Mangano, A., Pando, M.Á., 2014. Host Genetic Factors Associated with Symptomatic Primary HIV Infection and Disease Progression among Argentinean Seroconverters. *PLoS ONE* 9, e113146.

Consortium, M.S., 1999. Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. *Nature* 401, 921-923.

Cullen, B.R., 1991. Human immunodeficiency virus as a prototypic complex retrovirus. *Journal of Virology* 65, 1053-1056.

de Araújo, C., de Carvalho, C.V., de Souza Freire, M.E., Yamaguti, A., Scaff, I.C., de Souza, F.J., Silva, F.G.S., Diaz, R.S., da Silva, I.D.C.G., 2014. Prevalence of Human Leukocyte Antigen HLA-B* 5701 in HIV-1 Infected Individuals in Brazil. *Open Journal of Genetics* 2014.

de Sorrentino, A.H., Marinic, K., Motta, P., Sorrentino, A., López, R., Illiovich, E., 2000. HLA class I alleles associated with susceptibility or resistance to human immunodeficiency virus type 1 infection among a population in Chaco Province, Argentina. *Journal of Infectious Diseases* 182, 1523-1526.

Deeks, S.G., Walker, B.D., 2007. Human Immunodeficiency Virus Controllers: Mechanisms of Durable Virus Control in the Absence of Antiretroviral Therapy. *Immunity* 27, 406-416.

Dyer, W.B., Zaunders, J.J., Yuan, F.F., Wang, B., Learmont, J.C., Geczy, A.F., Saksena, N.K., McPhee, D.A., Gorry, P.R., Sullivan, J.S., 2008. Mechanisms of HIV non-progression; robust and sustained CD4⁺ T-cell proliferative responses to p24 antigen correlate with control of viraemia and lack of disease progression after long-term transfusion-acquired HIV-1 infection. *Retrovirology* 5, 1-14.

Gallo, R., Salahuddin, S., Popovic, M., Shearer, G., Kaplan, M., Haynes, B., Palker, T., Redfield, R., Oleske, J., Safai, B., et al., 1984. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* 224, 500-503.

Gao, X., Nelson, G.W., Karacki, P., Martin, M.P., Phair, J., Kaslow, R., Goedert, J.J., Buchbinder, S., Hoots, K., Vlahov, D., O'Brien, S.J., Carrington, M., 2001. Effect of a Single Amino Acid Change in MHC Class I Molecules on the Rate of Progression to AIDS. *New England Journal of Medicine* 344, 1668-1675.

Gao, X., O'Brien, T.R., Welzel, T.M., Marti, D., Qi, Y., Goedert, J.J., Phair, J., Pfeiffer, R., Carrington, M., 2010. HLA-B alleles associate consistently with HIV heterosexual transmission, viral load and progression to AIDS, but not susceptibility to infection. *AIDS (London, England)* 24, 1835-1840.

Gottlieb, M.S., Schroff, R., Schanker, H.M., Weisman, J.D., Fan, P.T., Wolf, R.A., Saxon, A., 1981. Pneumocystis carinii Pneumonia and Mucosal Candidiasis in Previously Healthy Homosexual Men. *New England Journal of Medicine* 305, 1425-1431.

Grabar, S., Selinger-Leneman, H., Abgrall, S., Pialoux, G., Weiss, L., Costagliola, D., 2009. Prevalence and comparative characteristics of long-term nonprogressors and HIV controller patients in the French Hospital Database on HIV. *AIDS* 23, 1163-1169.

Hersh, E.M., Harris, J.E., 1968. Macrophage-lymphocyte interaction in the antigen-induced blastogenic response of human peripheral blood leukocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 100, 1184-1194.

Huang, J., Goedert, J.J., Sundberg, E.J., Cung, T.D.H., Burke, P.S., Martin, M.P., Preiss, L., Lifson, J., Lichterfeld, M., Carrington, M., 2009. HLA-B* 35-Px-mediated acceleration of HIV-1 infection by increased inhibitory immunoregulatory impulses. *J. Exp. Med* 206, 2959-2966.

InfoSIDA, 2015. Vision general de la infeccion por el VIH, las fases de la infeccion.

JEANG, K.-T., BERKHOUT, B., DROPULIC, B., 1993. Effects of integration and replication on transcription of the HIV-1 long terminal repeat. *The Journal of biological chemistry* 268, 24940-24949.

Jin, X., Gao, X., Ramanathan Jr, M., Deschenes, G.R., Nelson, G.W., O'Brien, S.J., Goedert, J.J., Ho, D.D., O'Brien, T.R., Carrington, M., 2002. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific CD8+-T-cell responses for groups of HIV-1-infected individuals with different HLA-B* 35 genotypes. *Journal of virology* 76, 12603-12610.

Juarez-Molina, C.I., Payne, R., Soto-Nava, M., Avila-Rios, S., Valenzuela-Ponce, H., Adland, E., Leitman, E., Brener, J., Muenchhoff, M., Branch, S., Landis, C., Reyes-Teran, G., Goulder, P., 2014. Impact of HLA Selection Pressure on HIV Fitness at a Population Level in Mexico and Barbados. *Journal of Virology* 88, 10392-10398.

Klein, J., Sato, A., 2000. The HLA System. *New England Journal of Medicine* 343, 702-709.

Klimkait, T., Strebel, K., Hoggan, M.D., Martin, M.A., Orenstein, J.M., 1990. The human immunodeficiency virus type 1-specific protein vpu is required for efficient virus maturation and release. *Journal of Virology* 64, 621-629.

Kløverpris, H.N., Adland, E., Koyanagi, M., Stryhn, A., Harndahl, M., Matthews, P.C., Shapiro, R., Walker, B.D., Ndung'u, T., Brander, C., 2014. HIV subtype influences HLA-B* 07: 02-associated HIV disease outcome. *AIDS research and human retroviruses* 30, 468-475.

Koup, R.A., Safrit, J.T., Cao, Y., Andrews, C.A., McLeod, G., Borkowsky, W., Farthing, C., Ho, D.D., 1994. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *Journal of Virology* 68, 4650-4655.

Lajoie, J., Juno, J., Burgener, A., Rahman, S., Mogk, K., Wachihhi, C., Mwanjewe, J., Plummer, F.A., Kimani, J., Ball, T.B., Fowke, K.R., 2012. A distinct cytokine and chemokine profile at the genital mucosa is associated with HIV-1 protection among HIV-exposed seronegative commercial sex workers. *Mucosal Immunol* 5, 277-287.

Liu, R., Paxton, W.A., Choe, S., Ceradini, D., Martin, S.R., Horuk, R., MacDonald, M.E., Stuhlmann, H., Koup, R.A., Landau, N.R., 1996. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* 86, 367-377.

López, M.T.R., Hernández, P.A.V., Sáenz, L.Y.A., 2012. Antígenos leucocitarios humanos y su asociación con resistencia/susceptibilidad a la infección por el VIH-1. *Iatreia* 25, 54-64.

Louisirirochanakul, S., Liu, H., Roongpisuthipong, A., Nakayama, E.E., Takebe, Y., Shioda, T., Wasi, C., 2002. Genetic analysis of HIV-1 discordant couples in Thailand: association of CCR2 64I homozygosity with HIV-1-negative status. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)* 29, 314-315.

Lum, J.J., Cohen, O.J., Nie, Z., Weaver, J.G., Gomez, T.S., Yao, X.-J., Lynch, D., Pilon, A.A., Hawley, N., Kim, J.E., Chen, Z., Montpetit, M., Sanchez-Dardon, J., Cohen, E.A., Badley, A.D., 2003. Vpr R77Q is associated with long-term nonprogressive HIV infection and impaired induction of apoptosis. *Journal of Clinical Investigation* 111, 1547-1554.

Mallal, S., Phillips, E., Carosi, G., Molina, J.-M., Workman, C., Tomažič, J., Jägel-Guedes, E., Rugina, S., Kozyrev, O., Cid, J.F., Hay, P., Nolan, D., Hughes, S., Hughes, A., Ryan, S., Fitch, N., Thorborn, D., Benbow, A., 2008. HLA-B*5701 Screening for Hypersensitivity to Abacavir. *New England Journal of Medicine* 358, 568-579.

Marmor, M., Sheppard, H.W., Donnell, D., Bozeman, S., Celum, C., 2001. Homozygous and Heterozygous CCR5-[DELTA]32 Genotypes Are Associated With Resistance to HIV Infection. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 27, 472-481.

McDermott, D.H., Zimmerman, P.A., Guignard, F., Kleeberger, C.A., Leitman, S.F., Murphy, P.M., 1998. CCR5 promoter polymorphism and HIV-1 disease progression. *The Lancet* 352, 866-870.

Mingari, M.C., Schiavetti, F., Ponte, M., Vitale, C., Maggi, E., Romagnani, S., Demarest, J., Pantaleo, G., Fauci, A.S., Moretta, L., 1996. Human CD8+ T lymphocyte subsets that express HLA class I-specific inhibitory receptors represent oligoclonally or monoclonally expanded cell populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93, 12433-12438.

Miura, T., Brockman, M.A., Schneidewind, A., Lobritz, M., Pereyra, F., Rathod, A., Block, B.L., Brumme, Z.L., Brumme, C.J., Baker, B., 2009. HLA-B57/B* 5801

human immunodeficiency virus type 1 elite controllers select for rare gag variants associated with reduced viral replication capacity and strong cytotoxic T-lymphocyte recognition. *Journal of virology* 83, 2743-2755.

Moss, A.R., Bacchetti, P., 1989. Natural history of HIV infection. *AIDS* 3, 55-62.

MUÑOZ, A., WANG, M.-C., BASS, S., TAYLOR, J.M.G., KINGSLEY, L.A., CHMIEL, J.S., POLK, B.F., 1989. ACQUIRED IMMUNODEFICIENCY SYNDROME (AIDS)-FREE TIME AFTER HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE 1 (HIV-1) SEROCONVERSION IN HOMOSEXUAL MEN. *American Journal of Epidemiology* 130, 530-539.

Naruto, T., Gatanaga, H., Nelson, G., Sakai, K., Carrington, M., Oka, S., Takiguchi, M., 2012. HLA Class I-Mediated Control of HIV-1 in the Japanese Population, in Which the Protective HLA-B*57 and HLA-B*27 Alleles Are Absent. *Journal of Virology* 86, 10870-10872.

Okulicz, J.F., Marconi, V.C., Landrum, M.L., Wegner, S., Weintrob, A., Ganesan, A., Hale, B., Crum-Cianflone, N., Delmar, J., Barthel, V., Quinnan, G., Agan, B.K., Dolan, M.J., Group, t.I.D.C.R.P.H.W., 2009. Clinical Outcomes of Elite Controllers, Viremic Controllers, and Long-Term Nonprogressors in the US Department of Defense HIV Natural History Study. *Journal of Infectious Diseases* 200, 1714-1723.

ONUSIDA, 2008. Informe sobre la epidemia mundial del sida.

ONUSIDA, 2012. Informe Mundial de Avances en la lucha contra SIDA, 2012.

ONUSIDA, 2015a. Reporte Mundial VIH/SIDA 2015.

ONUSIDA, 2015b. Situación de la epidemia del VIH en América Latina en 2014.

Patrick R. Murray, K.S.R., Michael A. Pfaller, 2013. *Medical Microbiology* septima ed. ELSEVIER SOUNDERS.

Paynea, R., Muenchhoffa, M., Mannb, J., Robertsc, H.E., Matthews, P., Adlanda, E., Hempenstalla, A., Huangc, K.-H., Brockmane, M., Brumme, Z., 2013. Impact of HLA-driven HIV adaptation on virulence in populations of high HIV seroprevalence.

Peterson, T.A., Kimani, J., Wachih, C., Bielawny, T., Mendoza, L., Thavaneswaran, S., Narayansingh, M.J., Kariri, T., Liang, B., Ball, T.B., Ngugi, E.N., Plummer, F.A., Luo, M., 2013. HLA class I associations with rates of HIV-1 seroconversion and disease progression in the Pumwani Sex Worker Cohort. *Tissue Antigens* 81, 93-107.

Piguet, V., Wan, L., Borel, C., Mangasarian, A., Demaurex, N., Thomas, G., Trono, D., 2000. HIV-1 Nef protein binds to the cellular protein PACS-1 to downregulate class I major histocompatibility complexes. *Nat Cell Biol* 2, 163-167.

Pirmohamed, M., Ostrov, D.A., Park, B.K., 2015. New genetic findings lead the way to a better understanding of fundamental mechanisms of drug hypersensitivity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 136, 236-244.

Plantier, J.-C., Leoz, M., Dickerson, J.E., De Oliveira, F., Cordonnier, F., Lemee, V., Damond, F., Robertson, D.L., Simon, F., 2009. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat Med* 15, 871-872.

Powell, R.L.R., Zhao, J., Konings, F.A.J., Tang, S., Ewane, L., Burda, S., Urbanski, M.M., Saa, D.R., Hewlett, I., Nyambi, P.N., 2007. Circulating recombinant form (CRF) 37_cpx: an old strain in Cameroon composed of diverse, genetically distant lineages of subtypes A and G. *AIDS research and human retroviruses* 23, 923-933.

Rachinger, A., Navis, M., van Assen, S., Groeneveld, P.H.P., Schuitemaker, H., 2008. Recovery of viremic control after superinfection with pathogenic HIV type 1 in a long-term elite controller of HIV type 1 infection. *Clin Infect Dis* 47, e86-89.

Roitt, D., Martin, Burton. , 2008. *Immunologia Fundamentos* 11a. edición ed.

Saag, M., Balu, R., Phillips, E., Brachman, P., Martorell, C., Burman, W., Stancil, B., Mosteller, M., Brothers, C., Wannamaker, P., 2008. High sensitivity of human leukocyte antigen-b* 5701 as a marker for immunologically confirmed abacavir hypersensitivity in white and black patients. *Clinical infectious diseases* 46, 1111-1118.

Sandonís, V., Casado, C., Alvaro, T., Pernas, M., Olivares, I., García, S., Rodríguez, C., del Romero, J., López-Galíndez, C., 2009. A combination of defective DNA and protective host factors are found in a set of HIV-1 ancestral LTNPs. *Virology* 391, 73-82.

Schneidewind, A., Brockman, M.A., Yang, R., Adam, R.I., Li, B., Le Gall, S., Rinaldo, C.R., Craggs, S.L., Allgaier, R.L., Power, K.A., 2007. Escape from the dominant HLA-B27-restricted cytotoxic T-lymphocyte response in Gag is associated with a dramatic reduction in human immunodeficiency virus type 1 replication. *Journal of virology* 81, 12382-12393.

Secretaria de Salud, H., 2015. Informe estadístico de la epidemia de VIH en Honduras.

Smith, M.W., Dean, M., Carrington, M., Winkler, C., Huttley, G.A., Lomb, D.A., Goedert, J.J., O'Brien, T.R., Jacobson, L.P., Kaslow, R., Buchbinder, S., Vittinghoff, E., Vlahov, D., Hoots, K., Hilgartner, M.W., Study, M.A.C.S., Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE, O'Brien, S.J., 1997. Contrasting Genetic Influence of CCR2 and CCR5 Variants on HIV-1 Infection and Disease Progression. *Science* 277, 959-965.

Sobieszczyk, M.E., Lingappa, J.R., McElrath, M.J., 2011. Host genetic polymorphisms associated with innate immune factors and HIV-1. *Current Opinion in HIV and AIDS* 6, 427-434.

Soriano, A., Martínez, C., García, F., Plana, M., Palou, E., Lejeune, M., Aróstegui, J.I., De Lazzari, E., Rodríguez, C., Barrasa, A., Lorenzo, J.I., Alcamí, J., del Romero, J., Miró, J.M., Gatell, J.M., Gallart, T., 2002. Plasma stromal cell-derived factor (SDF)-1 levels, SDF1-3'A genotype, and expression of CXCR4 on T lymphocytes: their impact on resistance to human immunodeficiency virus type 1 infection and its progression. *The Journal of infectious diseases* 186, 922-931.

Straszer, K., Hurt, E., 2001. Splicing factor Sub2p is required for nuclear mRNA export through its interaction with Yra1p. *Nature* 413, 648-652.

Teixeira, S., De Sá, N., Campos, D., Coelho, A., Guimaraes, M., Leite, T., Veloso, V., Morgado, M., 2014. Association of the HLA-B* 52 allele with non-progression to AIDS in Brazilian HIV-1-infected individuals. *Genes and immunity* 15, 256-262.

Tremblay, M.J., Fortin, J.F., Cantin, R., 1998. The acquisition of host-encoded proteins by nascent HIV-1. *Immunol Today* 19, 346-351.

Wei, X., Ghosh, S.K., Taylor, M.E., Johnson, V.A., Emini, E.A., Deutsch, P., Lifson, J.D., Bonhoeffer, S., Nowak, M.A., Hahn, B.H., 1995. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* 373, 117-122.

Wu, L., Gerard, N.P., Wyatt, R., Choe, H., Parolin, C., Ruffing, N., Borsetti, A., Cardoso, A.A., Desjardin, E., Newman, W., Gerard, C., Sodroski, J., 1996. CD4-

induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. *Nature* 384, 179-183.

Yang, J., Yang, Z., Lv, H., Lou, Y., Wang, J., Wu, N., 2013. Bridging HIV-1 Cellular Latency and Clinical Long-Term Non-Progressor: An Interatomic View. *PLoS ONE* 8, e55791.

Zhang, X., Huang, X., Xia, W., Li, W., Zhang, T., Wu, H., Xu, X., Yan, H., 2013. HLA-B*44 Is Associated with a Lower Viral Set Point and Slow CD4 Decline in a Cohort of Chinese Homosexual Men Acutely Infected with HIV-1. *Clinical and Vaccine Immunology* : CVI 20, 1048-1054.

APÉNDICES



B. FORMA DE CONSENTIMIENTO ESCRITO PARA PARTICIPAR EN EL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN TITULADO:

“Factores genéticos asociados con progresión a enfermedad y con hipersensibilidad a los antirretrovirales en pacientes VIH-1 positivos de Tegucigalpa, durante 2013-2015”



PATROCINADOR:

Universidad Nacional Autónoma de Honduras, Facultad de Ciencias
Escuela de Microbiología, Laboratorio de Virología

COLABORADOR

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), México D.F., México

SITIO DE INVESTIGACIÓN

Laboratorio de Virología-UNAH

Centro de Investigaciones Genéticas-UNAH

Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIENI), del servicio de Infectología para el Paciente Inmunocomprometido (SIPI), del INER, México D.F., México

INVESTIGADORES RESPONSABLES:

Universidad Nacional Autónoma de Honduras, Ciudad Universitaria, bulevar Suyapa, edificio J1 4to piso Laboratorio de virología.

Dra. Ivette Lorenzana: email: ivettelorenzana@yahoo.com Teléfono: 9990-2501

Dra. Wendy Murillo: email: wmurillo@hotmail.com Teléfono: 9918-9976

Dra. Candy Carbajal: email cancarbajal@gmail.com Teléfono: 31767919

Estimado (a) paciente:

Esta es una invitación para participar en un proyecto de investigación en el que se estudiarán factores genéticos asociados con rápido desarrollo o con protección a enfermedad y con reacciones adversas al tratamiento a un grupo de personas con la infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), causante del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida). Su participación es completamente voluntaria. Este estudio se realiza en colaboración entre instituciones de salud prestigiosas de nuestro país y de México, ninguna empresa farmacéutica ni ninguna otra compañía privada tienen o tendrá participación alguna en esta investigación.

IMPORTANCIA DEL ESTUDIO

Esta información será muy valiosa para el conocimiento de la epidemia de VIH/SIDA en la que contribuya a la implementación de políticas de salud que

mejoren el tratamiento y seguimiento clínicos de las personas que viven con VIH a nivel regional y que oriente las estrategias de desarrollo de posibles vacunas eficaces contra el virus.

OBJETIVO:

En este estudio se determinará la frecuencia de alelos HLA-B y su relación con progresión rápida o lenta a sida e hipersensibilidad a los fármacos antirretrovirales.

PROCEDIMIENTOS:

Usted ha sido invitado a participar en este estudio porque:

1. Es una persona que hace mas de 8 años fue diagnosticada con VIH y se ha mantenido sin sintomatología definitoria de sida.
2. Es una persona que hace mas de 8 años fue diagnosticada con VIH, que actualmente presenta sintomatología.

Se obtendrán 15 mililitros (3 tubos) de sangre de una vena del brazo en una toma de muestra única. Se estudiarán las células y el virus presentes en su sangre. Algunas células y virus serán guardadas durante un tiempo indefinido y podrán ser estudiados nuevamente en el futuro en el marco de otros proyectos de investigación sobre la infección por VIH. Si los investigadores responsables de este estudio lo consideran necesario, se le podría citar para una toma de muestra adicional.

RIESGOS:

El procedimiento para la obtención de una muestra de su sangre será realizado por personal calificado, siguiendo todas las precauciones y medidas de higiene necesarias. La extracción de sangre produce dolor y molestias pasajeras en el sitio de punción. En raras ocasiones, puede haber infección o quedar temporalmente un hematoma (“moretón”) en el sitio de la punción. Si esto ocurre, serían tratados por el personal médico de la institución de salud que lo invita a participar en este protocolo. La cantidad de sangre extraída no representa riesgos para su salud. Si hubiera algún problema relacionado con los procedimientos de este estudio, se dispondrá del tratamiento para resolverlo (antibióticos, analgésicos, antiinflamatorios) por parte de la institución de salud que lo invita a participar. No se proporcionarían compensaciones por los eventos no relacionados con el procedimiento del estudio.

BENEFICIOS:

Usted no obtendrá beneficios económicos por su participación en esta investigación. Sin embargo, el presente estudio contempla la realización de algunas pruebas de laboratorio que son útiles para su seguimiento clínico, las cuales se realizarán sin costo alguno para usted. Estas pruebas incluyen los estudios de carga viral, conteo de linfocitos T CD4+ y una prueba de farmacogenómica para saber si usted puede presentar reacciones adversas a los medicamentos. Asimismo, con su participación usted podría contribuir en la obtención de información importante que ayudará en el conocimiento de la frecuencia de factores genéticos en la población hondureña.

OPTATIVIDAD Y LIBERTAD DE RETIRARSE:

Su participación en este estudio es **totalmente voluntaria**. Esto implica que usted puede decidir no participar, sin que esto afecte su seguimiento clínico y/o tratamiento en absoluto. Cualquiera de estas decisiones será respetada y los beneficios (atención clínica, de laboratorio) que usted obtiene como paciente no cambiarán. Sus tratamientos y sus relaciones con los médicos y organizadores que participan en esta investigación no se afectarán en ningún momento.

CONFIDENCIALIDAD:

Usted no será identificado(a) en ningún caso si los resultados de este estudio de investigación se presentan en reuniones científicas o en publicaciones. Su identidad no formará parte de los resultados de este estudio, en el caso de que sean publicados en el medio científico y académico especializado. Los registros médicos donde usted puede ser identificado y el consentimiento informado, autorizado por usted con su firma, podrían ser requeridos y copiados para una inspección de los datos o resultados de los estudios que podría ser realizada por algunas instituciones nacionales o extranjeras. Estas instituciones podrían conocer su identidad, pero **siempre respetarán su privacidad**.

DUDAS Y COMENTARIOS:

Si usted tiene dudas o comentarios sobre su participación en este estudio o sobre el estudio mismo, puede consultar en todo momento a los responsables de este proyecto en su institución de salud cuyos datos de contacto se muestran en las dos primeras hojas de este documento.

CONSENTIMIENTO

Me han proporcionado la Forma de Consentimiento Informado para participar en el presente proyecto de investigación. Me han explicado los métodos y procedimientos que me realizarán en este estudio. He hablado directamente con _____, quien ha respondido a mi satisfacción todas mis preguntas respecto a este estudio. Acepto donar 15 mL de mi sangre para que se estudien las células y el virus contenidos en ella. Estoy informado de que las células y virus de mi muestra de sangre serán guardados durante un tiempo indefinido y que podrán ser estudiados nuevamente en el futuro en el marco de otros de investigación sobre la infección por VIH.

Doy mi consentimiento de participación en esta investigación. Sé que el negarme a participar no tendría repercusiones en mi atención como paciente en mi institución de salud. Al firmar este consentimiento, no renuncio a ninguno de mis derechos legales como paciente en un estudio de investigación.

Nombre y firma del paciente:

Fecha: _____

Nombre y firma de testigo 1:

Fecha: _____

DECLARACION DE LOS DERECHOS DE LAS PERSONAS EN EXPERIMENTACION

Los derechos que enseguida se describen son los de todas las personas a quienes se les solicita participar en un estudio de investigación:

1. Que le expliquen de que se trata el estudio y que están tratando de encontrar. Tiene derecho a saber con todos los detalles los objetivos de investigación.
2. Que le digan exactamente que le sucederá si participa o no en un estudio de investigación.
3. Que le expliquen si alguno de los procedimientos, medicamentos o dispositivos que se emplearán en la investigación son diferentes de los que se usan en la práctica médica rutinaria. Si son diferentes, usted debe saber con exactitud en qué consisten las diferencias.
4. Que le describan con precisión, y de manera de que usted lo entienda bien, la frecuencia y la importancia de los riesgos a los que será sometido, así como de los efectos adversos o molestias que usted puede tener, relacionados con su participación en la investigación.
5. que le digan si usted puede esperar algún beneficio por su participación y, si así fuera, que le describan cual sería el beneficio.
6. Que le expliquen las opciones que usted tiene y como esas opciones pueden ser mejores, iguales o peores que las de este estudio.
7. Que le permitan hacer cualquier pregunta que se le ocurra con respecto al estudio, antes de dar su consentimiento para participar y durante el curso del estudio (si decide participar).
8. Que le digan que tipos de tratamientos están disponibles para usted, en caso de presentarse alguna complicación.
9. Puede negarse a participar totalmente o, si decide participar, puede cambiar su decisión acerca de su participación después de que haya comenzado el estudio. Esta decisión no afectara sus derechos para recibir atención médica
10. que usted recibiría si no estuviese en el estudio.
11. Debe recibir una copia del documento o de la forma escrita de su consentimiento para participar en esta investigación.
12. Nadie puede ni debe presionarle cuando usted esté considerando tomar la decisión de participar o no en el estudio.

C. FICHA EPIDEMIOLÓGICA

“Factores genéticos asociados con progresión a enfermedad y con hipersensibilidad a los antirretrovirales en pacientes VIH-1 positivos de Tegucigalpa, durante 2013-2015”

Fecha de la entrevista: _____

Código: _____

I. DATOS GENERALES

• Nombre: _____ Expediente: _____

• Sexo: M () F () Edad: _____ Estado Civil: _____

• Dirección: _____ Teléfono: _____

• Servicio de atención en salud: _____

II. DATOS SOCIODEMOGRAFICOS

1. Lugar de Nacimiento: _____ Fecha de Nacimiento: _____

2. Lugar de Residencia Actual (Ciudad, Municipio, Departamento):

3. Residencias anteriores en los últimos 10 años:

| Lugar | Duración |
|-------|----------|
| | |
| | |
| | |
| | |

4. Escolaridad:

Primaria Preparatoria

Secundaria Licenciatura

Técnico Posgrado

Otro: _____

5. Situación laboral:

Estudiante Pensionado/Jubilado
Empleado Otro: _____
Desempleado

6. En caso de ser mujer, número de embarazos previos: _____

III. DATOS CLINICOS

1. Factor de riesgo de infección por VIH/Tipo de exposición a VIH
HSH Transfusión sanguínea
Usuario de drogas IV Infecciones asociadas a hemofilia
Contacto heterosexual Otra, especificar: _____

2. ¿conoce su fecha aproximada de infección por VIH? SI ___ NO ___

¿Cuándo? _____

3. ¿Conoce su fecha de diagnóstico de la infección por VIH? SI ___ NO ___

| | Fecha | Prueba* |
|---|-------|---------|
| Confirmación de la infección por VIH | | |
| Última prueba negativa a la infección por VIH | | |

*ELISA, WESTERN BLOT, Otra (Especificar)

4. ¿Presenta síntomas clínicos o cursa con alguna enfermedad? SI ___ NO ___

¿Cuáles síntomas o que enfermedad? _____

5. ¿Está tomando algún medicamento (excluyendo antirretrovirales)? SI ___ NO ___

¿Cuál (es)? _____

6. ¿Está tomando medicamentos antirretrovirales? SI ___ NO ___

¿Cuál es? _____

7. ¿Ha tomado alguna vez medicamentos antirretrovirales? SI ___ NO ___

¿Cuál es? _____

| Esquema de Tratamiento | Fecha de Inicio | Fecha de Termino |
|------------------------|-----------------|------------------|
| | | |
| | | |
| | | |

8. Estado clínico de la infección por VIH

- Asintomático
- Sintomático, con enfermedades no definitorias de SIDA, relacionadas a VIH
- Sintomático, con enfermedades definitorias de SIDA, relacionadas a VIH

9. Para personas con evidencia de falla de tratamiento, ¿Cuál es la razón de la sospecha de falla?

- Viroológica
- Inmunológica
- Clínica

10. Datos más recientes de laboratorio

| Conteo de células T CD4+ | | | Carga Viral (CV) | | |
|--------------------------|---|-------|------------------|--------|-------|
| Células/ μ L | % | Fecha | Copias RNA/ | Log CV | Fecha |
| | | | | | |

Dr. _____
Nombre y Firma