

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA**



**DETERMINACION DE LA PREVALENCIA DE LA
INFECCION CON EL VHC EN SUJETOS
INFECTADOS CON VIH-1 Y ANALISIS DE
POLIMORFISMOS DE MARCADORES
MOLECULARES ASOCIADOS
A LA COINFECCION**

Por

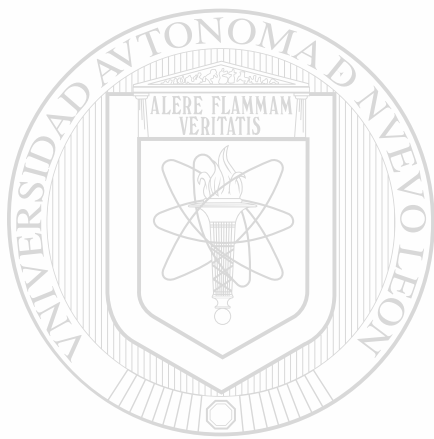
Q.F.B. Eda Guadalupe Ramírez Valles

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS con Especialidad
en Biología Molecular e Ingeniería Genética**

Febrero, 2005

TM
RA607
.A26
R35
2005
c.1

Q.F.B. Hda. Cuadalupe Ramírez Valles



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



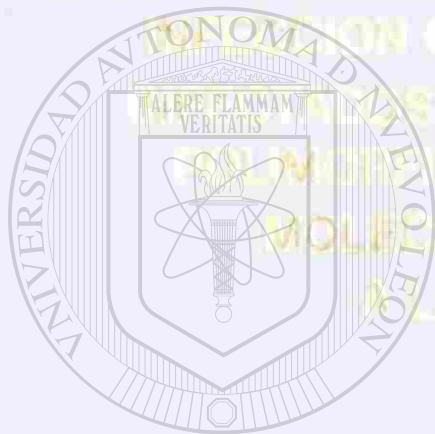
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



DETERMINACIÓN DE LA PREVALENCIA DE LA
INFECCIÓN CON EL VHC EN SUJETOS
POSITIVOS CON VIH-1 Y ANALISIS DE
POLIMORFISMOS DE MARCADORES
MOLECULARES ASOCIADOS
A LA COINFECCIÓN



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

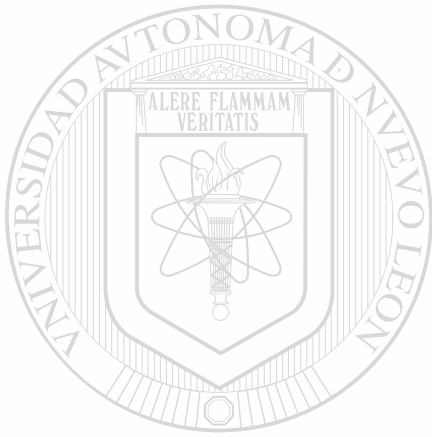
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS con Especialidad
en Biología Molecular e Ingeniería Genética

Febrero, 2005



TM
R 6609
.A26
R35
2005
L1



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Infectología Molecular de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genética del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Ana María Rivas Estilla y la Codirección del Dr. Javier Ramos Jiménez del Servicio de Infectología y el Dr. Hugo A. Barrera Saldaña del Departamento de Bioquímica.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN[®]
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

AGRADECIMIENTOS

Con especial cariño y admiración a mi Directora de Tesis, la Dra. Ana María Rivas Estilla por su constante dedicación y sus valiosas enseñanzas, por su confianza y paciencia para dejarme en el trabajo de la investigación, por esa oportunidad que me brindó. Muchas gracias por todo.

Al Dr. Javier Ramos Jiménez, por el apoyo que me brindó durante el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Hugo A. Barrera Saldaña, por su apoyo y críticas constructivas para realizar el presente trabajo.

Al Dr. Ricardo Flores, por su asesoría en el aspecto estadístico del presente trabajo.

Al Dr. Félix Rositas Noriega por su invaluable ayuda.

A la Q.C.B. Claudia I. Charles Niño, por su ayuda incondicional en el desarrollo de este estudio, así como su confianza y apoyo durante los períodos críticos que se presentaron al realizar esta Tesis. Gracias, muchas gracias por todo.

A la MCP Erika Ramírez Camacho, al MCP Ramón Martínez Hernández y a la C. Carolina Senes, por su tiempo, esfuerzo y dedicación en el desarrollo de este trabajo, su aportación es invaluable.

A Karina, por sus enseñanzas y la ayuda que me brindó.

A Mary, Edith, Rebeca, Noiana, Lilia, Elena, Eduardo, Adolfo e Israel, por su amistad. ®

A todo el personal de la ULLIEG, muy especialmente a Juany, Iram y Maribel.

Al Programa para el Mejoramiento del Profesorado (PROMEP) por el apoyo económico para la realización de mis estudios de Maestría.

A la Universidad Juárez del Estado de Durango por el apoyo y facilidades para el cumplimiento de una etapa más en mi formación académica.

Al Instituto de Seguridad Social al Servicio de los Trabajadores del Estado y al Sindicato Nacional de Trabajadores del ISSSTE Sesión XV, quienes en forma conjunta me brindaron también apoyo y facilidades para lograr una formación académica y profesional más completa.

Gracias Dios por haberme permitido lograr una de las metas más importantes en mi vida profesional, por permitirme disfrutar de tus maravillas, porque en los momentos más difíciles he contado contigo y porque me has dado la oportunidad de conocer el gran amor de las personas que realmente me quieren: mi familia.

Gracias mamá, gracias papá[†], porque con cariño me enseñaron a luchar para lograr cumplir con mis metas y con ello establecer nuevos retos, por darme su confianza, amor y comprensión.

Gracias Dudu, Tita y George, mis muy queridos hermanos, por compartir mis alegrías, mis tristezas, por su amistad, cariño y comprensión, por contribuir positivamente a mi superación.

Gracias Silvia, Hilda, Teresa y Mónica, por cuidar a mi familia mientras permanecía lejos físicamente. Nunca terminaré de agradecerles queridas Tías y prima.

Gracias Aida, mi muy estimada amiga, que velaste por mí durante mi ausencia, y por estar presente en momentos difíciles.

Gracias Dora, por el apoyo para llevar a cabo este trabajo y poder cumplir con esta meta personal.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

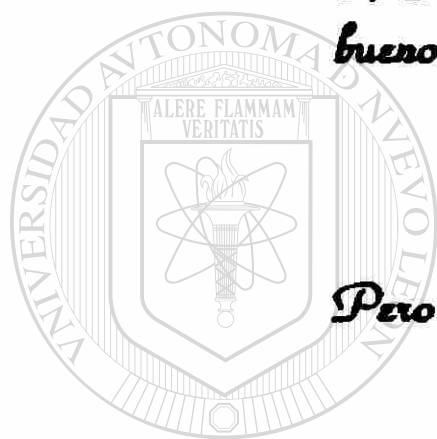
DEDICATORIA

Con amor

A mis sobrinos Ernesto, Jorgito y Felipe.

A mis hermanos Sandra, Jorge y Jessica.

*A Ti Dios mío, que me has acompañado en los
buenos y malos momentos de mi vida.*



Pero en especial a mis Padres

José Luis y Guadalupe

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



TABLA DE CONTENIDO

Contenido	Página
LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE FIGURAS	xii
ABREVIATURAS	xv
RESUMEN	xvii
L INTRODUCCION	1
1.1 Epidemiología	3
1.1.1 Virus de la Inmunodeficiencia Humana Tipo 1.	3
Prevalencia y factores de riesgo.	
1.1.2 Virus de la Hepatitis C.	7
Prevalencia y factores de riesgo.	
1.1.3 Coinfección VIH-1 / VHC.	12
Prevalencia.	
1.2 Biología Molecular del Virus de la	14
Inmunodeficiencia Humana Tipo 1 (VIH-1).	
1.3 Biología Molecular del virus de la Hepatitis C.	17
1.4 Marcadores Moleculares.	21
1.5 Factores involucrados en el desarrollo de la	23
coinfección VIH-1/VHC.	
1.5.1 Marcadores genéticos para el VIH-1.	24
1.5.2 Marcadores genéticos para el VHC.	30

	Página
II. JUSTIFICACIÓN	32
III. OBJETIVOS	34
3.1 Objetivo General.	34
3.2 Objetivos Específicos.	34
IV. MATERIALES Y METODOS	35
4.1 Área física.	35
4.2 Sujetos incluidos en el estudio.	35
4.2.1 Sujetos controles.	35
4.2.2 Sujetos infectados con VIH-1 y/o VHC.	36
4.3 Número de pacientes, base de datos y	37
confidencialidad.	
4.4 Material biológico.	37
4.5 Reactivos.	38
4.6 Equipo.	40
4.7 Programas de análisis computacional	40
4.8 Métodos.	41
4.8.1 Datos demográficos e historia clínica.	41
4.8.2 Estudios serológicos.	41
4.8.2.1 Estudios bioquímicos.	43
4.8.2.2 Estudios de anticuerpos.	43
4.8.3 Estudios moleculares.	44

	Página
5.2 Características demográficas y clínicas de los sujetos incluidos en el estudio.	61
5.3 Factores de riesgo.	65
5.4 Identificación cualitativa del genoma del VHC en un grupo de sujetos infectados con VIH-1.	69
5.5 Identificación de los polimorfismos de los genes que codifican para el correceptor CCR5 y la apolipoproteína E en un grupo de sujetos infectados y coinfectados con VIH-1/VHC.	71
5.5.1 ADN genómico extraído a partir de las muestras de sangre periférica.	71
5.5.2 Genotipificación de los polimorfismos de los genes que codifican para el correceptor CCR5.	72
5.5.3 Genotipificación de los genes que codifican para la apolipoproteína E.	74
5.5.3.1 Detección de los polimorfismos del gen que codifica para la apolipoproteína E.	75
5.6 Correlación de los hallazgos moleculares con la presencia de la coinfección en relación al grupo de	79

sujetos infectados únicamente con VIH-1, al grupo infectado con VHC o con el grupo de sujetos que no están infectados con ninguno de los dos virus.

5.6.1 Asociación de CCR5 e infección por VIH-1 y/o VHC. 79

5.6.2 Asociación de Apo E e infección por VIH-1 y/o VHC. 81

5.7 Correlación estadística entre las variables dependientes e independientes en el contexto de los diferentes grupos de sujetos. 83

5.8 Análisis de Hardy-Weinberg 85

VI. CONCLUSIONES 86

VII. DISCUSIÓN 89

VIII. PERSPECTIVAS 96

BIBLIOGRAFÍA 97

APÉNDICES 107

APÉNDICE A. - Carta de consentimiento informado. 108

APÉNDICE B. - Preparación de reactivos. 110

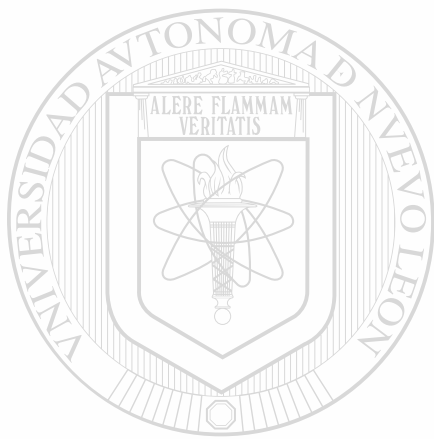
APÉNDICE C. - Electroforesis en geles de agarosa. 111

LISTA DE TABLAS

Tablas		Página
Tabla I.	Prevalencia de la coinfección en grupos de alto riesgo.	13
Tabla II.	Programa de amplificación aplicado en la RT-PCR para la determinación cualitativa del Virus de la Hepatitis C.	47
Tabla III.	Información general de los Primeros empleados en la primera amplificación para la identificación cualitativa del VHC.	48
Tabla IV.	Programa de amplificación para la determinación cualitativa del Virus de la Hepatitis.	49
Tabla V.	Información general de los Primeros empleados en la segunda amplificación para la identificación cualitativa del VHC.	50
Tabla VI.	Programa de amplificación aplicado en la PCR ANIDADA para la determinación cualitativa del Virus de la Hepatitis C.	51
Tabla VII.	Características principales de los oligonucleótidos empleados en la determinación de los polimorfismos del gen que codifica para CCR5 y el gen que codifica para la Apolipoproteína E.	54
Tabla VIII.	Programa para la amplificación del gen que codifica para la Apolipoproteína E.	55

Tabla IX.	Programa para la amplificación del fragmento del gen que codifica para el correceptor CCR5 y que permite identificar el WT y la mutación $\Delta 32$.	57
Tabla X.	Número de sujetos que integran cada grupo de estudio.	60
Tabla XI.	Características de sexo y edad de los sujetos que integran cada grupo de estudio.	61
Tabla XII.	Parámetros bioquímicos y virológicos del grupo de estudio y del grupo control.	68
Tabla XIII.	Factores de riesgo de pacientes coinfectados VIH-1 + / VHC +.	71
Tabla XIV.	Tamaño de los fragmentos de restricción con enzima <i>Hha</i> I esperados de la digestión del producto amplificado del gen de Apo E.	77
Tabla XV.	Frecuencia de genotipos del gen que codifica para la apolipoproteína E encontrada en los diferentes grupo de estudio.	78
Tabla XVI.	Frecuencia de genotipos del gen que codifica para la Apolipoproteína E en el grupo de estudio y grupos control.	79
Tabla XVII.	Frecuencia de genotipos del gen que codifica para la Apolipoproteína E en el grupo de VIH-1+ y el grupo control.	81
Tabla XVIII.	Frecuencia de genotipos del gen que codifica para la Apolipoproteína E en el grupo de estudio VHC + y el grupo control.	82
Tabla XIX.	Frecuencia de genotipos del gen que codifica para la Apolipoproteína E en el grupo de sujetos VIH-1 + / VHC + y el grupo control.	82
Tabla XX.	Factores de riesgo encontrados en el grupo de pacientes VIH-1 positivos.	83

Tabla XXI.	Características generales y factores de riesgo para la adquisición de infección por VIH-1.	84
Tabla XXII.	Características generales y factores de riesgo para la adquisición de infección por VIH-1 en pacientes coinfectados VIH-1 + / VHC +.	85



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
Figura 1.	Prevalencia global de la infección por VIH-1/SIDA de acuerdo con la OMS. Hasta diciembre de 2004.	4
Figura 2.	Prevalencia global de la infección crónica por VHC de acuerdo con la OMS. Hasta diciembre de 2003.	8
Figura 3.	Partícula del VIH-1.	14
Figura 4.	Esquema del genoma del VIH-1 y procesamiento de las proteínas virales.	16
Figura 5.	Partícula del VHC.	17
Figura 6.	Esquema del genoma del VHC y procesamiento de las proteínas virales.	19
Figura 7.	Esquema del anclaje y fijación del VIH-1 a la célula blanco.	26
Figura 8.	Esquema de la interacción de los receptores de la membrana celular y el VIH-1: A. Reconocimiento, fijación, anclaje y fusión del virus con la membrana celular. B. Competencia de quimioquinas con el VIH-1 por el correceptor CCR5. C. Expresión defectuosa del correceptor CCR5 que evita la fijación del VIH-1 a la membrana celular.	26
Figura 9.	Mecanismo propuesto de asociación del VIH-con la célula.	27

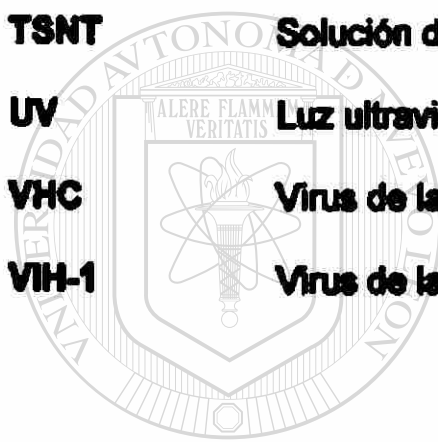
	Página
Figura 10. Esquema simplificado del proceso que se siguió en la realización del presente proyecto.	42
Figura 11. Distribución porcentual de los pacientes VIH-1 + según el sexo.	62
Figura 12. Distribución porcentual de los pacientes VIH-1 + según la edad.	62
Figura 13. Distribución porcentual de los pacientes VIH-1 + según su lugar de origen.	63
Figura 14. Distribución porcentual de los pacientes VIH-1 + según su lugar de residencia.	63
Figura 15. Distribución porcentual de los pacientes VIH-1 + según su estado civil.	64
Figura 16. Distribución porcentual de los pacientes VIH-1+ según su grado escolar.	64
Figura 17. Distribución porcentual de los pacientes VIH-1 + según su ocupación.	65
Figura 18. Distribución porcentual de los pacientes VIH-1 + según su orientación sexual.	65
Figura 19. Distribución porcentual de los pacientes VIH-1 + según el número de parejas sexuales que han tenido.	66
Figura 20. Distribución porcentual de los pacientes VIH-1 + según otras enfermedades de transmisión sexual que han padecido.	66
Figura 21. Distribución porcentual de los pacientes VIH-1 + según su carga viral (copias/ml).	67
Figura 22 Distribución porcentual de los pacientes VIH-1 + según su cuenta de células CD4.	67

	Página	
Figura 23	Electroforesis de productos amplificados para la identificación cualitativa de VHC.	69
Figura 24	Distribución porcentual de pacientes con monoinfección por VIH-1 y pacientes coinfectados con VIH-1/VHC.	70
Figura 25	Electroforesis de ADN extraído de muestras de pacientes.	72
Figura 26	Electroforesis de productos de amplificación del gen que codifica para el coreceptor CCR5.	73
Figura 27	Frecuencia de genotipos de CCR5 en el grupo de estudio y grupos control.	74
Figura 28	Electroforesis de productos de amplificación del gen que codifica para la Apolipoproteína E.	75
Figura 29	Electroforesis de la digestión de productos de amplificación del gen que codifica para la Apolipoproteína E.	76
Figura 30	Asociación de los polimorfismos del gen del coreceptor ccr5 con la presencia de infección por el VIH-1 y/o por VHC.	80

ABREVIATURAS

μl	Microlitros
°C	Grados centígrados
ALT	Alanina aminotransferasa
AST	Aspartato aminotransferasa
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleósidos Trifosfato
EDTA	Ácido etilendiamino-tetracético
DS	Desviación estandar
<hr/>	
F	Femenino
G	Gramos
H	Horas
M	Masculino
MgCl₂	Cloruro de Magnesio
min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
NaCl	Cloruro de Sodio

pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
RFLP	Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
SDS	Lauril sulfato de sodio
TAA	terapia antirretroviral altamente activa
TBE	Buffer Tris-Borato-EDTA
TSNT	Solución de lisis tritón-SDS
UV	Luz ultravioleta
VHC	Virus de la hepatitis C
VIH-1	Virus de la inmunodeficiencia adquirida tipo 1



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

RESUMEN

Universidad Autónoma de Nuevo León
Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina, UANL

Presenta: Q.F.B. Eda Guadalupe Ramírez Valles.

Título del estudio:

DETERMINACIÓN DE LA PREVALENCIA DE LA INFECCIÓN CON EL VHC EN SUJETOS INFECTADOS CON VIH-1 Y ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS DE MARCADORES MOLECULARES ASOCIADOS A LA COINFECCIÓN

Las complicaciones de la co-infección con el virus de la hepatitis C (VHC) se están convirtiendo en uno de los principales problemas médicos de los pacientes con SIDA. A nivel mundial se calcula que aproximadamente del 23 al 65 % de las personas infectadas con VIH-1 pueden estar co-infectadas con el VHC. En EU la prevalencia de la co-infección se ha estimado en alrededor del 35 %. Sin embargo, la prevalencia varía con los grupos de riesgo. La co-infección del VIH-1 y VHC es común debido a que comparten vías de transmisión y formas de latencia prolongada. En México no se tienen datos precisos de la frecuencia de la co-infección con estos dos virus, pero se estiman cifras similares a las de otros países. La co-infección con el VHC es un problema importante en personas infectadas con VIH-1, por lo que es importante elucidar los mecanismos moleculares de patogenicidad involucrados en la co-infección. La presencia de polimorfismos en genes de receptores asociados con la entrada de los virus al sujeto infectado, confiere cierta resistencia a la infección.

Estos incluyen una delección de 32 pb en el gen del coreceptor CCR5 (CCR5 Δ 32) para el VIH-1 y el alelo Apo E- ϵ 4 del gen Apo E para el VHC. **OBJETIVO:** 1) Determinar la frecuencia de la infección con el VHC en un grupo de sujetos infectados con VIH-1. 2) Investigar la frecuencia de polimorfismos del coreceptor CCR5 y la Apo E en la población de estudio para estimar el riesgo relativo a la presencia de estos factores en la adquisición de infecciones producidas por el VIH-1 y el VHC. **MÉTODOS:** Se llevó a cabo la detección del VHC en un cohorte de sujetos VIH-1 positivos (n=62), realizando la extracción del ARN viral y convirtiéndolo a ADNc por RT-PCR. El ADNc obtenido fue amplificado con primers específicos y posteriormente se realizó un PCR-anidado. La detección de los productos amplificados se realizó por electroforesis en gel de agarosa al 2 %. Se amplificaron secuencias de los genes que codifican para el coreceptor CCR5 y para la Apolipoproteína E mediante PCR y se detectaron mediante gel de agarosa al 2 %. Para el análisis del gen Apo E, realizamos digestión enzimática con *Hha* I. **RESULTADOS:** Se encontró que el 8 % son mujeres y el 92 % son hombres (relación 1:11). El 79 % del grupo de estudio tiene menos de 40 años. El 73 % presenta una cuenta de CD4 menor a 200 cel/ml. El 24 % posee valores de AST y ALT mayores de 81 U/ml. El 43 % ha sufrido otra enfermedad de transmisión sexual. En este cohorte se encontró una frecuencia del 12.9 % de personas co-infectadas con VIH-1 y VHC, siendo los principales factores de riesgo: alcoholismo (78 %), homosexualidad (49 %), transfusión sanguínea (18 %) y uso de drogas intravenosas (9 %). En el grupo de sujetos co-infectados, los factores de riesgo que presentaron asociación relativa con la presencia de la infección por VIH-1/VHC fueron la homosexualidad y la ingesta de alcohol, en cuya asociación se obtiene una ODDS de 1.6 y 3, respectivamente. Se encontró una frecuencia para el genotipo heterocigoto CCR5 Δ 32 de 0 % en pacientes VIH-1+, del 23 % en sujetos VHC+ y en controles sanos del 3.2 %. En ningún grupo de estudio se detectó el genotipo homocigoto CCR5 Δ 32/ Δ 32. El 36.7 % de las personas VIH-1 positivas presentaron el genotipo E2/E4 ó E4/E4, y la presencia de estos genotipos confiere una probabilidad de 3 y 6 veces mayor, respectivamente, de adquirir la infección por VIH-1 que los otros genotipos de la apolipoproteína E. Mientras que el genotipo E3/E4 (ODDS = 0.041) se asoció con una disminución en el riesgo de contraer una infección por VIH-1. **CONCLUSIONES:** Se reporta una frecuencia de co-infección VIH-1/VHC menor a la encontrada en otros países. La homosexualidad y la ingesta de alcohol fueron los factores de riesgo que presentaron asociación con la co-infección por VIH-1/VHC. El genotipo homocigoto CCR5 Δ 32/ Δ 32 ($p < 0.05$) confiere una susceptibilidad para la infección por VIH-1. Los genotipos E2/E4 y E4/E4 del gen que codifican para la Apolipoproteína E ($p < 0.01$) mostraron una asociación con la susceptibilidad a la infección por VIH-1, mientras que el genotipo E2/E4 confiere una probabilidad 3 veces mayor de adquirir la infección por VHC.

Dra. ANA MARIA RIVAS ESTILLA
Director de Tesis

Dr. JAVIER RAMOS JIMÉNEZ
Co-Director de Tesis

Dr. HUGO A. BARRERA SALDAÑA
Co-Director de Tesis

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN


La infección por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) y su interacción con la respuesta inmune del hospedero desencadena, por diversos factores y mecanismos muy complejos, una serie de eventos y múltiples fases que constituyen el curso natural de la enfermedad.

En la fase final de esta interacción se expresa lo que conocemos como Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), que invariablemente desencadena en la muerte del hospedero.

Las complicaciones de la coinfección con el virus de la hepatitis C (VHC) se están convirtiendo en uno de los principales problemas médicos al que tienen que enfrentar los pacientes con SIDA.

A nivel mundial se calcula que aproximadamente del 23 al 65 % de las personas infectadas con VIH-1 pueden estar coinfectadas con el VHC. Tan solo en Estados Unidos (EU), la prevalencia de la co-infección se ha estimado en alrededor del 35 %.

La alta prevalencia de la coinfección VIH-1/VHC en algunos grupos de riesgo, el aumento de la sobrevida como consecuencia de la institución de la



sanguíneas, uso de drogas intravenosas y relaciones sexuales.⁶⁹ Durante un estudio realizado en México de 1994 a 1998 (Rivas - Estilla et al/1998), se encontró que la vía de transmisión más importante en nuestro país fue la transfusión sanguínea, seguida por la vía parenteral a través del uso de agujas contaminadas y jeringas no esterilizadas compartidas entre drogadictos y trasplante de órganos. También se encontró que la posibilidad de transmisión por contacto sexual y por infección perinatal es considerablemente menor para el VHC que para el VHB.

1.1 Epidemiología

1.1.1 Virus de la Inmunodeficiencia Humana Tipo 1. Prevalencia y Factores de riesgo.

Desde la aparición del SIDA, en menos de 10 años, la infección por el VIH-1 se transformó en una pandemia. El VIH-1 es el responsable de la diseminación mundial de esta enfermedad y en la actualidad constituye uno de los problemas de salud más serios y preocupantes.

Según las últimas estimaciones del Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre VIH/SIDA (ONUSIDA) y de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se estima que el número de personas infectadas con el VIH-1 suma más de 40 millones (36 - 44 millones) en todo el mundo y han fallecido por SIDA 3.1 millones de niños y adultos.¹ La distribución mundial de los casos notificados de infección a fines de 2004 se ilustra en la Figura 1.



Figura 1. Prevalencia global de la infección por VIH-1/SIDA de acuerdo con la OMS hasta diciembre de 2004. Fuente: Situación de la epidemia de SIDA. ONUSIDA/OMS. Consulta: Enero 2005.

Durante el 2004 se presentaron diariamente alrededor de 13,400 nuevos casos de infección por VIH-1, de los cuales más del 95 % se presentaron en los países de ingresos bajos a moderados. 1,754 de estos nuevos casos correspondieron a personas menores de 15 años, y, de los aproximadamente 11,600 adultos que adquirieron la infección, cerca del 50 % eran mujeres en edades entre 15 y 24 años.³

De acuerdo a la clasificación de epidemia por SIDA propuesta por la ONUSIDA, México queda clasificado como un país con una epidemia de SIDA concentrada.

Una epidemia de SIDA concentrada se caracteriza por una difusión rápida de infección por VIH-1 en un subgrupo de la población, pero que aún no se establece en la población en general, y cuya prevalencia de infección por VIH-1 que se mantiene constante por encima del 5 % y que en mujeres embarazadas de zonas urbanas es menor al 1 %.⁴

Según el reporte de Epidemiología del VIH/SIDA en México de la Secretaría de Salud y Centro Nacional para la prevención y control del VIH/SIDA, para finales del 2003, en México, en el grupo de personas de 15 a 49 años, se estimó una prevalencia de VIH-1/SIDA de 0.3 %.⁴

La transmisión sexual ha sido la causante del 89.7 % de los casos acumulados de SIDA. El 8 % se originaron por vía sanguínea; la transmisión perinatal representa el 1.8 % del total de casos; y la categoría combinada de hombres que tienen sexo con otros hombres y usuarios de drogas inyectables el 0.5 %.⁴

En México el 84.8 % de los casos acumulados de SIDA corresponden a hombres y el 15.2 % a mujeres, estableciéndose una relación hombre-mujer de 6 a 1. Sin embargo, en la mayor parte del país se observa una relación de 3 a 1, aunque existen estados como Nuevo León y el Distrito Federal donde la razón es de 9 a 1. Esto indica una heterogeneidad en la forma de transmisión del SIDA en el territorio nacional, que en algunos estados es predominantemente homo/bisexual y en otras heterosexual.⁴

Lamentablemente el SIDA en nuestro país se presenta en mayor porcentaje (79.1 %) en el grupo de personas de ambos sexos con edad entre 15 a 45 años (79.1 %), implicando con ello que se ve afectada la población económicamente activa, lo cual puede llegar a afectar gravemente el bienestar económico de la familia. El 2.4 % de los casos corresponden a menores de 15 años. ⁴

De analizar el total de casos acumulados en México (71,526 casos) se puede establecer que la vía de transmisión más importante es la sexual (mayor al 50 %). Dentro de esta categoría, los casos acumulados en hombres que tienen sexo con hombres es del 57.7 %; mientras que los casos relacionados con la transmisión heterosexual es de 42.3 %. ⁴

Con respecto a otras vías de transmisión en México, los casos acumulados se distribuyen en la siguiente forma: 91.4 % corresponden a una transmisión por vía sanguínea; 8.4 % al consumo de drogas inyectables, 8.4 % y 0.2 % a la categoría de exposición ocupacional. ⁴

En México, la transmisión perinatal constituye la principal vía de contagio del VIH-1/SIDA en menores de 15 años, ya que siete de cada diez casos se deben a esta forma de contagio (72 %). ⁴

1.1.2 Virus de la Hepatitis C. Prevalencia y Factores de riesgo.

La Organización Mundial de la Salud, basándose en la información de que dispone, estima que alrededor del 3 % de la población mundial esta infectada por el VHC, lo que equivale a 200 millones de personas (Figura 2. de la pagina 21).¹ Se calcula que el número de nuevas infecciones por año es de 3 a 4 millones de personas.¹

La prevalencia en la mayor parte de los países de Europa, América y Sureste asiático es menor de 2.5 %, en tanto que la de las regiones del Pacífico Oeste va de 2.5 a 10 %, habiendo países, como los del Medio Oriente, en donde puede ser mayor del 10 %.⁵

Uno de los países con mejor control epidemiológico es Estados Unidos, país en el cual ~ 2 % de su población esta infectada con VHC, y la mayoría de ellos desarrolla infección crónica (~ 85 %). La infección por el VHC crónica puede conducir a cirrosis (en el 20 % de los casos) y carcinoma hepatocelular (~ 8,000 y 10,000 muertes al año).

Existen pocos reportes de la prevalencia del VHC en México. Sin embargo, con estos datos, y en conjunto con la Organización Mundial de la Salud se estima que es de 0.7 %.⁵

Los factores de riesgo que se citan con más frecuencia en todo el mundo son hemotransfusión (sangre infectada de donadores sin escrutinio previo) y empleo de drogas parenterales. Sin embargo en muchas ocasiones no es posible identificar algún factor de riesgo o vía reconocida. En consecuencia, se



Figura 2. Prevalencia global de la infección crónica por VHC de acuerdo con la OMS. Hasta diciembre de 2003. Fuente: OMS. Consulta: Julio 2004

proponen otras vías potenciales de adquisición del VHC que incluyen hemodiálisis, contacto sexual, tatuajes, perforaciones corporales, transmisión materno-fetal e inhalación de cocaína.

Receptores de sangre y productos sanguíneos.

La transfusión de sangre, o de los productos derivados de ella, provenientes de donadores infectados por VHC es una vía muy eficiente de transmisión. La introducción de las técnicas serológicas por inmunoensayo enzimático para realizar el escrutinio de la sangre en los países desarrollados a partir de 1990 disminuyó la incidencia de VHC postransfusional a menos de 1 % en esas áreas. La implementación de técnicas multiantígeno más sensibles permite reducir el riesgo de infección por VHC relacionado con transfusión a cerca de 0.001 % por unidad transfundida (1/100,00 por unidad transfundida).⁶

Uso de drogas endovenosas.

Actualmente el uso de drogas intravenosas es la vía de transmisión más importante en Estados Unidos.⁶ Muchas personas con infección crónica por VHC pudieron adquirir su infección hace 20 o 30 años como resultado de un limitado u ocasional uso de drogas inyectables. Los factores que se relacionan con usar drogas endovenosas y ser positivo a VHC comprenden: uso frecuente así como compartir la jeringa para drogarse.⁶

Exposición nosocomial y ocupacional.

El sitio de mayor riesgo de infección nosocomial del VHC lo constituyen las unidades de hemodiálisis, donde la prevalencia promedio es del 10 %, aunque




algunos centros reportan una prevalencia mayor al 60 %. Estudios de la incidencia y la prevalencia han documentado una asociación entre la positividad anti-VHC y el incremento de años en diálisis, independientemente de transfusión sanguínea. Estos estudios indican que la transmisión de VHC en pacientes que acuden a un centro de hemodiálisis ocurre por una implementación incorrecta de prácticas de control de infecciones, particularmente el fraccionamiento de los viales de medicación y suministros.⁶

A pesar de que los profesionales de la salud están expuestos a infectarse por el VHC y otros patógenos que se transmiten por sangre, al parecer la prevalencia anti-VHC no es mayor que la de la población general.

Actividad sexual.

Los hallazgos clínicos apoyan la conclusión de que la transmisión sexual del VHC ocurre, pero con poca frecuencia y de manera menos eficiente que la de otros virus. Se observa una relación entre la actividad sexual y la infección por el VHC en estudios de casos y controles de personas con hepatitis aguda, estudios transversales en grupos de diferentes comportamientos sexuales (heterosexuales y hombres que tienen relaciones sexuales con hombres que acuden a clínicas de enfermedades de transmisión sexual, mujeres que ejercen prostitución) en donde se ha encontrado un promedio del 6 % (rango: 1 % - 10 %). Al parecer existe una correlación entre ser anti-VHC positivo y el número de parejas sexuales, no usar preservativos, las prácticas receptivas anales, las



actividades sexuales traumáticas, los antecedentes de infección de transmisión sexual y la coinfección con VIH-1.⁶

Contacto en casa.

La prevalencia de infección por VHC a través de contacto no sexual en casa de personas con infección crónica por VHC en los EU es desconocida, pero probablemente es poco común. En estudios realizados en otros países se estima que es del 4 %.⁶

Transmisión perinatal.

La exposición perinatal se considera poco frecuente y representa una pequeña proporción de las infecciones por VHC. Aunque todavía no se establece el mecanismo exacto del contagio madre-hijo, los estudios indican que éste sólo ocurre cuando la madre es ARN positiva al momento del nacimiento. El riesgo promedio de infección se aproxima a 6 % (rango: 0 % - 25 %) para madres anti-VHC positivas / VIH-1 negativas y a 14 % (rango: 5 % - 38 %) para los nacidos de madres coinfectadas con VHC/VIH-1.⁶

1.1.3 Coinfección VIH-1/VHC. Prevalencia.

El VHC es una de las principales causas de morbilidad (8.6 %) y mortalidad (4.8 %) en personas infectadas con VIH-1 (Bica I. CID 2001;32:492-497).

Las complicaciones derivadas de la co-infección con el virus de la hepatitis C (VHC) son uno de los principales problemas que deben afrontar las personas VIH-1 positivas. ^{7,8}

Estudios efectuados a principios de la década de los 90's reportaron que la enfermedad hepática por VHC era responsable de hasta un 10 % de los fallecimientos en sujetos VIH-1 positivos.

Actualmente esta cifra va en aumento, y se estima que en los próximos años la co-infección con VHC puede ser la causa de hasta un 30-50 % de las muertes en VIH-1 positivos.

En los EUA se calcula hay 800 000 a 900 000 personas infectadas con el VIH-1; 4 millones están infectadas con el VHC y entre 240 000 y 300 000 personas (hasta el 40 % de las personas VIH-1 positivas) presentan co-infección.

A nivel mundial, se calcula que hay más de 170 millones de personas infectadas con el VHC; 36.1 millones viven con el VIH/SIDA y aproximadamente

el 33-75 % de las personas infectadas con el VIH-1 en todo el mundo pueden estar co-infectadas con VHC. ⁸

En grupos de alto riesgo la prevalencia ² puede variar tanto como se muestra en la Tabla I:

Tabla I Prevalencia de la coinfección en grupos de alto riesgo.

GRUPO DE RIESGO	PREVALENCIA
Pacientes VIH-1 +	Aprox. 40 %
Personas que usan drogas intravenosas	50 – 90 %
Hemofílicos	> de 85 %
Hombres homosexuales VIH-1 +	4 – 8 %
Prostitutas no usadoras de drogas intravenosas	5 – 8 %

Fuente: Mandana Khalili, Brian W. Behm. Hepatitis C in the setting of HIV co-infection. *Microbes and Infection* 4 . 2002

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

En EU en un grupo de mujeres embarazadas HIV-1 + se encontró que el 33 % de ellas eran positivo para la presencia de ARN-VHC y que el índice de transmisión materno infantil de VIH-1 era de 26 % en las que eran VHC positivo y de 16 % en las que eran VHC negativo.

En México no se cuenta con datos precisos acerca de la frecuencia de la co-infección con estos dos agentes virales, pero se estima que la población afectada es muy similar a la reportada en otros países.

1.2 Biología Molecular del Virus de la Inmunodeficiencia Humana Tipo 1 (VIH-1)

La partícula vírica o "virión" corresponde al virus durante la fase extracelular de su ciclo vital. Tiene una forma esférica. Presenta, en el exterior, una envoltura que rodea una cápside que tiene una forma de obús o de tronco de cono. En el centro de la cápside se encuentra el ARN vírico acompañado de otras moléculas indispensables para su protección o para el desarrollo de las primeras etapas de la infección vírica.¹⁰ Figura 3.

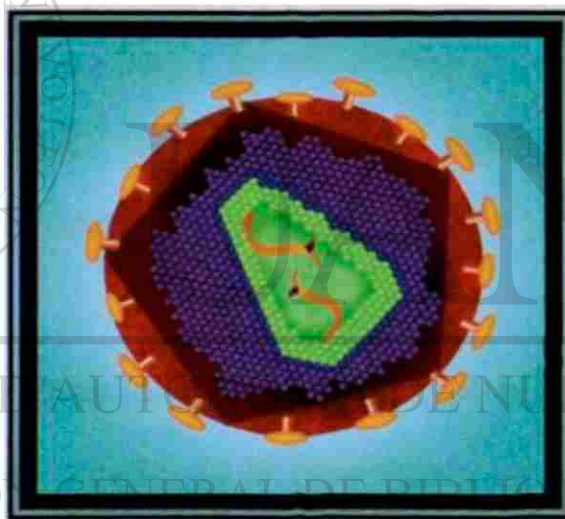


Figura 3. Partícula del VIH-1

La envoltura de la partícula vírica se parece a una membrana celular lipídica, de hecho una parte de los constituyentes de la envoltura procede, originalmente, de la membrana de la célula huésped, en la que se encuentran incrustadas diversas proteínas virales como la proteína gp120 (gp: proteína glucosilada) que se extiende hacia el exterior de la envoltura viral y la proteína gp41 transmembranal, que permite fijar la proteína gp120 a la envoltura viral.

Estas proteínas de superficie tienen un papel importante en la unión y en la penetración del VIH-1 en la célula diana. ^{10,11}

El interior de la envoltura está tapizado por moléculas de proteína p17. ¹⁰

La cápside rodea el ARN vírico y a otras moléculas asociadas. Está formada por varias proteínas, de las cuales la p24 es la que se encuentra en mayor proporción. ¹⁰

El VIH-1 está formado por 2 moléculas de ARN idénticas (+) dispuestas cabeza-cola, que contienen la información genética. ¹⁰ El ADN proviral está formado por 9.5 kilobases (kb) y se encuentra flanqueado por dos zonas de repetición terminal (LTR), las cuales tienen elementos necesarios para la integración, la transcripción y la síntesis de ARN. ¹⁰

Cuenta con tres genes principales: *gag*, *pol* y *env*, que codifican para proteínas de la nucleocápside, de la superficie y de la transcriptasa reversa. Además de los anteriores, cuenta con seis genes más que son *tat*, *rev*, *nef*, *vpu*, *vif* y *vpr*, que actúan como genes reguladores (Figura 4.). ^{10, 11, 12}

Los productos del gen *env* constituyen las principales proteínas exteriores, que son sintetizadas en forma del precursor gp160, el cual da origen a las glucoproteínas 120 (gp120) y 41 (gp41). ^{10, 11, 12}

Los productos de los genes *gag* y *pol* forman el centro del virión maduro. Las proteínas que son codificadas por *gag* tienen un precursor de 53 kd, de cuyo procesamiento resultan las proteínas p24, p17, p9 y p7.¹⁰

El gen *pol* codifica para la producción de un precursor, de cuyo procesamiento se originan varias enzimas, incluidas la integrasa, la ribonucleasa, la transcriptasa reversa y una aspartil-proteasa.¹⁰

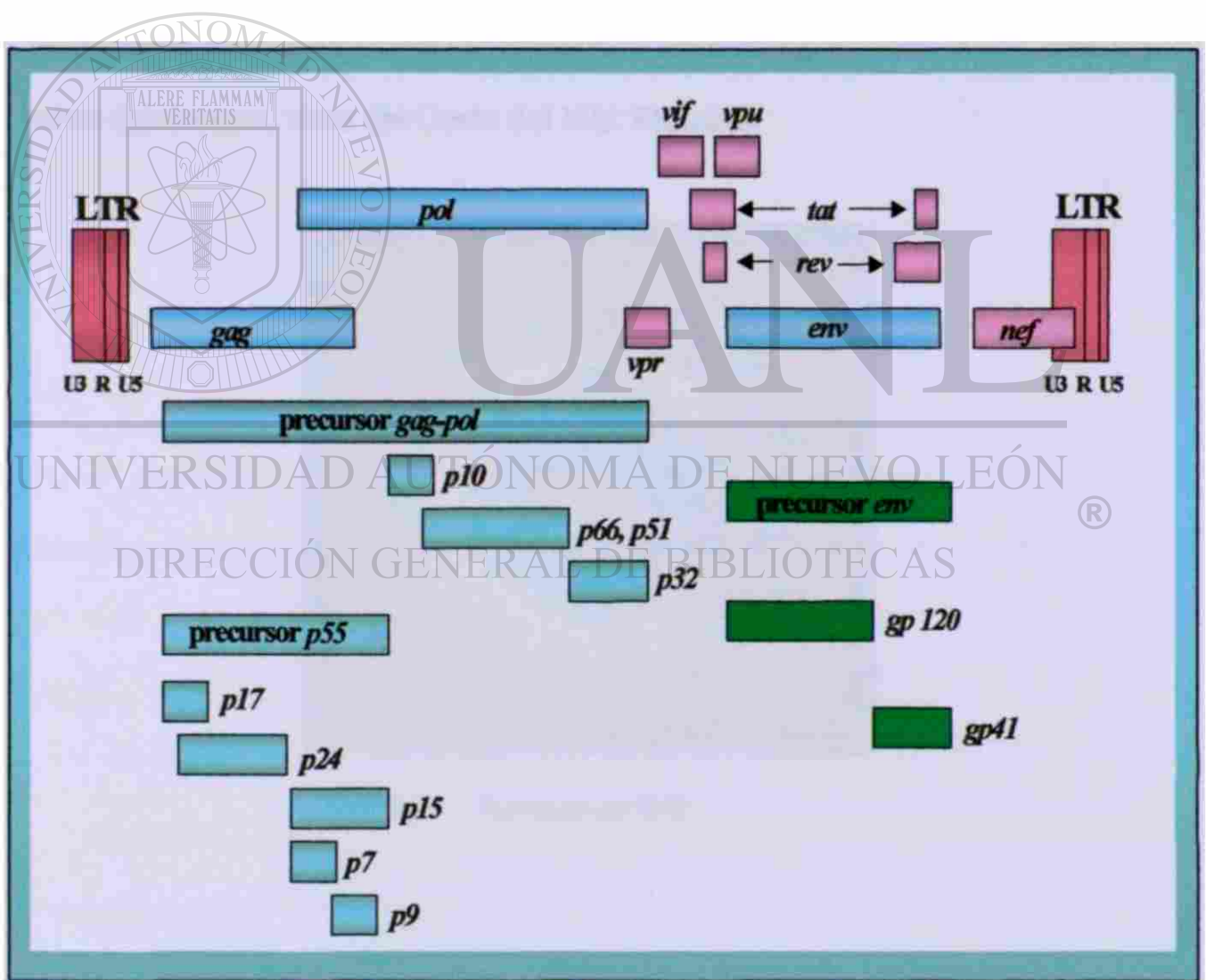


Figura 4. Esquema del genoma del VIH-1 y procesamiento de las proteínas virales.

1.3 Biología Molecular del Virus de la Hepatitis C

El VHC es un virus esférico, cubierto, con ARN de cadena positiva, de alrededor de 50 nm de diámetro. (Figura 5). Se ha propuesto que su estructura, organización genómica (Figura 6) y ciclo de replicación son similares a los de los miembros de la familia *Flaviviridae*, pero lo suficientemente distintos para clasificarse dentro de un nuevo género denominado *Hepacivirus*.^{13,14} Dentro de esta misma familia encontramos también al virus causante de la fiebre amarilla, virus del dengue, virus del Oeste del Nilo. Figura 5.

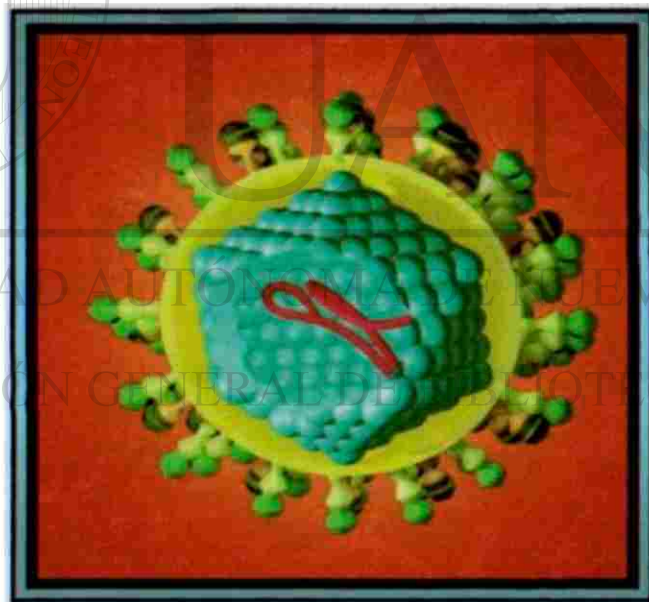


Figura 5. Partícula del VHC

El genoma del VHC (Figura 6) es una molécula de ARN, de sentido positivo, una sola cadena y aproximadamente 9.7 kilobases (kb) de longitud. El ARN

contiene un solo marco abierto de lectura abierto (de cerca de 3,000 aminoácidos), flanqueado por dos regiones muy conservadas y que no codifican, llamadas 5' y 3'UTR. ¹⁶

La región 5'UTR es de alrededor de 341 nucleótidos de longitud y contiene un segmento que actúa como sitio de entrada ribosomal interno que dirige la traducción del marco de lectura abierto viral. ¹⁶ Ya que la región 5'UTR es altamente conservada, se utiliza para genotipificación viral. Aunque algunas mutaciones en 5'UTR se relacionan con resistencia al interferón (INF), no está claro si esto es un efecto directo o sólo un cambio compensatorio a las mutaciones en otras partes del genoma. ^{17,18}

La región 3'UTR consiste en un segmento variable que incluye una zona de secuencia de PolyU de alrededor de 100 nucleótidos, y termina en un segmento de 98 nucleótidos altamente conservado (el más conservado en VHC) que se requiere para la replicación viral. Se piensa que este segmento conservado es un sitio probable de reconocimiento de la replicasa en la copia de la cadena negativa de ARN. ¹⁹

A partir del marco de lectura abierto del genoma del VHC se codifica una poliproteína que se procesa en por lo menos 10 proteínas, cuatro estructurales (la nucleocápside viral o proteína "core", las proteínas E1 y E2 de la cubierta, y una proteína denominada p7) y seis proteínas no estructurales que participan

en la replicación de ARN viral. El procesamiento de la poliproteína viral se lleva a cabo mediante proteasas tanto celulares como virales. (Figura 6.)

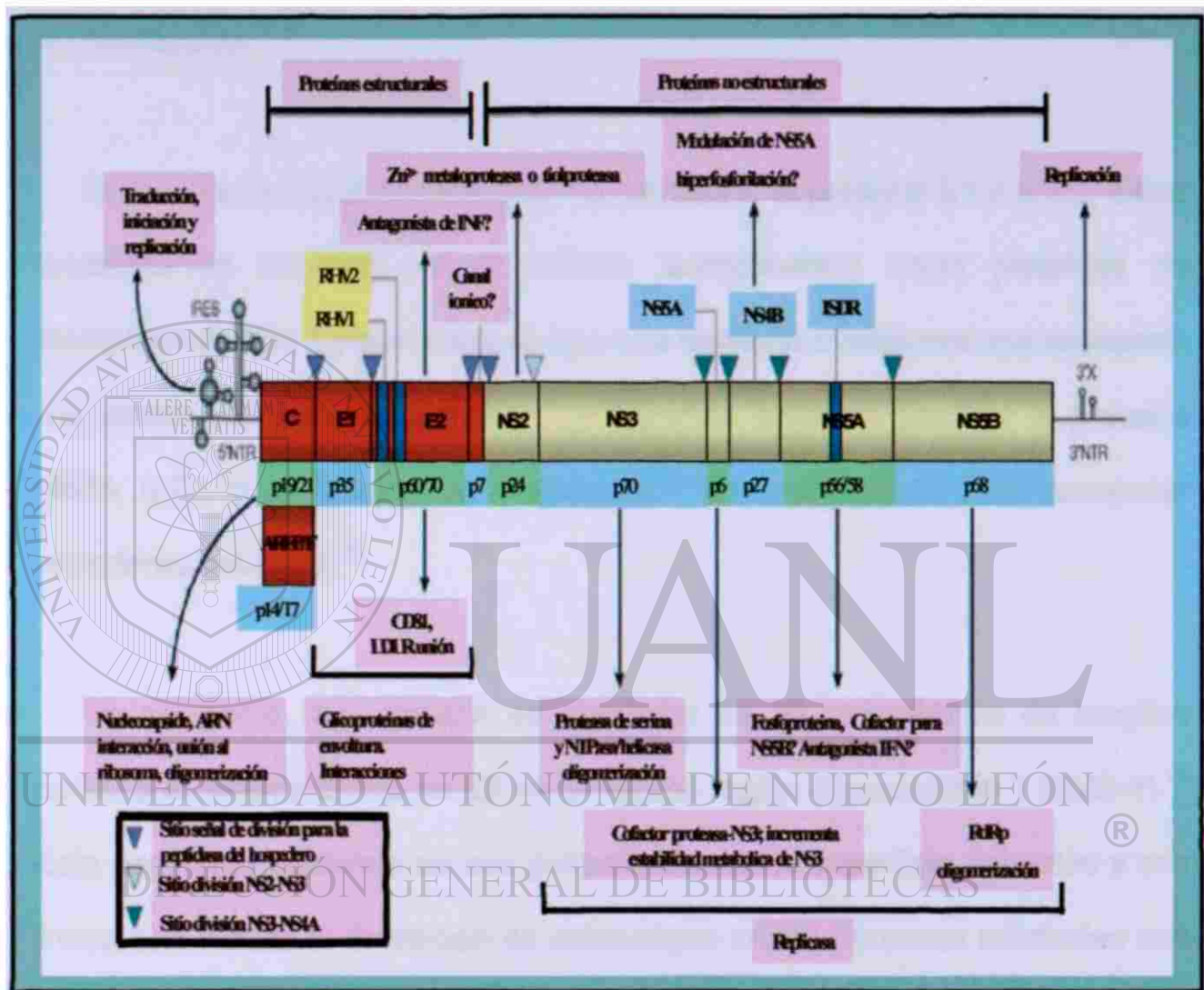


Figura 6. Esquema del genoma del VHC y procesamiento de las proteínas virales.

A partir del marco de lectura abierto del genoma del VHC se codifica una poliproteína que se procesa en por lo menos 10 proteínas, cuatro estructurales (la nucleocápside viral o proteína "core", las proteínas E1 y E2 de la cubierta, y una proteína denominada p7) y seis proteínas no estructurales que participan

en la replicación de ARN viral. El procesamiento de la poliproteína viral se lleva a cabo mediante proteasas tanto celulares como virales. (Figura 6.)

Los primeros 191 aminoácidos de la poliproteína del VHC forman la nucleocápside.^{20,21}

El VHC tiene dos glucoproteínas de envoltura: la proteína E1 y la E2. Estas proteínas se secretan en el retículo endoplásmico como proteínas de membrana de tipo 1 y permanecen fijas a la membrana mediante una secuencia hidrofóbica del extremo carboxilo. La digestión adicional produce la proteína NS2A (p7), cuya función se desconoce.²² E1 y E2 sirven para reconocer receptores celulares.²³

Un segmento muy variable de alrededor de 30 aminoácidos de longitud cercana al extremo amino de E2 se denomina región hipervariable 1 (HVR-1).²⁴ Éste segmento conforma un asa polipeptídica en la superficie del virión y con frecuencia induce la formación de anticuerpos en las personas infectadas con VHC.^{25,26}

Entre las proteínas no estructurales se encuentran las siguientes: NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B. De las anteriores proteínas se desconoce la función precisa de: NS2B, NS4A, NS4B y NS5A.¹⁴

La proteína NS3 tiene una actividad de serin proteasa localizada en su extremo amino terminal, y una de ARN-helicasa con actividad de trifosfatasa en su región carboxilo terminal.^{14,27}

En el segmento que corresponde a la proteína NS5A se localiza la región determinante de la susceptibilidad al interferón, ISDR, dado que los polimorfismos dentro de este segmento se correlacionan con la resistencia al tratamiento con INF.²⁸

La proteína NS5B es la que se encarga de replicar el genoma del VHC, ya que funciona como una RNA polimerasa dependiente de RNA.^{12,29}



1.4 Marcadores Moleculares

El estudio del material genético ha permitido determinar el origen de muchas enfermedades complejas como cáncer, diabetes, hipertensión, etc., lo cual, a su vez, ha hecho pensar que una patología es el resultado de la disfunción de más de un gen, así como que una misma enfermedad en diferentes individuos se puede deber a alteraciones de diferentes genes.

La presencia de formas alternas de genes normales (alelos mutados) pueden causar enfermedades, o bien una resistencia a ellas, al producir cantidades anormales del producto génico, que puede ser desde sobreexpresión hasta ausencia total del mismo.

Actualmente se propone que la aparición y evolución de una patología es el resultado de un desequilibrio en la interacción entre la información genética de un individuo y su medio ambiente, incluyendo su dieta y su estilo de vida. Por ello, el desarrollo del diagnóstico molecular nos permite la posibilidad de identificar las alteraciones en el material genético que generan la enfermedad (o la resistencia a ella) constituyendo así los marcadores moleculares que permitan establecer un diagnóstico certero.

Esto permitirá no solo realizar un diagnóstico preciso y la aplicación de una terapia génica apropiada, sino también identificar a un individuo antes de que desarrolle la enfermedad con el fin de que tome las medidas preventivas para retardar, controlar o incluso prevenir la aparición de dicha patología.

Los marcadores moleculares también son de utilidad en: la identificación de individuos; en el diagnóstico de enfermedades infecciosas ya sean estas causadas por agentes virales, bacterianos o micóticos; en la endocrinología molecular; en la fisiología; en la angiogénesis; en la producción de agentes biológicos para las terapias celular y genética; en el estudio de los diferentes grupos étnicos; en la farmacología; en el mejoramiento de productos agrícolas y en el control biológico de cosechas; en la biodegradación de los desperdicios y contaminantes; en el conocimiento de la ecología microbiana; y muchos otros campos involucrados en el entorno externo e interno del ser humano.

1.5 Factores Involucrados en el Desarrollo de la Coinfección VIH-1 / VHC

Las infecciones por el VHC y el VIH-1 comparten características en común que contribuyen a que la co-infección sea más frecuente: ambas son infecciones que se transmiten por vía parenteral (transfusiones), sexual y vertical.⁹ Presentan períodos de latencia prolongados y tendencia a un curso crónico. No se conocen los mecanismos de infección ni el efecto de la interacción de estos dos virus en las personas co-infectadas.

Se ha propuesto que el VIH-1 pueda acelerar la progresión de la hepatitis C y agudizarla, muy probablemente en relación con el descontrol de la infección por VIH-1, que se vincula con altos niveles de ARN-VHC y una progresión acelerada de la lesión hepática inducida por el VHC, lo que a su vez repercute en el desarrollo más rápido de fibrosis. Esta progresión de la fibrosis se correlaciona en forma independiente con la cuenta de CD4 (< 200/ml) y consumo de alcohol.

Por otro lado hay datos que sugieren que el VHC puede aumentar la incidencia de hepatotoxicidad de los fármacos anti-VIH, los que de por sí son conocidos como potencialmente hepatotóxicos, implicando con ello una disminución en la eficiencia de la erradicación del VIH-1.⁹

El aumento de la sobrevida y el deterioro histológico secundario a la rápida recuperación inmunitaria debido a las nuevas terapias antirretrovirales, además de la citotoxicidad viral directa o toxicidad farmacológica, o ambas , y un riesgo mayor de desarrollo de cirrosis hepática en pacientes coinfectados hacen resaltar la importancia de elucidar los mecanismos moleculares de patogenicidad involucrados en la co-infección con el VIH-1/HCV.

Es importante la identificación de los factores del hospedero, expresados como mecanismos genéticos e inmunológicos que participan en su defensa contra ambos tipos de virus. Por lo que es muy importante intensificar la búsqueda de los factores que influyen en el tiempo de progresión al SIDA y la supervivencia de las personas co-infectadas.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
1.5.1 Marcadores genéticos para el VIH-1: ®
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Numerosos estudios se han enfocado en buscar los factores propios del paciente y del virus que participan en los eventos moleculares que determinan la resistencia y la historia natural de la infección.^{30,31} Se han identificado los receptores en el hospedero que requiere el VIH-1 para infectar a las células blanco y su importancia en el tropismo celular, la transmisión de la infección y en la progresión de la enfermedad.

Hay evidencias de que al menos un 50 % de los individuos infectados por el VIH-1 considerados no progresores, tienen marcadores genéticos que determinan una lenta progresión al SIDA. Se han identificado 8 genes asociados que codifican para: receptores de quimiocinas³⁰, genes MHC⁹ y un inhibidor de citocinas.^{32,33}

Los efectos de las quimiocinas están mediados por receptores membranales. El VIH-1 entra a la célula, la cual presenta a la vez receptores CD4 y CC (quimiocinas β) o CXCR4 (quimiocinas α), mediante un anclaje y una posterior fijación, respectivamente (Figura 7. y Figura 8., página 38). Entre los receptores de quimiocinas se incluyen CXCR4, CCR2, CCR3 y CCR5.³⁴ Se ha comprobado que CCR5 y CXCR4 actúan como los principales correceptores *in vivo*.³⁵⁻³⁷

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

En la entrada del virus a la célula se pueden diferenciar varias etapas: (Figura 8. página 38 y Figura 9. página 39) La unión gp120 (VIH-1)-CD4(célula) modifica la conformación de gp120. Entonces, la secuencia que conforma el bucle V3 de la gp120 queda expuesta (desenmascarada), lo que permite la interacción con el correceptor celular CCR5 en el inicio de la infección, con CCR5 o CXCR4 en la fase intermedia y con CXCR4 en la fase final.

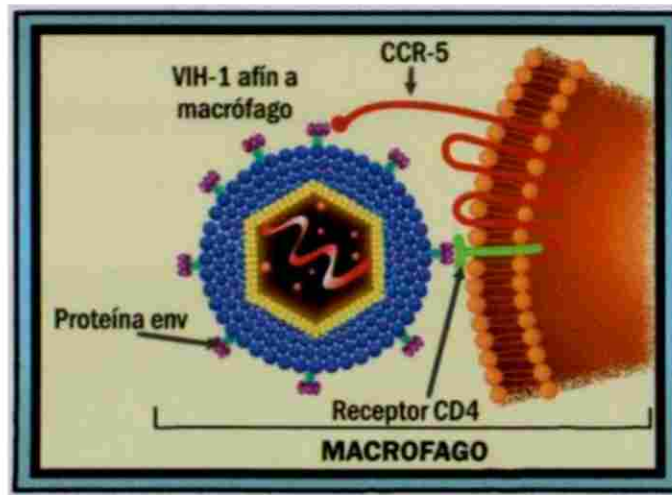


Figura 7. Esquema del anclaje y fijación del VIH-1 a la célula blanco.

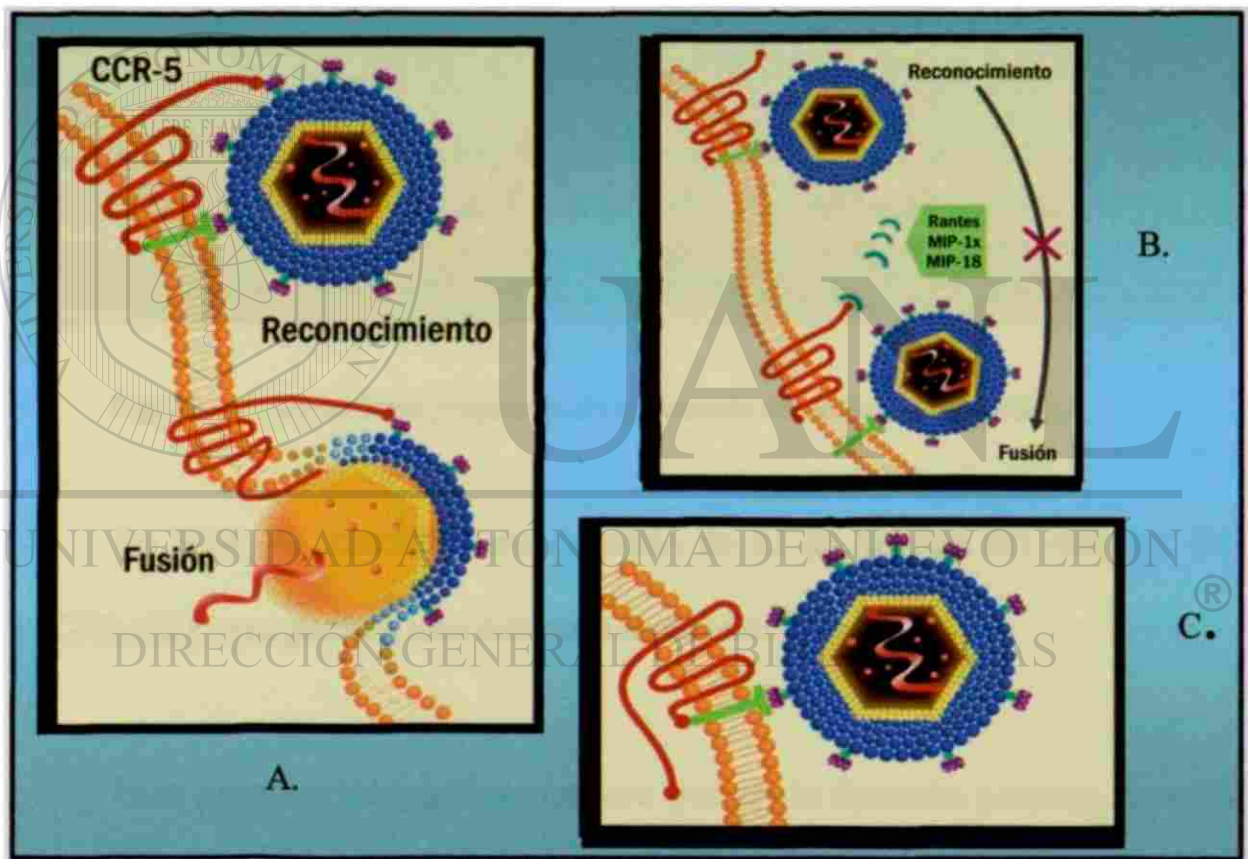


Figura 8. Esquema de la interacción de los receptores de la membrana celular y el VIH-1: A. Reconocimiento, fijación, anclaje y fusión del virus con la membrana celular. B. Competencia de quimioquinas con el VIH-1 por el coreceptor CCR5. C. Expresión defectuosa del coreceptor CCR5 que evita la fijación del VIH-1 a la membrana celular

Se forma, pues, un complejo trimérico gp120-CD4-CCR5 o CXCR4 (Figura 9.). La fusión celular, en la que gp41 desempeña un papel determinante,

entre la membrana celular y el virus se inicia, y el VIH-1 inyecta al interior celular su cápside que contiene los ARN víricos y la retrotranscriptasa.

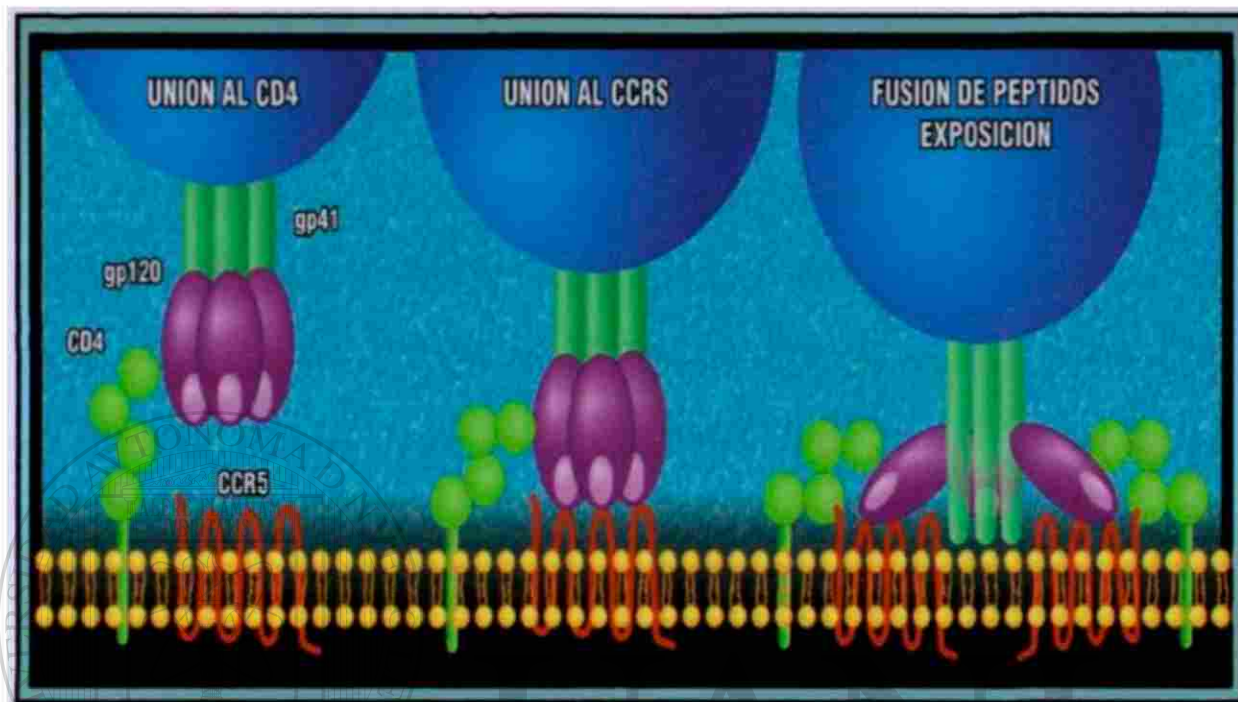


Figura 8. Mecanismo propuesto de asociación del VIH-1 con la célula.

En 1996, se describió una delección de 32 pb del gen del receptor CCR5 (CCR5 Δ 32), que genera una proteína truncada.^{39,44}

Esta proteína truncada se genera porque la delección provoca un cambio en el marco de lectura (aminoácido 185) por la aparición de un codón de finalización prematuro en la secuencia correspondiente al segundo loop extracelular.^{40,41} Esto da como resultado un receptor no funcional, que ya no se ancla en la membrana celular.⁴²

Los individuos homocigotos CCR5 Δ 32/ Δ 32 serían naturalmente resistentes a la infección por el VIH-1 ya que la ausencia del receptor en la superficie celular impide la entrada de cepas VIH-1 R5, que son consideradas las variantes transmisoras. Esto fue corroborado por estudios invitro que demostraron que los cultivos primarios de células mononucleares con genotipo CCR5 Δ 32/ Δ 32 eran resistentes a la infección con VIH-1 R5 pero no con las variantes virales X4, confirmando la especificidad de esta delección inactivante en el correceptor para los virus R5.^{39,40,45,46} En grupos de individuos no infectados con alta exposición al virus se encontro el genotipo CCR5 Δ 32/ Δ 32.

Contrariamente, varios estudios epidemiológicos demostraron la ausencia del genotipo homocigota CCR5 Δ 32/ Δ 32 en individuos VIH-1 infectados, apoyando el rol protector ejercido por este genotipo. Sin embargo el reporte de casos de individuos con genotipo CCR5 Δ 32/ Δ 32 que contrajeron la infección demostraron que esta resistencia no es absoluta.^{47,48,49,50} Probablemente estos individuos hayan adquirido una variante viral que no sea dependiente del CCR5. La baja frecuencia con que ocurren estos casos demuestra que el alelo CCR5 Δ 32 confiere una clara ventaja protectora y que los virus que utilizan el CCR5 son los predominantemente involucrados en la transmisión del VIH-1.

Por lo tanto el genotipo homocigoto CCR5 Δ 32/ Δ 32, se ha asociado a resistencia a la infección por el VIH.⁵¹ El estado heterocigoto de la delección se

encuentra aproximadamente en un 20 % de la población caucásica sana, y el estado homocigoto en solo 1 % de los individuos. Una frecuencia alélica menor del 10 % se ha encontrado en afro-americanos y grupos de hispanos que se han analizado. En general se asume que el estado homocigoto para la delección disminuye la susceptibilidad a la infección, y el estado heterocigoto retarda significativamente el curso de la enfermedad. Tanto las mutaciones de la secuencia codificadora, como de la promotora presentan su efecto alterando la cantidad de receptores CCR5 y afectando la susceptibilidad de las células del hospedero a la infección por VIH y probablemente otros virus como el VHC.⁶⁴

El gen que codifica para la síntesis de CCR5 se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 3 (3p21) y esta compuesto por 4 exones y 2 intrones. Los exones 2 y 3 no están interrumpidos por intrones. El exón 4 contiene la secuencia correspondiente al marco de lectura abierto (ORF), 11 nucleótidos de la región 5' no traducible (UTR) y la secuencia completa de la región 3' UTR. Otra característica de este gen es la presencia de múltiples sitios de inicio de la transcripción que por procesos de splicing alternativos originan distintos transcritos que difieren principalmente en la región 5' UTR.^{65,67}

En la región codificante del CCR5, además de la mutación CCR5-Δ32, por estudios de rastreo genético como el SSCP (polimorfismos conformacionales de cadena simple) y secuenciación, se encontraron 21 nuevas variantes del CCR5 por sustitución puntual, aunque todas son muy poco



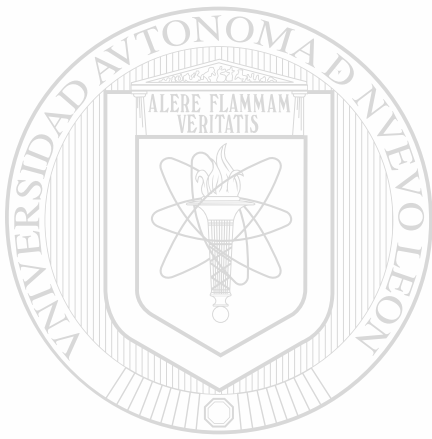
frecuentes.^{68,69,70} La consecuencia funcional de estas formas diferentes aún no se ha establecido. Recientemente se demostró que la región 5' no traducible del CCR5 es altamente polimórfica y que las distintas variantes genéticas podrían influir en la patogenia del VIH-1.^{71,72}

1.5.2 Marcadores genéticos para el VHC:

Los mecanismos que utiliza el VHC para ingresar al interior de los hepatocitos aun se desconocen. Diferentes comunicaciones han resaltado la importancia del genotipo del VHC para explicar una evolución más rápida de la infección con el VIH-1. También se han reportado probables receptores para la entrada del VHC a las células, sin embargo no se ha demostrado con certeza la participación de estos receptores celulares en la internalización del virus. Recientemente se han reportado dos probables receptores del VHC, la proteína CD81 y el receptor para lipoproteínas de baja densidad, LDL. En el plasma los lípidos se encuentran en su mayoría en forma de lipoproteínas constituidas por lípidos y apolipoproteínas (Apos), cuya función es dirigir el destino de la partícula. Las lipoproteínas se han agrupado en 4 grupos: LDL, VLDL, HDL y quilomicrones. Basados en la observación de que las partículas del VHC se asocian con beta-lipoproteínas en suero, Agnello y cols., reportaron que las partículas del VHC asociadas con LDLs eran capaces de ligarse a su receptor (r LDL) y permitir la entrada del virus al hepatocito.^{68,69} Sin embargo, aún se desconoce la participación de este mecanismo en la internalización del virus en las células infectadas. Finalmente, se han reportado polimorfismos en los genes



que codifican para apolipoproteínas que originan formas distintas de proteínas con características biológicas diferentes. Se ha postulado que dichos polimorfismos podrían influenciar el establecimiento o la eliminación de la infección por el VHC. Recientemente Wozniak y cols., reportaron que la presencia del alelo Apo E-e4 protege y disminuye el desarrollo de daño hepático severo en pacientes infectados con VHC.^{62,63}



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

CAPITULO II

JUSTIFICACIÓN

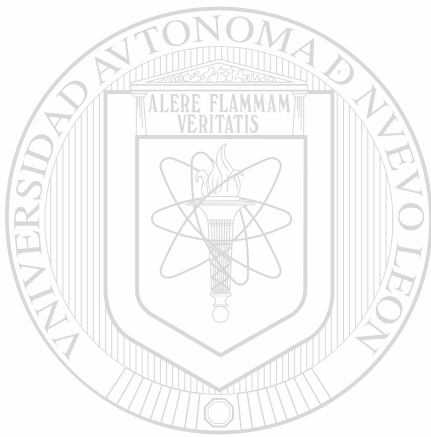
La co-infección con el virus de la hepatitis C (VHC) disminuye la respuesta al tratamiento y sobrevida en sujetos infectados con VIH-1. Ambas infecciones comparte las mismas vías de transmisión, por lo que se estima que en los próximos años la co-infección con el VHC puede ser la causa de hasta un 30-40 % de las muertes en pacientes infectados por VIH-1. En México no existen datos reportados acerca de este tipo de coinfección.

Por otra parte, existen evidencias que apoyan la participación de factores genéticos del huésped en la susceptibilidad o resistencia a la adquisición de la infección por VIH-1 o VHC.

La identificación de cuántos y cuáles son los genes en el huésped que predisponen o condicionan el desarrollo de estas infecciones es fundamental para el diseño y la aplicación de herramientas diagnósticas, terapéuticas y pronósticas específicas; incluso permitirá prevenir o retrasar la aparición de la sintomatología o las complicaciones crónicas de estas infecciones, sin olvidar que, distintos individuos poseen genes de susceptibilidad o resistencia adicionales, que pueden determinar diferencias en la respuesta al tratamiento o al desarrollo de complicaciones.

De igual manera, el conocimiento progresivo de las características genéticas de los grupos étnicos de nuestro país, permitirá conocer tanto las fortalezas como las debilidades de la población mexicana y permitirá desarrollar una mejor medicina preventiva y colectiva.

En base a estos antecedentes, se resalta la importancia de conocer la prevalencia, así como de elucidar los mecanismos moleculares de patogenicidad involucrados en la co-infección con el VIH-1/VHC.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPÍTULO III

3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la prevalencia de la infección con el VHC en un grupo de sujetos infectados con VIH-1 y analizar los polimorfismos de marcadores moleculares asociados a la coinfección.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1. Conocer la prevalencia de la infección con el VHC en un grupo de sujetos infectados con VIH-1.**
- 2. Identificar los polimorfismos de los genes que codifican para el correceptor CCR5 y la apolipoproteína E en un grupo de sujetos infectados y coinfectados con VIH-1 y VHC.**
- 3. Correlacionar los hallazgos moleculares con la presencia de la coinfección en relación al grupo de sujetos infectados únicamente con VIH-1, al grupo infectado con VHC o con el grupo de sujetos que no están infectados con ninguno de los dos virus.**
- 4. Establecer la correlación estadística entre las variables dependientes e independientes (historia clínica, parámetros bioquímicos y polimorfismos de los marcadores genéticos seleccionados) en el contexto de los diferentes grupos de sujetos.**

CAPITULO IV

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio fue aprobado por el Comité de Investigación y Ética de la Subdirección de Posgrado, del Hospital Universitario "Dr. José E. González" de la UANL, con clave BI03-090, en sesión del 29 de Septiembre de 2003, y se realizó en forma prospectiva, transversal, descriptiva y observacional de Septiembre de 2003 a Julio de 2004.

4.1 Área Física

El trabajo se realizó en el laboratorio de Infectología Molecular de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina y en el Servicio de Infectología del Hospital Universitario.

4.2 Sujetos incluidos en el Estudio

4.2.1 Sujetos Controles

Para este proyecto se estableció un grupo de sujetos sanos que aceptaron participar en el estudio y que fueron seleccionados de acuerdo a los siguientes criterios:



Inclusión: ambos géneros, mayores de edad, que aceptaron participar, que fueron negativos a la presencia de anticuerpos contra VIH-1 y VHC.

Exclusión: sujetos menores de edad, pacientes con alteración de la coagulación, que estuvieran en estado agónico, que se negaran a participar, o que tuvieran algún factor de riesgo para la infección por VIH-1 y/o VHC.

4.2.2 Sujetos infectados con VIH-1 y/o VHC

El grupo de estudio se conformó de sujetos infectados con VIH-1. Además se incluyó un grupo de sujetos positivos para el VHC como control. Estos pacientes fueron reclutados como voluntarios y asistían a consulta a los Servicios de Infectología, Gastroenterología y Patología del Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González". Se seleccionaron de acuerdo a los siguientes criterios:

Inclusión: ambos géneros, mayores de edad, con diagnóstico, antecedentes o factores de riesgo de infección por VIH-1 y/o VHC, que aceptaron participar.

Exclusión: sujetos menores de edad, que se negaron a participar.

4.3 Número de Pacientes, Base de Datos y Confidencialidad

A partir de la información recabada de cada uno de los pacientes se generó una base de datos que se utilizó para realizar estudios epidemiológicos y de asociación de las características clínicas y los hallazgos experimentales. La identificación de cada uno de los pacientes fue a través de la asignación de una clave confidencial y se ha mantenido en el anonimato y la confidencialidad en todo momento. Los datos de nombres y claves confidenciales están restringidos para todos los participantes, solo tiene acceso a esta información el responsable del proyecto. El número de pacientes que se incluyó se estableció en función de la proporción del número de pacientes con infección por VIH-1 que eran atendidos y se les llevaba un seguimiento en dicho centro hospitalario, respecto al total de pacientes que asistieron a este hospital regional. El número que se estimó de pacientes VIH-1 para este estudio fue de 60. Sin embargo se incluyeron todos los pacientes que aceptaron participar y que de forma consecutiva acudieron a una consulta programada durante el período comprendido de Septiembre de 2003 a Julio de 2004.

4.4 Material Biológico

A cada uno de los sujetos incluidos en este estudio se les tomó una muestra de sangre periférica, obtenida por punción venosa en una única ocasión, empleando tubos vacutainer con EDTA, así como material desechable estéril. La cantidad de muestra que se obtuvo fue de 10 ml.

Inmediatamente después de tomada la muestra, ésta se colocó en hielo y fué transportada al Laboratorio de Infectología Molecular, en donde se centrifugó para separar el plasma y el paquete leucocitario.

Del plasma se hicieron diferentes alícuotas, las cuales fueron colocadas en tubos eppendorf, etiquetadas y conservadas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

A partir del paquete de leucocitos se extrajo el ADN, el cual fue conservado en tubos eppendorf a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, también debidamente etiquetados.

4.5 Reactivos

Los reactivos y el material empleado fueron los siguientes:

Para las reacciones de PCR se empleo la enzima TaqDNA plimerasa, el MgCl_2 y buffer de PCR de Promega Corporation (Madison, WI, EUA). Los dNTPs fueron adquiridos de GIBCO-BRL LIFE TECHNOLOGIES (Grand Island, NY, EUA).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

La enzima de restricción que se empleo (*Hha I*) para digerir los productos amplificados fue adquirida de New England Biolabs Inc (Beverly, MA, EUA).

Para las reacciones de RT-PCR se utilizó la enzima SuperScript™ II RNasa H- Transcriptasa Reversa ó bien MMLV, Random primers, Buffer First-Strand 5X, DTT y RNaseOUT inhibidor de Invitrogen™ Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA).

Los geles fueron preparados con agarosa grado analítico adquirida de Invitrogen™ Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA).

El ácido bórico y Trizma® base de SIGMA CHEMICAL CO (St. Louis, MO, EUA) y el EDTA de Amersham/Life Science (Cleveland, OH, EUA) fueron utilizados para preparar el buffer de corrida TBE. Entre otros reactivos que fueron necesarios para preparar las soluciones requeridas se encuentran SDS y NaCl, también de SIGMA CHEMICAL CO (St. Louis, MO, EUA).

Los solventes orgánicos utilizados como cloroformo y etanol, fueron de grado analítico y provenían de la casa comercial Merck® (EM SCIENCE, Gibbstown, NJ, EUA).

El trizol se adquirió de GIBCO-BRL LIFE TECHNOLOGIES (Grand Island, NY, EUA).

El material de plástico que se utilizó fueron tubos eppendorf (0.5, 1.5 y 2.0 ml) y puntillas (0.01, 0.2 y 1.0 ml) para las micropipetas de BIOMOL SA de CV, Monterrey NL, Méx. Los tubos falcón de 15 ml y los guantes de látex utilizados eran de la marca Cel Associates, Houston, TX, EUA.

4.6 Equipo

Se utilizó una microcentrífuga eppendorf modelo 5415 C; balanza digital Sartorius modelo 1206 MP; balanza analítica OHAUS modelo APL1; incubadora SHEL-LAB y horno de microondas Gold star. La cámara de electroforesis horizontal que se utilizó, incluyendo su fuente de poder, son de marca BIO-RAD Life Science Research Products. El termociclador utilizado para las reacciones de PCR es de la casa comercial Eppendorf.

4.7 Programas de Análisis Computacional

El procesamiento de datos se llevó a cabo en una computadora personal TOSHIBA.

Se utilizó un sistema de análisis dimensional de geles compatible con PC, constituido de una cámara de video, una fuente de luz UV y una computadora (Gel Documentation_System 1000, BIO-RAD).

El procesador de texto y gráficos utilizados fueron Microsoft® Word 2000 y Microsoft® Power Point 2000 de Microsoft Corporation. Para el análisis estadístico se empleó la hoja de cálculo Microsoft Excel 2000 (Microsoft Corporation), los programas SPSS, RXC y Epi info™ 2002.

Los programas utilizados por vía internet fueron: Entrez [National Center for Biotechnology Information (NCBI)], Centres for Disease Control (CDC). El navegador de Internet que se uso fue Microsoft Explorer Versión 6.0 (Microsoft Corporation).

4.8 Métodos

4.8.1 Datos Demográficos e Historia Clínica

Los datos demográficos y la historia clínica fue captada por el Médico durante la consulta. Esta información fue integrada en la base de datos confidencial mencionada con anterioridad.

4.8.2 Estudios Serológicos

Para conocer la prevalencia de la co-infección con VIH-1 y VHC en la población de estudio se realizó un estudio de corte transversal. Para ello se llevó a cabo el análisis serológico y molecular de todos los sujetos que reunieron los criterios de inclusión antes descritos. (Figura 10.)

La muestra sanguínea tomada a cada uno de los sujetos se utilizó para:

- 1) Estudios bioquímicos: determinación de perfil hepático (bilirrubinas, TP, GGT, AST y ALT).

- 2) **Estudios serológicos:** determinación de anticuerpos anti-VHC y anti-VIH-1 utilizando los estuches comerciales de Abbot de 3ª generación y siguiendo los protocolos del proveedor.
- 3) **Estudios moleculares:** identificación cualitativa del genoma viral por PCR y PCR anidado (VIH-1 y VHC). Identificación de los polimorfismos del gen que codifica para la Apolipoproteína E y del gen que codifica para el correceptor CCR5.

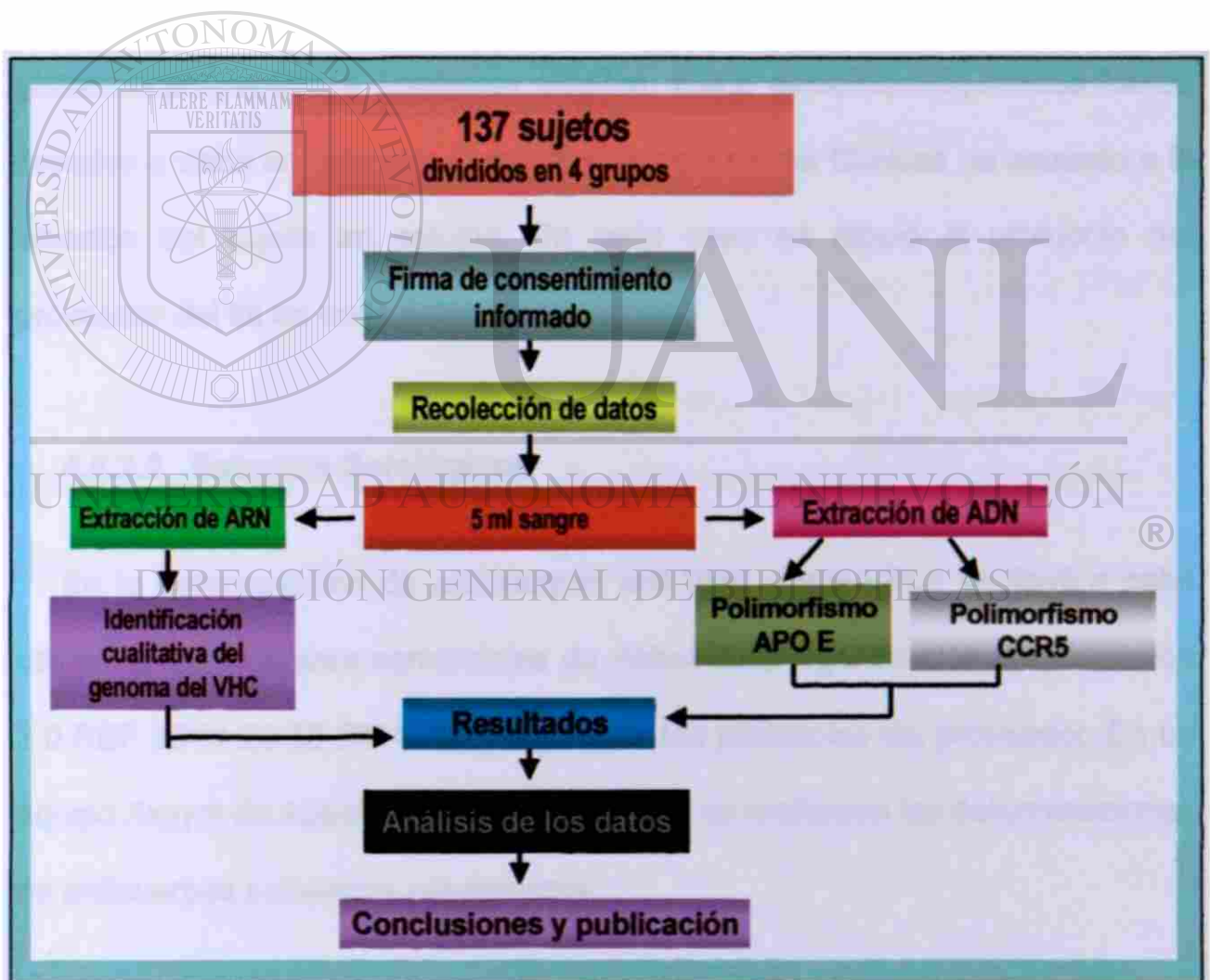


Figura 10. Esquema simplificado del proceso que se siguió en la determinación de la frecuencia de los polimorfismos del gen que codifica para el correceptor CCR5 y del gen que codifica para la Apo E, así como para la identificación cualitativa del genoma del VHC.

Por ser metodologías desarrolladas dentro de protocolos de investigación previamente publicados han sido completamente validados de acuerdo a los métodos previamente reportados por otros grupos de investigación.

4.8.2.1 Estudios Bioquímicos

Los parámetros bioquímicos que fueron considerados son: Bilirubinas, Aspartato aminotransferas, Alanin aminotransferasa, Gama glutamintranspeptidasa Fosfatasa alcalina. Estos estudios bioquímicos fueron llevados a cabo en diferentes laboratorios de Análisis Clínicos de acuerdo a la elección del sujeto en estudio. En cada caso se siguió el protocolo del proveedor del kit de cada determinación.

4.8.2.2 Estudios Serológicos

En la determinación de anticuerpos anti-VHC y anti-VIH-1 se llevó a cabo utilizando los estuches comerciales de Abbot de 3^a generación (VHC versión 3.0 REF 3B44-20 33-0314/R5) y siguiendo los protocolos del proveedor. En un equipo AxSYM de Abbott (Abbott Park, IL, EU) se realizaron las determinaciones de anticuerpos señalados previamente.

4.8.3 Estudios Moleculares

4.8.3.1 Análisis Cualitativo del VHC

Para la identificación de la presencia de VHC en los pacientes VIH-1 positivos, se aisló el ARN viral del VHC a partir del plasma del paciente mediante la técnica de Chomczynski-Sacchi, se obtuvo el cADN, posteriormente se amplificó por PCR utilizando oligonucleótidos específicos para amplificar una secuencia altamente conservada del VHC, y se evaluaron los amplicones por electroforesis en gel de agarosa al 2 %. Para llevar a cabo el proceso antes descrito se siguieron las técnicas que a continuación se describen:

4.8.3.1.1 Extracción de ARN Viral por la Técnica de Chomczynski-Sacchi.

A partir del plasma separado de la muestra de sangre periférica de cada paciente se realizó la extracción de ARN para identificar la presencia del genoma del VHC utilizando el siguiente procedimiento:⁷³

Se colocaron 400 μ l de plasma en un tubo eppendorf y se les añadió 600 μ l de trizol; fueron mezclados perfectamente y colocados en hielo por 5 minutos. A esta mezcla se le añadió 200 μ l de cloroformo grado analítico; nuevamente todo fue mezclado y colocado en hielo por 5 minutos.

Posteriormente se centrifugó a 8,000 rpm por 5 minutos a 4 °C.

La fase acuosa fue recuperada en otro tubo eppendorf y se le añadió 600 μ l de isopropanol grado analítico. Se mezcló todo nuevamente y se dejó reposar por 1 hora a -20 °C.

Completado este tiempo de incubación se centrifugó la mezcla a 14,000 rpm por 20 minutos a 4 °C. Se decantó y se dejó secar a temperatura ambiente por 10 minutos.

El sedimento fue resuspendido en 50 μ l de H₂O con DEPC estéril, y luego se le añadieron 150 μ l de etanol 100 %.

Se procedió a centrifugar la mezcla anterior a 14,000 rpm por 20 minutos a 4 °C. Al terminar de centrifugar se decantó y el residuo se dejó secar por 10 minutos. Este residuo fue resuspendido en 20 μ l de H₂O con DEPC estéril y lo utilizamos inmediatamente. Cuando no fue posible utilizarlo inmediatamente se almacenó a 170 °C.

4.8.3.1.2 Reacción de Retrotranscripción Asociada a Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)

Este método se utilizó para sintetizar a partir del ARN viral una hebra complementaria, para posteriormente amplificarla por PCR y de esta manera detectarla fácilmente por métodos de electroforesis.

Fundamento:

Es una amplificación de ARN a través de la síntesis de su cADN (ADN complementario al ARN), que después se amplifica por PCR. Es decir, no se obtienen copias del ARN de partida, sino de ADN, aunque se conserva obviamente la secuencia complementaria de aquél. Para esta reacción se emplean los siguientes componentes: muestra de ARN, transcriptasa inversa, buffers para cada una de las enzimas, dNTPs, cebadores y TaqDNA polimerasa.⁷⁴

Condiciones de la reacción de RT-PCR para amplificar el VHC

Las reacciones de RT-PCR se prepararon de acuerdo con los siguientes parámetros:

En un tubo eppendorf estéril de 200 μ l se preparó la siguiente mezcla:

ARN total 3 μ l

H₂O miliQ DEPC 6 μ l (5)^{*}

Esta mezcla se incubó a 72 °C por 10 minutos, posteriormente se mantuvo en HIELO por 5 minutos, y se preparó la siguiente mezcla maestra:

Buffer 5X 4 μ l

DTT 2 μ l

dNTPs 10 mM 2 μ l

Random Primers 1 μ l

ARNs inhibidor	1 μl
ARN / H₂O milliQ DEPC	9 μl (8)*
VOLUMEN TOTAL	19 μl (18)*

De la mezcla maestra antes mencionada se tomaron 10 μ l para cada muestra y se le añadió a cada tubo 1 μ l de la enzima Superscript o 2 μ l * de la enzima MMLV. Posteriormente se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos. Transcurrido este tiempo, los tubos con las mezclas de reacción se colocaron en el termociclador para que se llevara a cabo el programa de amplificación de la hebra complementaria del ARN del VHC, que consistía en incubar la muestra a 37 °C por una hora y posteriormente a 95 °C por cinco minutos. (Tabla II)

Tabla II Programa de amplificación aplicado en la RT-PCR para la determinación cualitativa del Virus de la Hepatitis C.

TEMPERATURA	TIEMPO
1. 37 °C	1 hora
2. 95 °C	5 min
El cADN obtenido se conserva a -20 °C	

Una vez obtenido el producto amplificado del cADN del ARN del VHC, se procedió a la identificación del VHC mediante el uso de una PCR que amplificara un segmento específico y altamente conservado del genoma viral.

Para esta reacción se usaron oligonucleótidos⁷⁷ que ya han sido validados y que son empleados rutinariamente en el Laboratorio de Infectología Molecular/Diagnóstico Molecular Sección Infectología, siendo los que se señalan a continuación (Tabla III):

Tabla III Información general de los Primers empleados en la primera amplificación para la identificación cualitativa del VHC.

Primers usados en la primera PCR para la identificación cualitativa del VHC					
Primer	Secuencia 5'-3'	Localización	Tamaño pb	Gen	Referencia
UHCV1	CTGTGAGGAACTACTGTCTTC	-297 a -277	223	VHC	Yamada M. DigDisSci. 1994;2:234-239.
DHCV2	CAACTACTCGGCTAGCAGT	-96 a -76	223	VHC	Yamada M. DigDisSci. 1994;2:234-239.

La mezcla maestra para esta Reacción en Cadena de la Polimerasa fué:

Buffer 10X	5 µl
Oligo HCV1-U 10 µM	2 µl
Oligo HCV2-D 10 µM	2 µl
dNTPs 10 mM	2 µl
MgCl ₂ 25 mM	1.5 µl
TaqDNA polimerasa 5U/µl	0.5 µl
H ₂ O miliQ	35 µl
ADNc	2 µl
VOLUMEN TOTAL	50 µl

Y las condiciones de amplificación para esta Reacción en Cadena de la Polimerasa son las que se señalan en la Tabla IV.

Tabla IV Programa de amplificación para la determinación cualitativa del Virus de la Hepatitis.

TEMPERATURA	TIEMPO
1. 94 °C	5 min
2. 94 °C	1 min
3. 58 °C	1 min
4. 72 °C	1 min
5. 72 °C	10 min

Los pasos del 2 al 4 se repitieron por 35 ciclos
El producto de amplificación que se obtuvo fue de 223 pb

Con el fin de aumentar la sensibilidad y especificidad en la detección del VHC, se llevó a cabo una PCR ANIDADA, utilizando la mezcla maestra que se describe a continuación:

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Buffer 10X	5 µl
Oligo HCV3-U 10 µM	2 µl
Oligo HCV4-D 10 µM	2 µl
dNTPs 10 mM	2 µl
MgCl ₂ 25 mM	1.5 µl
TaqDNA polimerasa 5U/µl	0.25 µl

H ₂ O miliQ	36.25 µl
Producto amplificado de la primera PCR	1 µl
VOLUMEN TOTAL	50 µl

Los oligonucleótidos⁷⁷ empleados como cebadores en esta PCR ANIDADA también ya han sido validados y son empleados rutinariamente en el Laboratorio de Infectología Molecular/Diagnóstico Molecular Sección Infectología, siendo los que se señalan a continuación (Tabla V):

Tabla V Información general de los Primers empleados en la segunda amplificación para la identificación cualitativa del VHC.

Primers usados en la PCR ANIDADA para la identificación cualitativa del HCV					
Primer	Secuencia 5'-3'	Localización	Tamaño pb	Gen	Referencia
UHCV3 N	ACGCAGAAAGCGTCTAGCCAT	-276 a -255	194	HCV	Yamada M. DigDisSci. 1994;2:234-239.
DHCV4 N	ACTCGGCTAGCAGTCTTGCGG	-102 a -84	194	HCV	Yamada M. DigDisSci. 1994;2:234-239.

Y las condiciones del programa del termociclador para realizar esta segunda amplificación son las que se señalan en la Tabla VI.

Tabla VI Programa de amplificación aplicado en la PCR ANIDADA para la determinación cualitativa del Virus de la Hepatitis C.

TEMPERATURA	TIEMPO
1. 94 °C	5 min
2. 94 °C	1 min
3. 58 °C	1 min
4. 72 °C	1 min
5. 72 °C	10 min

Los pasos del 2 al 4 se repitieron por 35 ciclos
El producto de amplificación esperado es de 194 pb

4.8.3.2 Análisis de Polimorfismos de los Genes que Codifican para el Correcceptor CCR5 y la Apolipoproteína E.

Para el análisis de polimorfismos de los receptores CCR5 y genotipos de Apo E, se extrajo ADN genómico a partir de los leucocitos de la sangre periférica que se tomó de los sujetos incluidos en el estudio (10 ml). Posteriormente se amplificaron las secuencias específicas de ADN que codifican para estas proteínas mediante PCR, utilizando iniciadores específicos. Para la determinación de los polimorfismos del gen que codifica para la Apolipoproteína E se realizó el análisis de fragmentos polimórficos con enzimas de restricción (RFLPs), en donde se usó la enzima *Hha I*. Con el fin de realizar el proceso antes descrito se siguieron las técnicas que a continuación se describen:

4.8.3.2.1 Extracción de ADN genómico por la técnica de TSNT

De las muestras de sangre periférica se hizo la separación del paquete leucocitario, a partir del cual se realizó la extracción de ADN genómico mediante el siguiente protocolo:⁷³

En un tubo eppendorf de 2 ml se colocan 500 μ l de paquete globular leucocitario y se le añadieron 200 μ l de buffer de lisis TSNT (Tritón 100X 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris-HCl pH 8.0 10 mM) y se mezclaron por inversión por unos segundos para lograr una lisis total.

Posteriormente, a este lisado se le añadieron 500 μ l de fenol pH 8.0 y se mezcló ligeramente. Esta mezcla se colocó en hielo por 3 minutos.

Transcurrido este tiempo fueron añadidos 100 μ l de solución sevag [cloroformo:alcohol isoamílico (49:1)] y se mezcló por 5 minutos en bortex.

Luego se le añadió 100 μ l de TE 1X, se mezcló y se dejó reposar en hielo por 3 minutos.

Se procedió a centrifugar esta mezcla a 10,000 rpm por 8 minutos. Una vez separadas las fracciones, la fase acuosa se paso a otro tubo y se le añadieron 2.5 partes de etanol 100 %, además, se le adicionó 100 μ l de acetato de sodio y se dejó reposar por 3 minutos en hielo.

Después de este tiempo se centrifugó a 14,000 rpm por 15 minutos. Se separaron las fases por decantación y la pastilla que se formó se dejó secar al aire (no mas de 2 horas).

Finalmente esta pastilla fue resuspendida en agua milliQ estéril (50 µl).

Las muestras de ADN obtenidas por este procedimiento fueron conservadas a -20 °C.

El ADN obtenido fue cuantificado por espectrofotometría, determinando la absorbancia a 260 nm y a 280 nm. La pureza del ADN fue evaluada con la relación entre el valor de la absorbancia a 260 nm y a 280 nm, considerándose una pureza adecuada cuando ésta relación fuese mayor a 1.75. Dado que un valor de absorbancia de 1 densidad óptica (DO) corresponde a 50 µg/ml de ADN genómico, se calculó la concentración en cada muestra según la siguiente

fórmula:⁷³

$$\text{Concentración de ADN} = (\text{Absorbancia a 260 nm}) (50) (\text{dil})$$

4.8.3.2.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Es una técnica que permite amplificar rápidamente *in vitro* un fragmento específico de ADN, consiguiendo millones de copias del segmento de interés.

Fundamento:

Esta técnica analítica resulta de la aplicación de las etapas de desnaturalización, alineamiento y extensión de forma cíclica, empleando los siguientes elementos para la amplificación del ADN: dNTPs, oligonucleótidos

complementarios a la secuencia blanco específica, y TaqDNA polimerasa. Las regiones amplificadas varían entre 130 y 1,000 pb de longitud.⁷⁴

Oligonucleótidos utilizados.

Los oligonucleótidos que utilizamos para la amplificación de los genes que codifican para el correceptor CCR5⁵⁴ y para la Apolipoproteína E⁷⁰, ya están validados y son empleados en el Laboratorio de Infectología Molecular/ Diagnóstico Molecular Sección Infectología, siendo los que se señalan a continuación (Tabla VII):

Tabla VII Características principales de los oligonucleótidos empleados en la determinación de los polimorfismos del gen que codifica para CCR5 y el gen que codifica para la Apolipoproteína E.

Primer	Secuencia 5'-3'	Tamaño pb	Gen	Referencia
Apolipoproteína E				
U-ApoE	TCCAAGGAGCTGCAGGCGGCGCA	227	Apo E	Wenham PR. Lancet 1991;337:1158-1159
D-ApoE	ACAGAATTCGCCCGGCCTGGTACACTGCCA	227	Apo E	Wenham PR. Lancet 1991;337:1158-1159
Correceptor CCR5				
U-CCR5	CAAAAAGAAGGTCTTCATTACACC	189 wt / 157 Δ 32	CCR5	Woitars RP, Gastroenterol 2002;122:1721-1728
D-CCR5	CCTGTGCCTCTTCTTCATTTCG	189 wt / 157 Δ 32	CCR5	Woitars RP, Gastroenterol 2002;122:1721-1728

Para la amplificación del gen que codifica para la Apolipoproteína E fue empleada la siguiente mezcla maestra:

Buffer 10X	5 μ l
Oligo UApoE 10 μ M	2.5 μ l
Oligo DApoE 10 μ M	2.5 μ l
dNTPs 10 mM	1 μ l
MgCl ₂ 25 mM	3 μ l
Tritón 2 %	2.5 μ l
DMSO 100 %	2.5 μ l
TaqDNA polimerasa 5U/ μ l	0.5 μ l
H ₂ O miliQ	28.5 μ l
ADN	2 μ l
VOLUMEN TOTAL	50 μl

Y las condiciones para la amplificación que fueron usadas en el termociclador son las que se señalan en la Tabla VIII.

Tabla VIII Programa para la amplificación del gen que codifica para la Apolipoproteína E.

TEMPERATURA	TIEMPO
1. 95 °C	3 min
2. 95 °C	20 seg
3. 60 °C	30 seg
4. 72 °C	20 seg
5. 72 °C	5 min

Los pasos del 2 al 4 se repitieron por 40 ciclos

El producto de amplificación esperado fue de 227 pb.

Con respecto a la amplificación del gen que codifica para el coreceptor CCR5, fue utilizada una mezcla maestra cuyos componentes son los siguientes:

Buffer 10X	5 μl
Oligo UCCR5 10 μM	1 μl
Oligo DCCR5 10 μM	1 μl
DNTPs 10 mM	1 μl
MgCl₂ 25 mM	3 μl
TaqDNA polimerasa 5U/μl	0.25 μl
H₂O miliQ	36.75 μl
ADN	2 μl
VOLUMEN TOTAL	50 μl

Y las condiciones programadas en el termociclador para una apropiada amplificación del gen que codifica para el coreceptor CCR5 son las que se indican en la Tabla IX.

El producto de amplificación que obtuvimos fue de 189 pb para el wibe tape (WT) y de 157 pb para la delección Δ 32.

CAPITULO V

RESULTADOS

5.1 Sujetos incluidos en el estudio

En este estudio participarán 62 pacientes VIH-1 positivo, 13 pacientes VHC positivos y 62 sujetos sanos. Los sujetos sanos presentaron serología negativa para el VIH-1, para el VHC y para el VHB, y se les realizó una evaluación clínica mediante la cual se determinó que tenían buen estado de salud.

A todos ellos se les tomó muestra de sangre periférica a partir de la cual se realizaron los estudios. Los sujetos sanos que participaron se eligieron con características de sexo, edad, lugar de origen y lugar de residencia, que permitieran quedar pareados con los pacientes VIH-1 positivo.

Tabla X Número de sujetos que integran cada grupo de estudio.

GRUPO DE ESTUDIO	NÚM. DE SUJETOS (n)
VIH-1 - / VHC -	62
VIH-1 + / VHC -	62
VIH-1 + / VHC +	8
VIH-1 - / VHC +	13

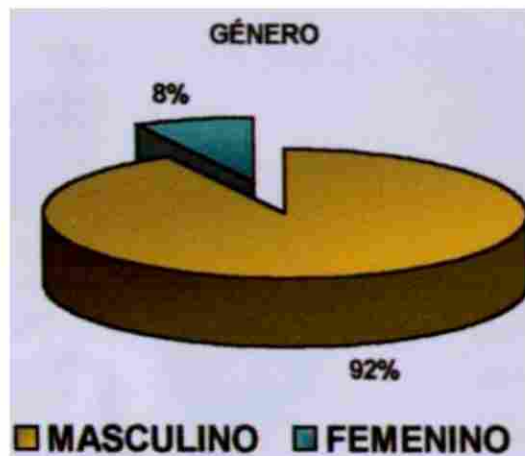
5.2 Características demográficas y clínicas de los sujetos incluidos en el estudio

El grupo de pacientes en estudio (VIH-1 +) y el grupo control de sujetos sanos presentaron una relación de género masculino:femenino de 11:1 (Figura 11.); la edad promedio (desviación estandar) del primer grupo fue de 34 (9.29) años con un rango de variación de 18 a 55 años, mientras que el grupo control presento un promedio (desviación estandar) de 32 (8.92) años con un rango de 18 a 55 años.

Con respecto al grupo de sujetos coinfectados, todos ellos fueron del sexo masculino y presentaron una edad promedio (desviación estandar) de 37.5 (13.54) años y un margen de variación que va de 23 a 55 años; mientras que en el grupo control de personas con mono infección por VHC la edad promedio (desviación estandar) fue de 42 (7.73) años y un rango de variación de 32 a 54 años, presentando una relación masculino:femenino de 1:1.6 (Tabla XI).

Tabla XI Características de sexo y edad de los sujetos que integran cada grupo de estudio.

GRUPO DE ESTUDIO	SEXO (masc/fem)	EDAD (min/max)
VIH-1 - / VHC -	57 / 5	32 (18-55) DS 8.92
VIH-1 + / VHC -	57 / 5	34 (18-55) DS 9.29
VIH-1 + / VHC +	6 / 0	37.5 (23-55) DS 13.54
VIH-1 - / VHC +	5 / 8	41 (32-54) DS 7.73



Relación M/F 11:1

Figura 11. Distribución porcentual de los pacientes VIH-1 + según el sexo.

El 79 % de los pacientes VIH-1 + tienen una edad menor de 40 años (Figura 12.). El 78 % de este grupo es originario del Noreste de México y el 84 % reside en Monterrey y su área metropolitana (Figuras 13. y 14.).

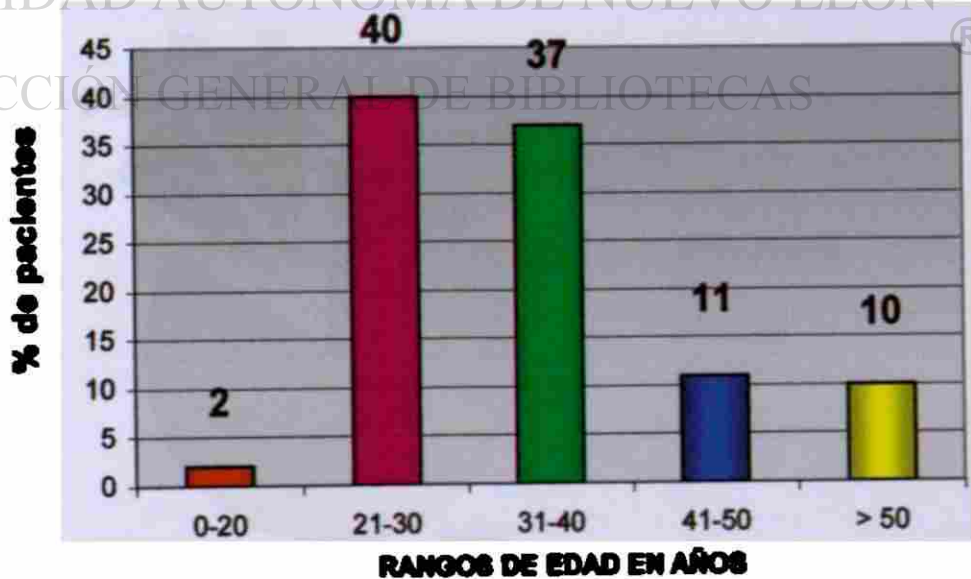


Figura 12. Distribución porcentual de los pacientes VIH-1 + según la edad.

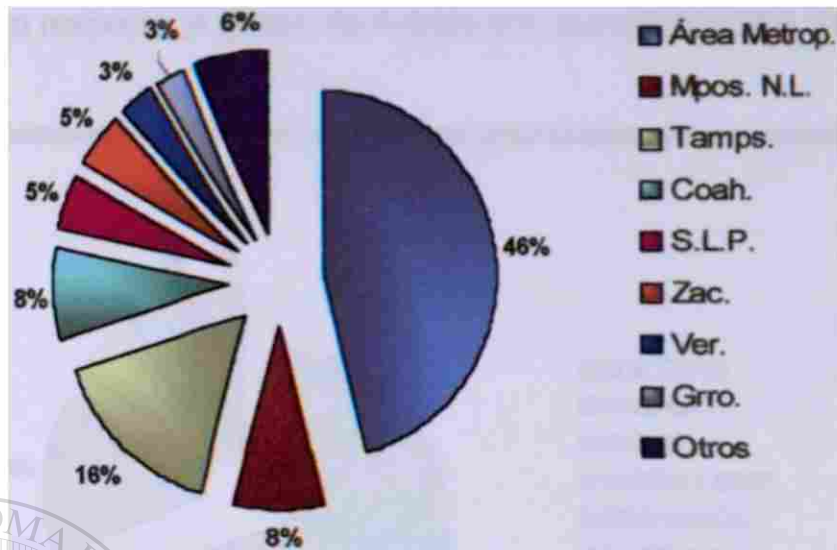


Figura 13. Distribución porcentual de los pacientes VIH-1 + según su lugar de origen.

El 87 % del grupo de casos (VIH-1 +) tiene una escolaridad mayor a la primaria; el 69 % es soltero y el 60 % se encuentra desempleado (Figuras 15., 16., y 17.).

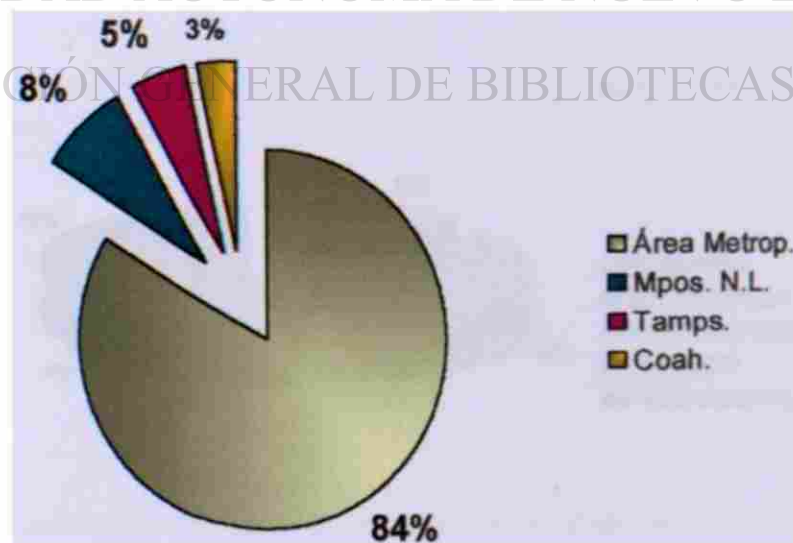


Figura 14. Distribución porcentual de los pacientes VIH-1 + según su lugar de residencia.

El comportamiento del grupo de sujetos coinfectados VIH-1 + / VHC + con respecto a las variables descritas previamente, no presentan una diferencia significativa con respecto al grupo de sujetos con mono infección por VIH-1 +.

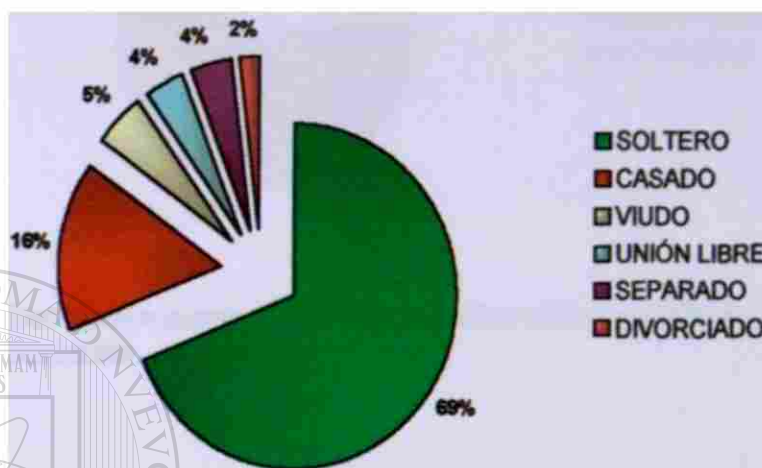


Figura 15. Distribución porcentual de los pacientes VIH-1 + según su estado civil.

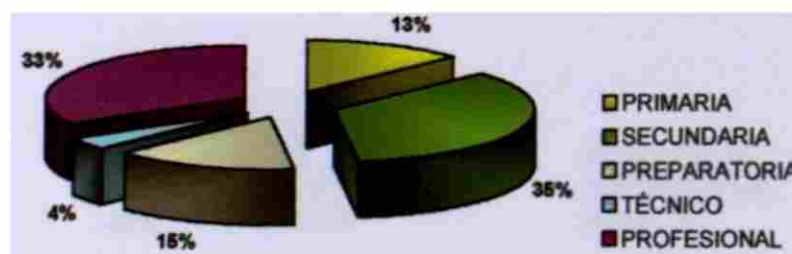


Figura 16. Distribución porcentual de los pacientes VIH-1+ según su grado escolar.

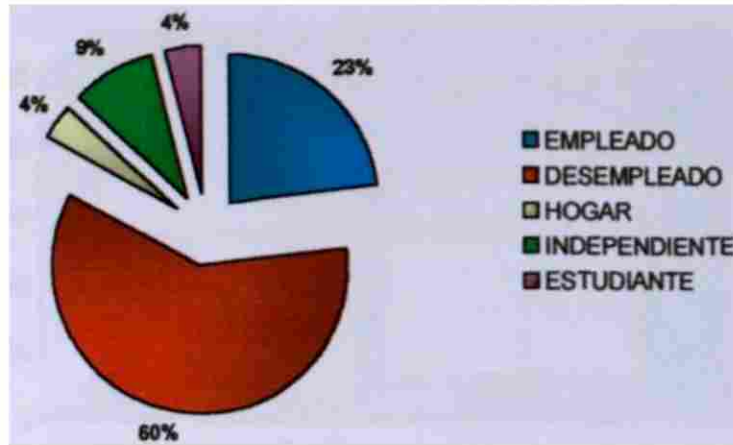


Figura 17. Distribución porcentual de los pacientes VIH-1 + según su ocupación.

5.3 FACTORES DE RIESGO

La orientación sexual del 42 % de los casos es homosexual; un 49 % es heterosexual y el 9 % es bisexual (Figura 18.).

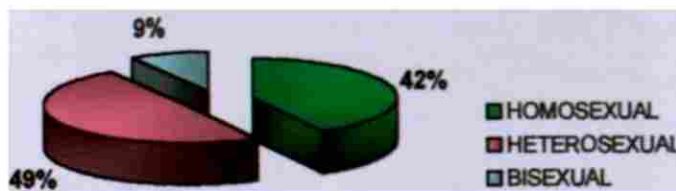


Figura 18. Distribución porcentual de los pacientes VIH-1 + según su orientación sexual.

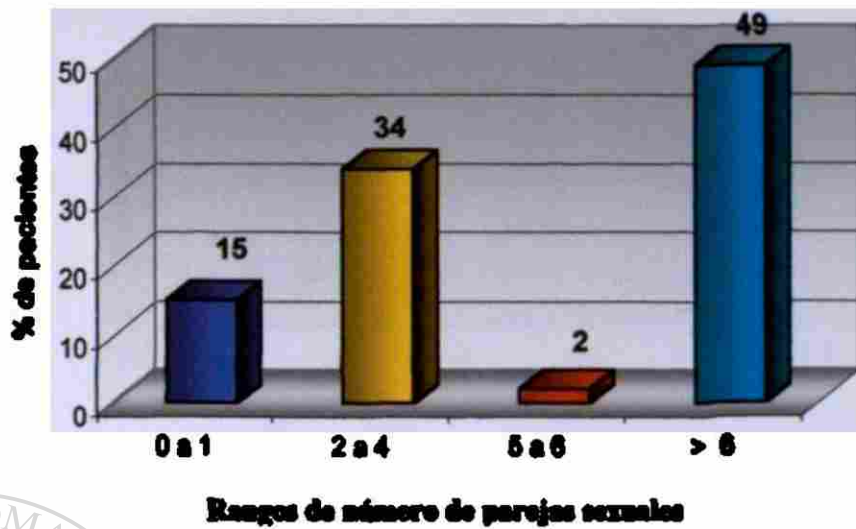


Figura 19. Distribución porcentual de los pacientes VIH-1 + según el número de parejas sexuales que han tenido.

Un 43 % de los sujetos VIH-1 + refieren haber tenido otra enfermedad de transmisión sexual y el 85 % de ellos ha tenido más de una pareja (Figuras 19. y 20.).

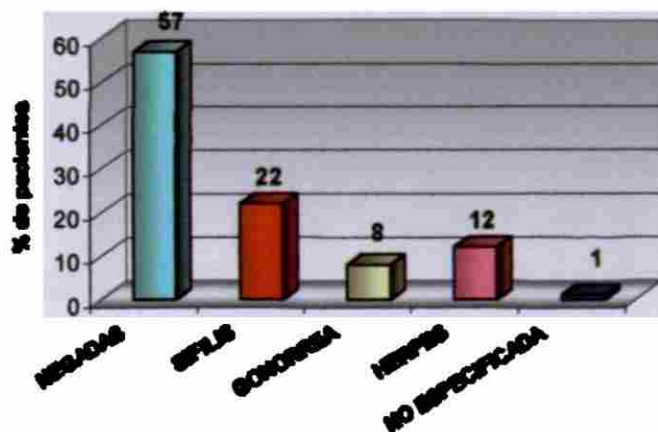


Figura 20. Distribución porcentual de los pacientes VIH-1 + según otras enfermedades de transmisión sexual que han padecido.

Tampoco se encontró diferencia importante en los valores de alaninaminotransferasa (ALT) y aspartatoaminotransferasa (AST) entre los casos y los controles. Sin embargo, los valores de la gamaglutamintranspeptidasa (TGG) y de la fosfatasa alcalina de los casos fueron ligeramente más elevados que el de los controles, pero no presentaron una diferencia estadísticamente significativa.

Tabla XII Parámetros bioquímicos y virológicos del grupo de estudio y del grupo control.

Parámetros Bioquímicos	VIH-1 - VHC - (Gpo I)	VIH-1 + / VHC - (Gpo II)	VIH-1 +/ VHC + (Gpo III)
<i>Actividad de aminotransferasas (U/L)</i>			
ALT	27.5 (0-55)	61.44 (9-276) DS 65.17	56 (15-88) DS 29.23
AST	19.5 (5-34)	75.73 (16-533) DS 94.46	81 (23-147) DS 45.06
TGG	55 (10-100)	312.08 (16-1957) DS 544.81	345 (104-693) DS 308.73
<i>Fosfatasa (U/L)</i>			
Fosfatasa alcalina	55 (0-110)	237.54 (9-276) DS380.81	246.6 (71-480) DS 210.63
<i>Estado de VIH-1</i>			
CD4 cuenta/μl	500 - 1500	144.17 (9-528) DS 148.62	163.6 (14-963) DS 187.05
Carga Viral copias/ml	0	176.965 (50-750,000) DS 211,729	127,947 (598-554,061) DS 240,241.68

5.4 Identificación Cualitativa del Genoma del VHC en un Grupo de Sujetos Infectados con VIH-1.

A partir del cADN sintetizado a partir del ARN extraído de la muestra de plasma de cada paciente VIH-1 + se realizó la identificación del genoma del VHC, utilizando, como se señalo previamente, PCR anidado y electroforesis en gel de agarosa al 2 % para evaluar los productos amplificados. A continuación se muestra una fotografía con los productos amplificados de cADN-VHC de 221 y 193 pb (Figura 23.).

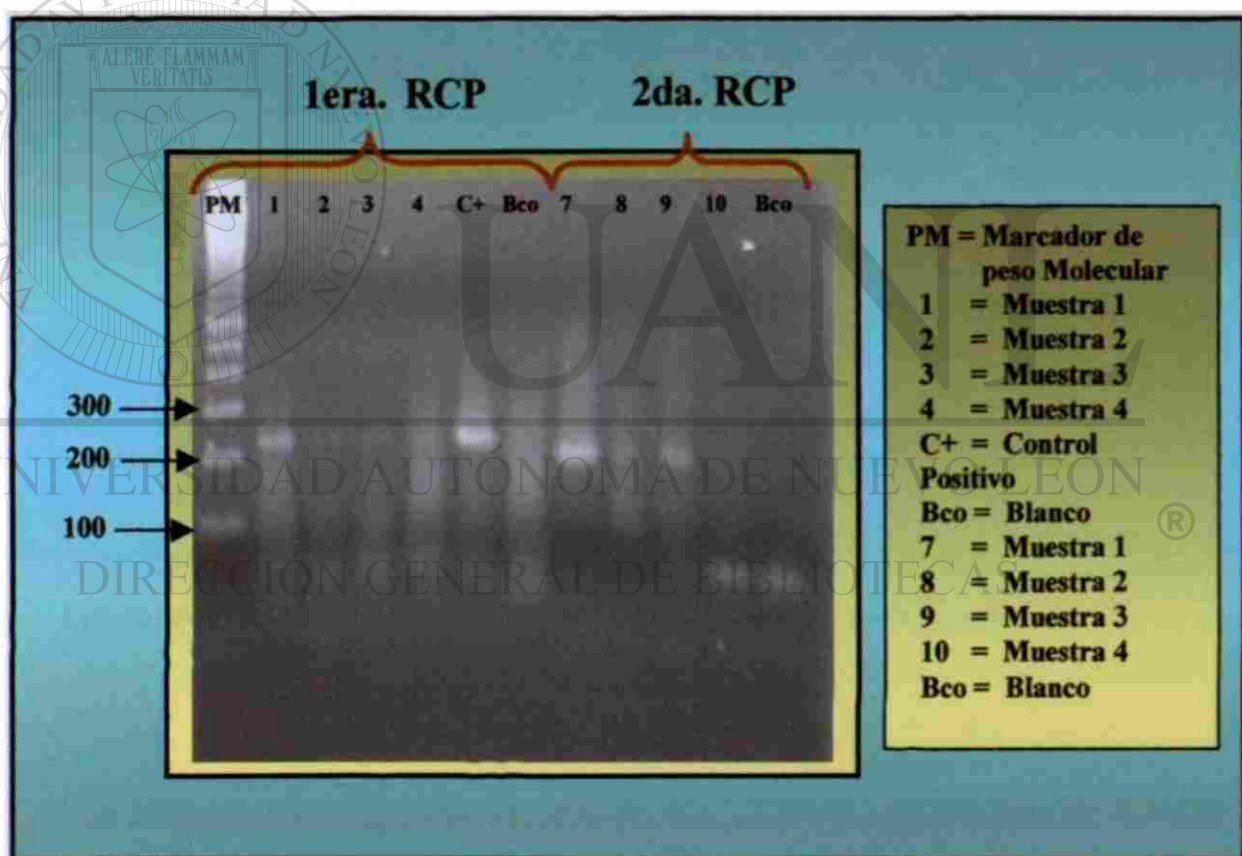


Figura 23. Electroforesis de productos amplificados para la identificación cualitativa de VHC. Como se puede apreciar en el área de los productos amplificados de la 1 RCP las muestras 1, 2 y 3 presentan bandas que corresponden a segmentos de 221 pb, lo que indica la presencia del VHC. En el área que corresponde a los productos de amplificación de la 2 RCP, puede observarse segmentos de 193 pb que corresponden a la presencia del VHC, estos segmentos están mejor definidos que los primeros, generando con ello mayor sensibilidad y especificidad en la identificación del VHC.

De los 62 sujetos VIH-1 + que participaron en el estudio, encontramos que ocho de ellos estaban infectados con el VHC. Establecimos la presencia del VHC tanto por la determinación de anticuerpos como mediante la detección cualitativa del ARN viral (Figura 24.).

Todos los sujetos coinfectados con VIH-1/VHC que fueron detectados en nuestro estudio fueron del sexo masculino. Este grupo presento una edad promedio de 36.4 años, con un rango de 23 a 55 años.

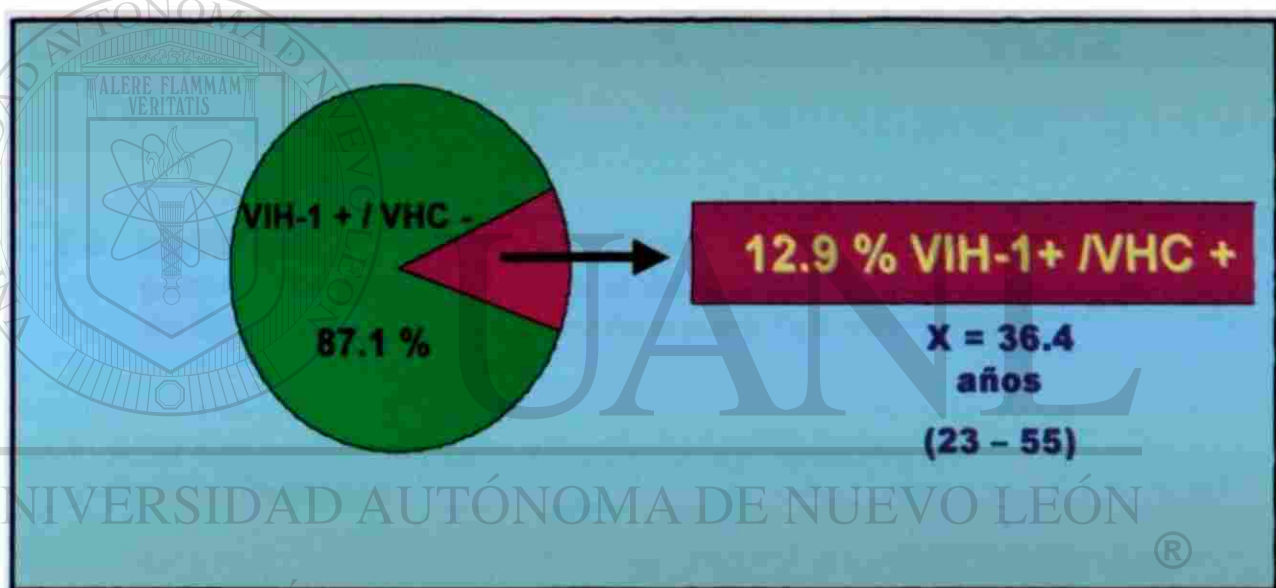


Figura 24. Distribución porcentual de pacientes con monoinfección por VIH-1 y pacientes coinfectados con VIH-1/VHC.

Los factores de riesgo que se presentaron más frecuentemente en nuestro grupo de sujetos coinfectados fueron: alta promiscuidad (75 %), alcoholismo (75 %), homosexualidad (62.5 %) y uso de drogas intravenosas (50 %). (Tabla XIII)

Tabla XIII Factores de riesgo de pacientes coinfectados VIH-1 + / VHC +.

PACIENTE COINFECTADO	FACTORES DE RIESGO					
	ORIENTACIÓN SEXUAL	PROMIS- CUIDAD	UDIV	TRANSF. SANGUINEA	INGEST. ALCOHOL	ACCID PUNZO CORT.
1	HOMOSEXUAL	SI	NO	NO	SI	NO
2	HETEROSEXUAL	SI	NO	NO	NO	NO
3	HOMOSEXUAL	S / D	NO	SI	NO	NO
4	HETEROSEXUAL	SI	SI	NO	SI	NO
5	HOMOSEXUAL	SI	SI	SI	SI	NO
6	HOMOSEXUAL	S / D	NO	NO	SI	NO
7	HOMOSEXUAL	SI	SI	NO	SI	NO
8	HETEROSEXUAL	SI	SI	NO	SI	NO
Total	HOMOSEXUAL 62.5 %	75 %	50 %	25 %	75 %	0 %

5.5 Identificación de los Polimorfismos de los Genes que Codifican para el Corredor CCR5 y la Apolipoproteína E en un Grupo de Sujetos Infectados y Coinfectados con VIH-1 y VHC

5.5.1 ADN Genómico Extraído a Partir de las Muestras de Sangre Periférica

A partir del paquete de leucocitos obtenido de las muestras de sangre periférica de los sujetos que integraron los diferentes grupos de estudio se extrajo el ADN genómico, el cual fue evaluado por espectrometría y por electroforesis. En la siguiente figura (Figura 25.) se muestra un gel de agarosa al 1 % con algunas de las muestras de ADN genómico que fueron extraídas de los pacientes VIH-1 +, en donde se puede apreciar que el ADN se encontraba en buenas condiciones para ser empleado en la ampliación de los genes que codifican para el corredor CCR5 y para la apolipoproteína E.

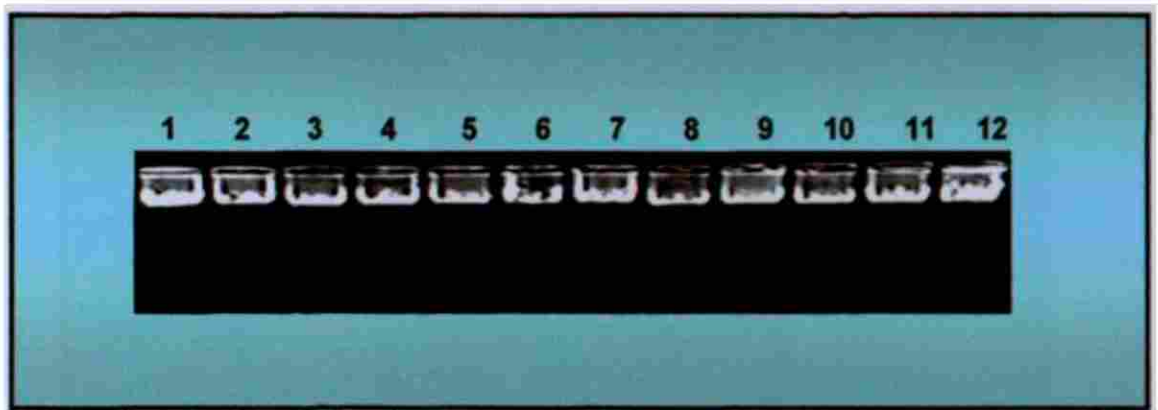


Figura 25. ENSAYO: Electroforesis de DNA de las muestras provenientes de pacientes VIH-1 positivos con códigos del 001 al 012, utilizando las diferentes fracciones obtenidas en el ensayo de extracción.

5.5.2 Genotipificación de los Polimorfismos de los Genes que Codifican para el Correoceptor CCR5.

Una vez que confirmamos que el ADN genómico que extraímos de las muestras de cada uno de las personas que integraron el grupo de sujetos VIH-1 - / VHC -, el grupo de pacientes VIH-1 +, el grupo de pacientes VIH-1 + / VHC + y el grupo de sujetos VHC +, era de buena calidad y pureza, se amplificó mediante el uso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP) el gen que codifica para el correoceptor CCR5, que en el caso de tratarse del gen nativo o wiper tape (WT) (CCR5/CCR5) se obtuvo un fragmento de 189 pb y, en el caso de presentarse la delección CCR5-Δ32 el tamaño del fragmento amplificado era de 157 pb (Figura 26.).

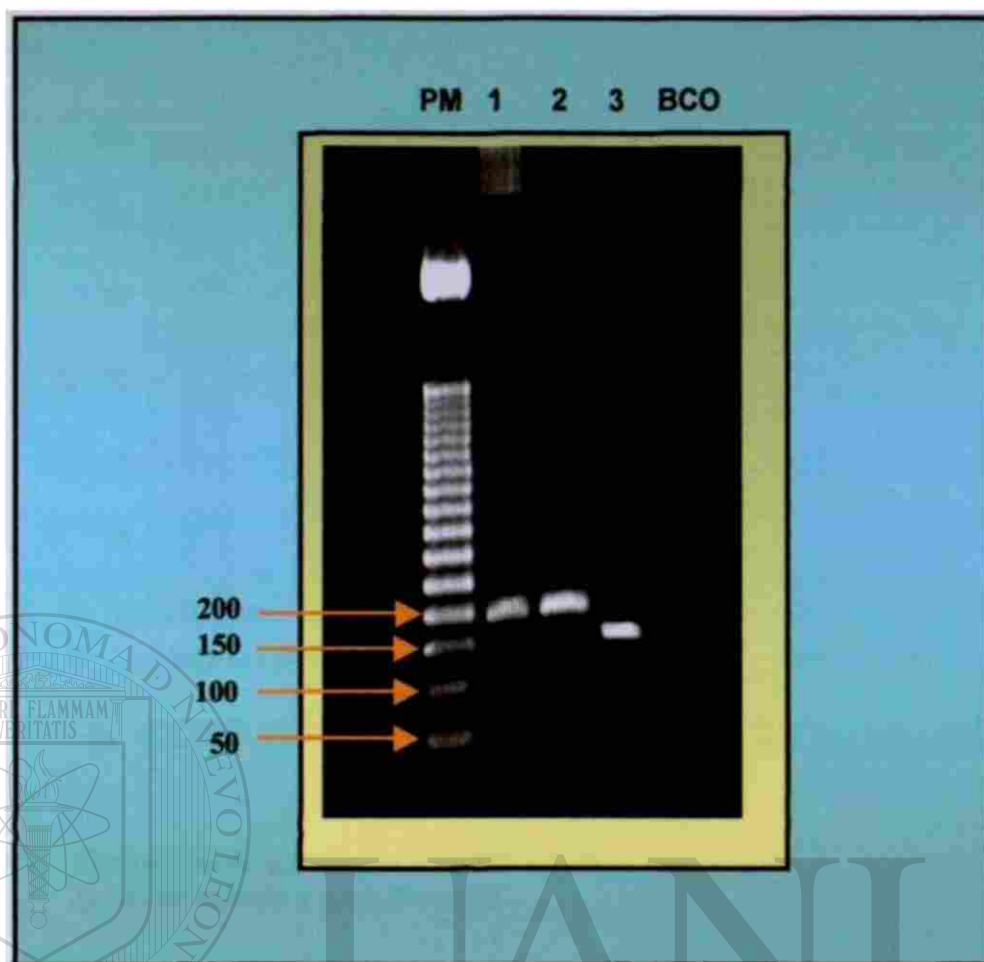


Figura 26. Electroforesis de productos de amplificación del gen que codifica para el coreceptor CCR5. En la figura: PM = Marcador de Peso molecular, 1 = Muestra 1, 2 = Muestra 2, 3 = Muestra 3, BCO = Blanco

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Los resultados que obtuvimos en la determinación de los genotipos de CCR5 en la población de estudio fueron los siguientes: el 100 % del grupo de sujetos que integraron el grupo de pacientes VIH-1 + y el 100 % de los integrantes del grupo de coinfectados VIH-1+/VHC + presentaron el genotipo CCR5 nativo; mientras que la delección CCR5- Δ 32 se encontró en el 3.2 % de los controles sanos y en el 23 % del grupo de sujetos con mono infección por VHC. (Figura 27.).

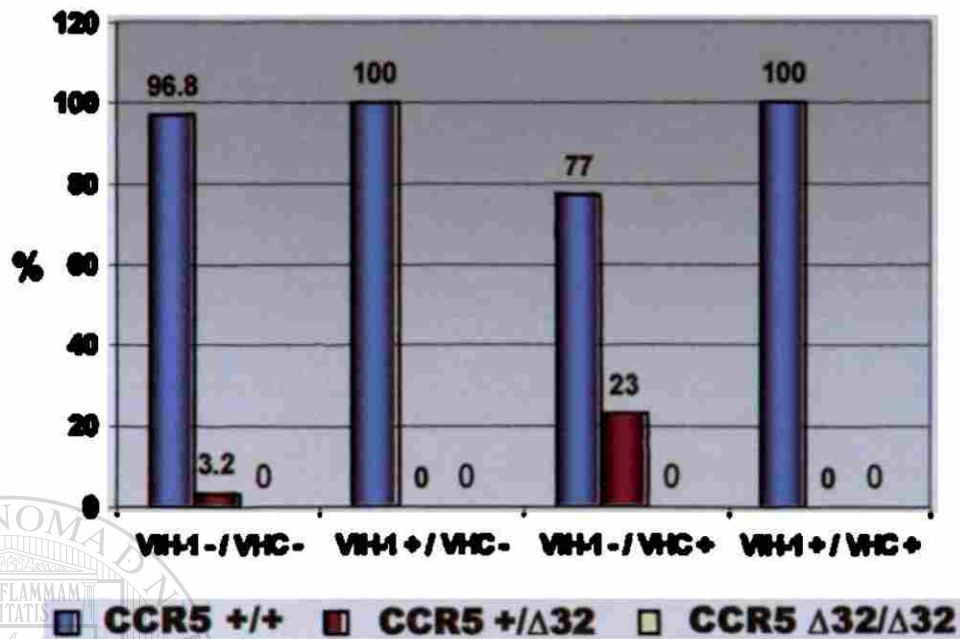


Figura 27. Frecuencia de genotipos de CCR5 en el grupo de estudio y grupos control.

5.5.3 Genotipificación de los Polimorfismos de los Genes que Codifican para la Apolipoproteína E

El ADN genómico de cada caso y de cada control se obtuvo a partir de leucocitos aislados de sangre periférica utilizando el procedimiento que previamente se ha indicado. Se evaluó la calidad y pureza de cada muestra de ADN genómico obtenido de los sujetos que integraron toda nuestra población en estudio, y posteriormente se amplificó el gen que codifica para la Apolipoproteína E mediante el empleo de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). De esta amplificación obtuvimos un producto amplificado de 227 pb (Figura 28.).

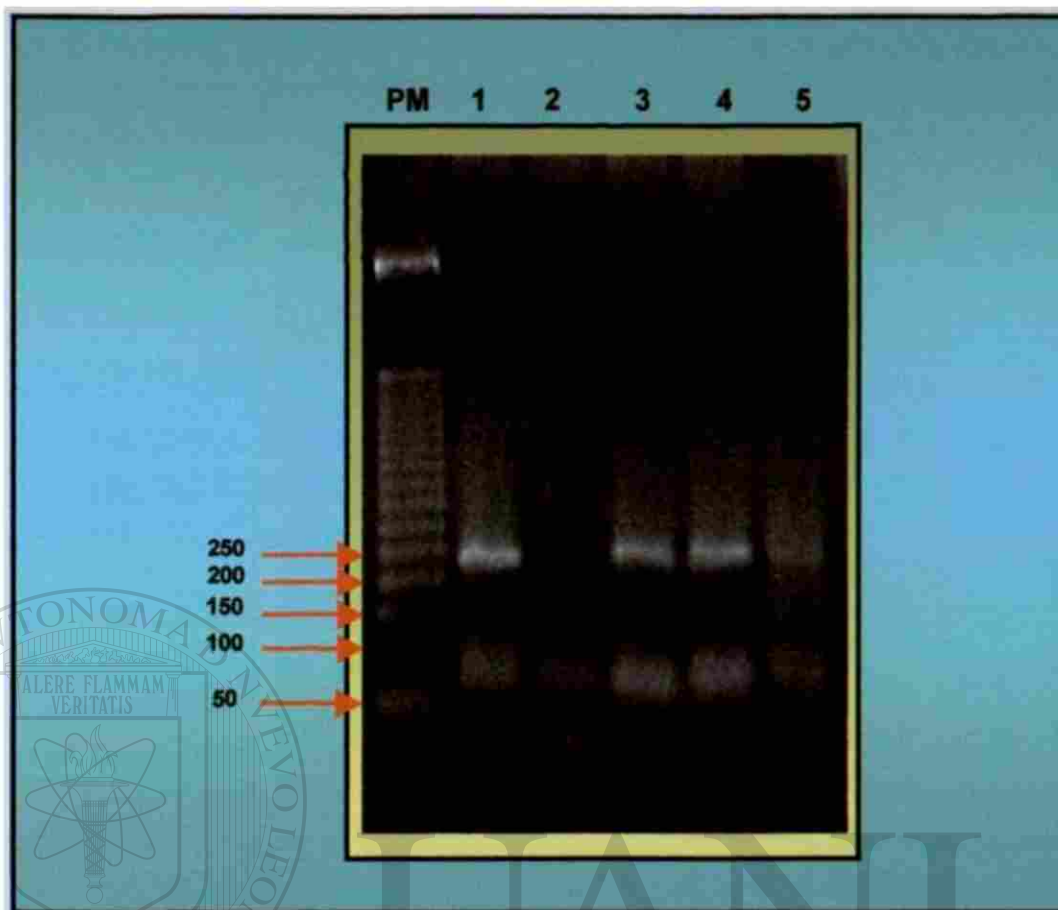


Figura 28. Electroforesis de productos de amplificación del gen que codifica para la Apolipoproteína E. En la figura: PM = Marcador de Peso Molecular, 1 = Muestra 1, 2 = Blanco, 3 = Muestra 2, 4 = Muestra 3, 5 = Muestra 4

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

5.5.3.1 Detección de los Polimorfismos del Gen que Codifica para la Apolipoproteína E

Los productos que obtuvimos de la amplificación del gen que codifica para la Apolipoproteína E, fueron digeridos durante 3 horas a 37 °C con la enzima de restricción *Hha I*. Posteriormente los productos de digestión se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 3 % con el fin de poder identificar cada uno de los polimorfismos que presenta este gen (Figura 29.).

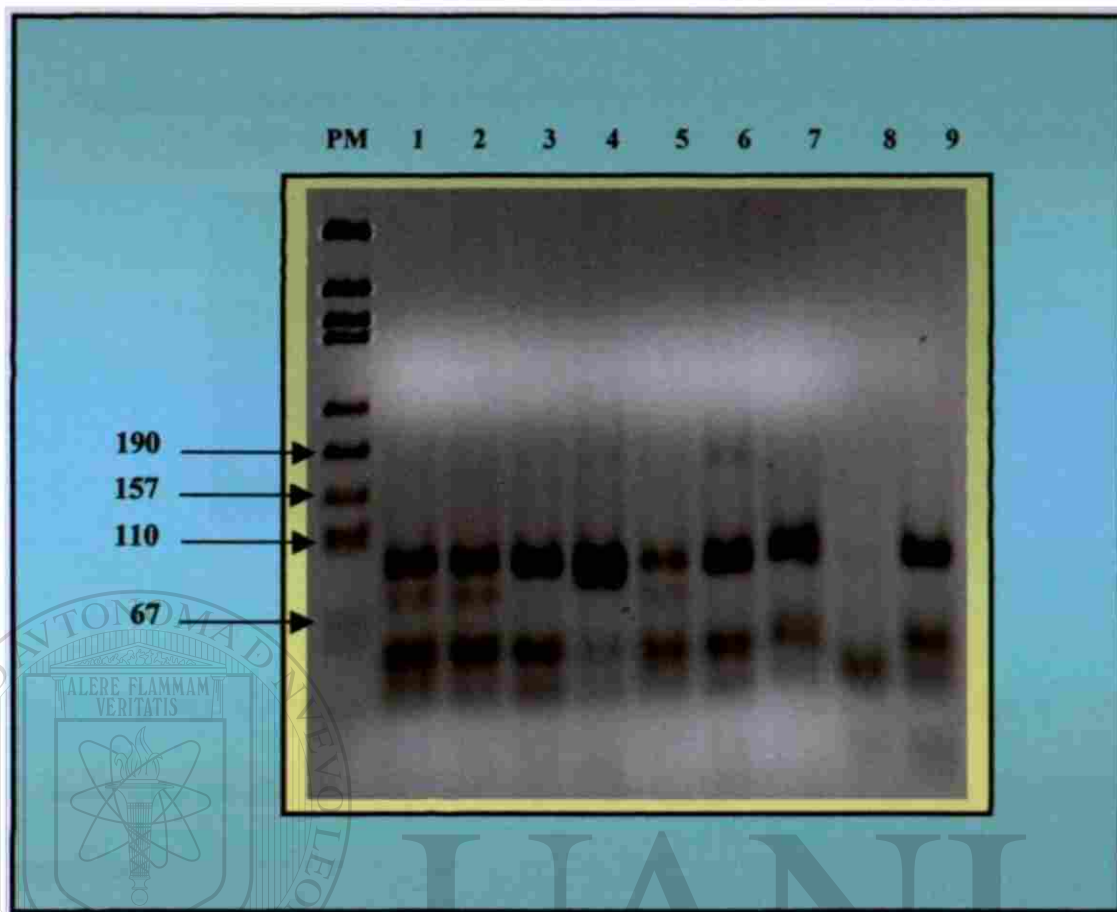


Figura 29. Electroforesis de la digestión de productos de amplificación del gen que codifica para la Apolipoproteína E. En la figura: PM = Marcador de Peso Molecular, 1 = Muestra 1, 2 = Muestra 2, 3 = Muestra 3, 4 = Muestra 4, 5 = Muestra 5, 6 = Muestra 6, 7 = Muestra 7, 8 = Muestra 8, 9 = Muestra 9

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

La digestión de los productos amplificados del gen que codifica para Apo E con la enzima de restricción *Hha I*, genera un patrón de bandas de diferentes tamaños, que integran el mapa de restricción de los tres principales alelos E2, E3 y E4 del gen que codifica para la Apolipoproteína E. Este mapa de restricción se muestra a continuación (Tabla XIV):

Tabla XIV Tamaño de los fragmentos de restricción con enzima *Hha I* esperados de la digestión del producto amplificado del gen de Apo E

ALELO	TAMAÑO DE LOS FRAGMENTOS ESPERADOS DE LA DIGESTIÓN CON <i>Hha I</i> (pb)
E2	16, 18, 21, 81, 91
E3	16, 18, 21, 33, 48, 91
E4	16, 18, 19, 21, 33, 48, 72

En las tablas XV y XVI se presentan las frecuencias, absolutas y relativas, para cada uno de los genotipos del gen de la Apo E en el grupo de casos y en los controles.

Como se puede observar en la tabla siguiente (Tabla XV) el alelo más frecuente encontrado en cada grupo que se integró para nuestro estudio es: el alelo E4 se encuentra en el 84 % de los sujetos que integran el grupo de estudio VIH-1 +/VHC -; el alelo E4 se encuentra en el 75 % de los pacientes coinfectados por VIH-1 +/VHC +; el alelo más frecuente en los sujetos con mono infección por VHC es el E3 (92.23 %); y el alelo más frecuente en el grupo de los sujetos que integran el grupo control sin ninguna infección es el E3 (87.09 %).

Tabla XV Frecuencia de genotipos del gen que codifica para la apolipoproteína E encontrada en los diferentes grupo de estudio.

GRUPO DE ESTUDIO	GENOTIPO DE APO E	POBLACIÓN QUE LO PRESENTA f (%)	DISTRIBUCIÓN DE ALELOS	POBLACIÓN QUE LO PRESENTA f (%)
VIH-1 +/ VHC - n = 62	E2 / E2	1 (2 %)	Homocigoto ϵ 2	1 (2 %)
	E2 / E3	4 (5 %)	Heterocigoto ϵ 2	20 (32 %)
	E2 / E4	16 (25 %)	Homocigoto ϵ 3	5 (8 %)
	E3 / E3	5 (9 %)	Heterocigoto ϵ 3	32 (51 %)
	E3 / E4	28 (48 %)	Homocigoto ϵ 4	8 (13 %)
	E4 / E4	8 (11 %)	Heterocigoto ϵ 4	44 (71 %)
VIH-1 +/ VHC + n = 8	E2 / E2	0 (0 %)	Homocigoto ϵ 2	0 (0 %)
	E2 / E3	1 (12.5 %)	Heterocigoto ϵ 2	3 (37.5 %)
	E2 / E4	2 (25 %)	Homocigoto ϵ 3	1 (12.5 %)
	E3 / E3	1 (12.5 %)	Heterocigoto ϵ 3	3 (37.5 %)
	E3 / E4	2 (25 %)	Homocigoto ϵ 4	2 (25 %)
	E4 / E4	2 (25 %)	Heterocigoto ϵ 4	4 (50 %)
VIH-1 -/ VHC + n = 13	E2 / E2	0 (0 %)	Homocigoto ϵ 2	0 (0 %)
	E2 / E3	0 (0 %)	Heterocigoto ϵ 2	1 (7.69 %)
	E2 / E4	1 (7.69 %)	Homocigoto ϵ 3	3 (23 %)
	E3 / E3	3 (23.07 %)	Heterocigoto ϵ 3	9 (69.23 %)
	E3 / E4	9 (69.23 %)	Homocigoto ϵ 4	0 (0 %)
	E4 / E4	0 (0 %)	Heterocigoto ϵ 4	10 (76.92 %)
VIH-1 -/ VHC - n = 62	E2 / E2	1 (1.61 %)	Homocigoto ϵ 2	1 (1.61 %)
	E2 / E3	7 (11.29 %)	Heterocigoto ϵ 2	13 (20.96 %)
	E2 / E4	6 (9.67 %)	Homocigoto ϵ 3	4 (6.45 %)
	E3 / E3	4 (6.45 %)	Heterocigoto ϵ 3	50 (80.64 %)
	E3 / E4	43 (69.35 %)	Homocigoto ϵ 4	1 (1.61 %)
	E4 / E4	1 (1.61 %)	Heterocigoto ϵ 4	49 (79.03 %)

En todos los grupos de estudio , el genotipo que presento mayor frecuencia es el E3/E4. En el grupo de casos (VIH-1 +/VHC -) el genotipo E2/E4 (25 %) marco la diferencia con respecto al grupo control; en el caso de los sujetos coinfectados, los genotipos E2/E4 (25 %) y E4/E4 (25 %) establecieron los

elementos característicos, mientras que en las personas con mono infección por VHC el genotipo E3/E3 señaló la diferencia de grupo.

Tabla XVI Frecuencia de genotipos del gen que codifica para la Apolipoproteína E en el grupo de estudio y grupos control.

GENOTIPO	Frecuencia (%)			
	VIH-1 -/VHC- n = 62	VIH-1 +/VHC- n = 62	VIH-1 -/VHC+ n = 13	VIH-1 +/VHC+ n = 8
E2 / E2	2	2	0	0
E2 / E3	11	5	0	12.5
E2 / E4	10	25	8	25
E3 / E3	6	9	23	12.5
E3 / E4	69	48	69	25
E4 / E4	2	11	0	25
Total	100	100	100	100

5.6 Correlación de los Hallazgos Moleculares con la Presencia de la Coinfección en Relación al Grupo de Sujetos Infeccionados Únicamente con VIH-1, al Grupo Infeccionado con VHC o con el Grupo de Sujetos que no están infectados con Ninguno de los dos Virus.

5.6.1 Asociación de CCR5 e Infección por VIH-1 y/o VHC

Todos los sujetos VIH-1 positivos presentaron el genotipo CCR5 +/+. Al realizar el análisis de asociación entre la infección por VIH-1 y los genotipos del correceptor CCR5, se estableció la susceptibilidad de el genotipo CCR5 +/+ a esta infección ($p < 0.05$); sin embargo no se pudo obtener una correlación con la resistencia a la infección.

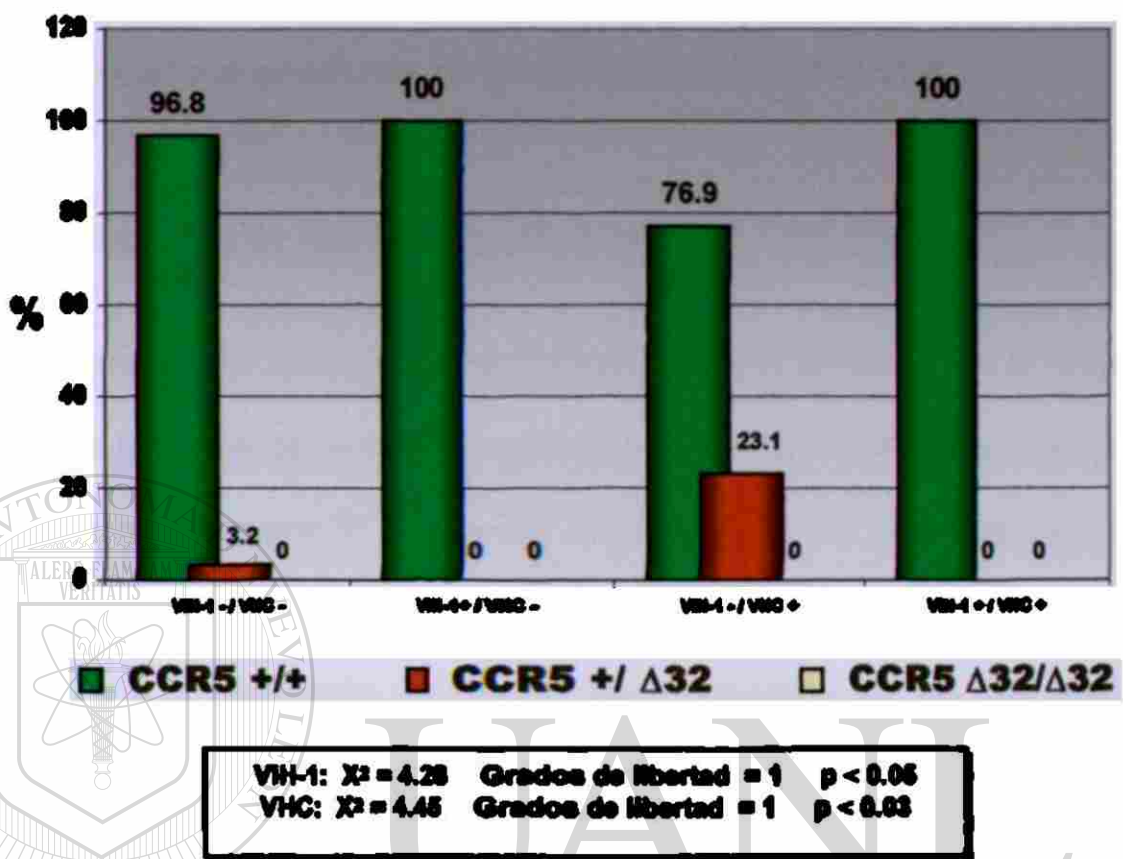


Figura 30. Asociación de los polimorfismos del gen del correceptor ccr5 con la presencia de infección por el VIH-1 y/o por VHC.

Todos los sujetos VIH-1 positivos presentaron el genotipo CCR5 +/+. Al realizar el análisis de asociación entre la infección por VIH-1 y los genotipos del correceptor CCR5, se estableció la susceptibilidad de el genotipo CCR5 +/+ a esta infección ($p < 0.05$); sin embargo no se pudo obtener una correlación con la resistencia a la infección.

Se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la mutación $\Delta 32$ de CCR5 y la infección por VHC ($p < 0.02$). En este caso, también como un elemento que da susceptibilidad a la infección, y no se logró establecer una

asociación entre alguno de los genotipos de CCR5 y la resistencia a la infección por VHC.

No se encontró ninguna asociación entre el marcador molecular CCR5 y la susceptibilidad a la adquisición de la coinfección por VIH-1/VHC.

5.6.2 Asociación de Apo E e infección por VIH-1 y/o VHC

Para estimar la asociación entre los genotipos de la Apo E y el riesgo de adquirir la infección por VIH-1 se calculó la *odds ratio* (OR) de exposición de los casos en comparación con la de exposición de los controles para cada genotipo. En la tabla XVII se observa que los portadores del genotipo E4/E4 (OR cruda = 6.05) presentan un mayor riesgo, seguidos por los que tienen el genotipo E2/E4 (OR cruda = 3), de adquirir la infección por VIH-1 que el que tienen los sujetos portadores de los otros genotipos.

Tabla XVII Frecuencia de genotipos del gen que codifica para la Apolipoproteína E en el grupo de VIH-1+ y el grupo control.

GENOTIPO	Frecuencia (%)		OR	IC	P
	VIH-1 + Casos	VIH-1 - Controles			
E2 / E2	1 (2 %)	1 (2 %)	----	----	----
E2 / E3	4 (5 %)	7 (11 %)	----	----	----
E2 / E4	16 (25 %)	6 (10 %)	3	95 %	< 0.01
E3 / E3	5 (9 %)	4 (6 %)	----	----	----
E3 / E4	28 (48 %)	43 (69 %)	0.41	95 %	< 0.01
E4 / E4	8 (11 %)	1 (2 %)	6.05	95 %	< 0.05
n	62	62			

En el caso de la relación de los genotipos de Apo E con la adquisición de la infección por VHC, el genotipo que manifestó una mayor asociación fue el

E2/E4 (OR $_{cruda}$ = 3.38), estableciendo que existe una probabilidad tres veces mayor de adquirir la infección por VHC cuando se tiene este genotipo, que si se tiene cualquier otro genotipo de Apo E. (Tabla XVIII)

Tabla XVIII Frecuencia de genotipos del gen que codifica para la Apolipoproteína E en el grupo de estudio VHC + y el grupo control

GENOTIPO	Frecuencia (%)		OR	IC	p
	VHC + Casos	VHC - Controles			
E2 / E2	0	0	----	----	----
E2 / E3	4.7	9.5	----	----	----
E2 / E4	14.3	4.7	3.38	95 %	< 0.04
E3 / E3	19	9.5	----	----	----
E3 / E4	52.5	76.3	0.34	95 %	< 0.01
E4 / E4	9.5	0	----	----	----
n	21	21			

Los genotipos de Apo E no presetaron una asociación con la adquisición de la coinfección por VIH-1/VHC. (Tabla XIX)

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Tabla XIX Frecuencia de genotipos del gen que codifica para la Apolipoproteína E en el grupo de sujetos VIH-1 + / VHC + y el grupo control

GENOTIPO	Frecuencia (%)		OR	IC	p
	VIH-1 + / VHC + Casos	VIH-1 - / VHC - Controles			
E2 / E2	0	0	----	----	----
E2 / E3	12.5	12.5	----	----	----
E2 / E4	25	0	----	----	----
E3 / E3	12.5	25	0.42	95 %	< 0.05
E3 / E4	25	62.5	0.33	95 %	< 0.01
E4 / E4	25	0	----	----	----
n	8	8			

5.7 Correlación Estadística entre las Variables Dependientes e Independientes en el Contexto de los Diferentes Grupos de Sujetos.

Aunque no nos fue posible establecer una correlación estadística entre los factores de riesgo y la presencia de infección por VIH-1, por VHC o en sujetos coinfectados por VIH-1/VHC, se puede señalar que solo un 2 % de los sujetos VIH-1 + refiere haber sufrido accidentes punzo cortantes; el 18 % ha recibido

Tabla XX Factores de riesgo encontrados en el grupo de pacientes VIH-1 positivos.

FACTOR DE RIESGO	CARACTERÍSTICA	SUJETOS VIH-1 + / VHC - f (%)	SUJETOS VIH-1+ / VHC + f (%)
SEXUAL	Número de parejas sexuales:	n = 41	n = 6
	0 - 1 2 - 4 5 - 6 > 6	6 (15 %) 14 (34 %) 1 (2 %) 20 (49 %)	0 (0 %) 3 (50 %) 0 (0 %) 3 (50 %)
ACCIDENTES PUNZO CORTANTES	Orientación sexual:	n = 55	n = 8
	Homosexual	23 (42 %)	5 (62.5 %)
	Heterosexual	27 (49 %)	3 (37.5 %)
	Bisexual	5 (9 %)	0 (0 %)
USO DE DROGAS INTRA VENOSAS	Si	n = 56	n = 8
	No	1 (2 %) 55 (98 %)	0 (0 %) 8 (100 %)
TRANSFUSIÓN SANGUÍNEA	Si	n = 57	n = 8
	No	5 (9 %) 52 (91 %)	4 (50 %) 4 (50 %)
INGESTA DE ALCOHOL	Si	n = 57	n = 8
	No	10 (18 %) 47 (82 %)	2 (25 %) 6 (75 %)
	Negada	n = 55	n = 7
	Ocasional Moderada Intensa	12 (22 %) 6 (10 %) 35 (64 %) 2 (4 %)	1 (14.3 %) 0 (0 %) 5 (71.4 %) 1 (14.3 %)

terapia transfusional y el 68 % manifiesta una ingesta de alcohol de moderada a intensa en el pasado; y que en el grupo de sujetos coinfectados los factores de riesgo más frecuentes, como se señaló previamente, son: la alta promiscuidad, el alcoholismo, la homosexualidad y el uso de drogas intravenosas. (Tabla XX)

La homosexualidad y la promiscuidad fueron los factores de riesgo que presentaron una ODDS mayor en el grupo de sujetos VIH-1 +, por lo que proporcionalmente son los elementos que con más probabilidad puedan participar en la adquisición de la infección por este agente viral en nuestra población en estudio. (Tabla XXI)

Tabla XXI Características generales y factores de riesgo para la adquisición de infección por VIH-1

CARACTERÍSTICAS	VIH-1 +/VHC - CASOS n = 62	VIH-1 -/VHC - CONTROLES n = 62	ODDS	p
Edad	34 ± 9.2	32 ± 8.9		
Rango	(18 - 55)	(18 - 55)		
Sexo (m/f)	57 / 5	57 / 5		
Homosexualidad	27 (43.5 %)	0 (0 %)	0.7544	< 0.01
Promiscuidad	35 (56.4 %)	0 (0 %)	0.5385	< 0.01
Uso de drogas IV	5 (8.0 %)	0 (0 %)		
Transfusión sanguínea	10 (16.1 %)	0 (0 %)	0.1905	< 0.01

En el caso del grupo de coinfectados VIH-1 +/VHC +, el factor que presentó un valor de ODDS más elevado fue la homosexualidad (ODDS 1.63). El uso de drogas IV presentó una ODDS de 1 y la transfusión sanguínea de 0.33 . (Tabla XXII)

Tabla XXII Características generales y factores de riesgo para la adquisición de infección por VIH-1 en pacientes coinfectados VIH-1 + / VHC +.

CARACTERÍSTICAS	VIH-1 +/VHC + CASOS n = 8	VIH-1 -/VHC - CONTROLES n = 8	ODDS	p
Edad	36.4 ± 11.7	35.3 ± 12.6		
Rango	(23 – 55)	(21 – 55)		
Sexo (m/f)	8 / 0	8 / 0		
Homosexualidad	5 (62.5 %)	0 (0 %)	1.63	< 0.01
Promiscuidad	8 (100 %)	0 (0 %)		
Uso de drogas IV	4 (50 %)	0 (0 %)	1	< 0.01
Transfusión sanguínea	2 (25 %)	0 (0 %)	0.33	< 0.01
Accidentes punzo cortantes	0 (0 %)	0 (0 %)		

5.8 Análisis de Hardy-Weinberg

Al realizar el análisis de equilibrio de Hardy-Weinberg al grupo control, se encontró que la población era homogénea debido a que el valor de p no fue significativo, siendo de 0.1048.

CAPITULO VI

CONCLUSIONES

- 1. En los sujetos VIH-1 positivo que conformaron nuestro grupo de estudio se encontró una relación de género M:F de 11:1.**
- 2. La frecuencia de la coinfección con el VHC presente en los sujetos VIH-1 positivos fue del 12.9 %.**
- 3. Respecto a los factores de riesgo no se encontró una asociación con la adquisición de la infección por el VIH-1.**
- 4. Tampoco se encontró una asociación entre los factores de riesgo con la adquisición de la infección por el VHC.**
- 5. La homosexualidad fue el único factor de riesgo que presentó asociación con la coinfección por VIH-1/VHC.**
- 6. Todos los sujetos VIH-1+ presentaron el genotipo homocigoto CCR5 +/- ($p < 0.05$), que confiere una susceptibilidad para la infección por VIH-1.**

12. El alelo E4 se encuentra en el 62.5 % de los sujetos coinfectados VIH-1 + / VHC +.

13. En el grupo de sujetos coinfectados, los factores de riesgo que presentaron asociación relativa con la presencia de la infección por VIH-1/VHC fueron la homosexualidad y la ingesta de alcohol, en cuya asociación se obtiene una ODDS de 1.6 y 3, respectivamente,

14. Factores genéticos del hospedero determinan en gran parte, la patogénesis de la infección por estos virus, particularmente los polimorfismos en los ligandos y correceptores.

15. Es importante considerar la contribución genética al desarrollo de la infección por VIH-1 y/o VHC desde la perspectiva de la epidemiología molecular. No se trata simplemente de la identificación de un factor de riesgo genético no modificable, sino que cada día es más evidente la interacción entre los factores genéticos y ambientales como determinantes del fenotipo final.

CAPITULO VII

DISCUSIÓN

Nuestros resultados muestran que en la población de estudio VIH-1 positivo hay una frecuencia del 12.9 % de coinfección por el VHC. Esta frecuencia es menor que la reportada en otros países como E.U., en donde la frecuencia es del 35 %.⁷⁵

Es posible que esta diferencia en las frecuencias sea una consecuencia de la variación de los factores de riesgo que se presentan entre estas dos poblaciones. Además, cabe señalar que esta coinfección puede llegar a ser una de las principales enfermedades oportunistas que se observan en los sujetos infectados con VIH-1 que asisten a nuestro centro hospitalario.

Todos los sujetos coinfectados con los dos virus fueron del sexo masculino.

Se encontró en los sujetos VIH-1 positivo un índice de género M:F de 11:1, el cual es mayor que el reportado para el estado de Nuevo Leon, pero sigue siendo un reflejo, probablemente, de la diferencia en la frecuencia de la transmisión de la infección por el tipo de vía sexual prevalente en la región, aunque si bien es cierto, no se encontró una relación estadísticamente significativa entre los factores de riesgo con la adquisición de la infección por el VIH-1.

A pesar de que, como ya se menciono previamente, no nos fue posible establecer la correlación estadística entre los factores de riesgo y la infección por VIH-1, por VHC o por ambos, estimamos la fuerza de la relación que hay entre los diferentes factores de riesgo y la infección por VIH-1 o bien por la presencia de la coinfección por VIH-1 / VHC.

Los resultados de estas estimaciones mostraron que en la adquisición de la infección por VIH-1, la homosexualidad (ODDS = 0.7544), la promiscuidad (ODDS = 0.5385) y la transfusión sanguínea (ODDS = 0.1905), son factores con un riesgo relativo bajo.

Con respecto al uso de drogas intravenosas, no se estableció relación alguna con la adquisición de infección por VIH-1, posiblemente por la baja frecuencia con la que este tipo de adicción a drogas se presenta en nuestra población en estudio.

Por otra parte, el 40 % de esta población refirió haber padecido otra enfermedad de transmisión sexual.

Con respecto a los pacientes coinfectados por VIH-1/VHC, pudimos establecer que la homosexualidad (ODDS = 1.63) y la ingesta de alcohol (ODDS = 3) son factores que predispone 1.6 y 3 veces más, respectivamente, a la adquisición de la coinfección por VIH-1/VHC que los otros factores de riesgo

que fueron considerados (promiscuidad, uso de drogas intravenosas, transfusión sanguínea y accidentes punzo cortantes).

Así mismo, es importante resaltar que hay una ausencia de asociación entre la coinfección por VIH-1/VHC y el uso de drogas intravenosas (ODDS = 1). Esto es importante pues establece una diferencia significativa entre los factores de riesgo que existen en nuestra población y los que prevalen en otros grupos de estudio, en donde el uso de drogas intravenosas es el elemento que presenta un mayor riesgo.

El riesgo para la adquisición de esta coinfección a través de una transfusión sanguínea es 3 veces menor a la de cualquiera de los otros factores de riesgo considerados, esto último probablemente debido a la aplicación intensiva de medidas de control y evaluación de los productos sanguíneos utilizados para dicha terapia transfusional.

En nuestro grupo de pacientes VIH-1+ se presentó, como ya se mencionó previamente, una relación de género masculino:femenino de 11:1. El 75% de las personas que integraron este grupo tenían una edad menor a 40 años, el 86% habían alcanzado como mínimo estudios de secundaria, el 68% eran solteros y el 73% se encontraban desempleados.

En relación a los parámetros bioquímicos no se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre los valores de alaninaminotransferasa

(ALT), aspartatoaminotransferasa (AST), gamaglutamintranspeptidasa (TGG), fosfatasa alcalina y bilirrubinas que presentan los casos con respecto a los valores que presentan los controles. Lo cual puede tener varias implicaciones, entre ellas que aún no hay daño hepático en la mayoría del grupo de pacientes VIH-1 + y coinfectados VIH-1/VHC, el cual podría deberse al uso de tratamiento antirretroviral o al daño causado por el virus de la Hepatitis C.

Todos los sujetos VIH-1 positivos presentaron el genotipo CCR5 +/+ ($p < 0.05$), que de acuerdo a la literatura, confiere una susceptibilidad para la infección por VIH-1. Así entonces, aunque no encontramos una asociación estadísticamente significativa con la resistencia a la infección por VIH-1, si se estableció la susceptibilidad de el genotipo CCR5 +/+ a esta infección, dado que todos los sujetos que la presentan poseen el genotipo wiper tape.

En la población caucásica se ha reportado una frecuencia entre 8-10 % para el alelo $\Delta 32$, no habiendo reportes en poblaciones asiáticas o africanas, mientras que en latinoamérica ha sido poco estudiada.⁷¹ En este estudio se encontró una frecuencia del genotipo CCR5 +/ $\Delta 32$ de 0% en sujetos VIH-1+, 23% en VHC+ y en controles sanos fue del 3.2%.

La ausencia en la frecuencia (0%) del genotipo homocigoto mutado ($\Delta 32/\Delta 32$) en los sujetos VIH-1 + que participaron en este estudio sugiere la

presencia de otros mecanismos de resistencia a la infección por VIH-1 en nuestra población.

Se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la mutación $\Delta 32$ de CCR5 y la infección por VHC ($p < 0.02$). En este caso, también como un elemento que da susceptibilidad a la infección, y no se logró establecer una asociación entre alguno de los genotipos de CCR5 y la resistencia a la infección por VHC.

No se pudo establecer el Riesgo Relativo (RR) de adquirir la coinfección por VIH-1/VHC en base a presentar el genotipo CCR5 +/+ o el CCR5 +/ $\Delta 32$. Esto se debió a que posiblemente se deba emplear un tamaño de muestra mucho mayor, dadas las frecuencias encontradas de los tres genotipos principales de CCR5 en la población de estudio.

Debemos reconocer que a pesar de que el análisis de equilibrio de Hardy-Weinberg mostró que la población en estudio era homogénea, se pudo haber tenido un sesgo en la formación del grupo control dado el entorno socio-cultural en el que se integró dicho grupo.

En relación a los polimorfismos de la apolipoproteína E, encontramos que el 38.7 % de las personas VIH-1 positivas presentaron el genotipo E2/E4 ó E4/E4. El alelo E4 se encuentra en el 75 % de los sujetos coinfectados VIH-1 +/VHC +.

También encontramos que en nuestra población en estudio el alelo E2 es el que tiene más baja prevalencia.

Así mismo, al evaluar las frecuencias de los alelos en los diferentes grupos de sujetos que conforman a nuestra población en estudio, se pudo observar que no hay una diferencia estadísticamente significativa entre las frecuencias de los diferentes alelos de Apo E entre los grupos de sujetos que se integraron para nuestro estudio, implicando con ello la existencia de una homogeneidad genética en la población general, en el sentido que las frecuencias de los alelos de Apo E fueron equivalentes entre los grupos, este evento apoya entonces la Homogeneidad Genética en la población general de nuestra región propuesta por el DR. Ricardo Cerda.

Se estableció una asociación estadísticamente significativa entre la presencia del VIH-1 y los genotipos E2/E4 y E4/E4 del gen que codifica para Apo E ($p < 0.01$).

La presencia del genotipo E2/E4 o del E4/E4 da un riesgo relativo de 3 y 6 veces mayor, respectivamente, de adquirir una infección por VIH-1 que los otros genotipos de Apo E. Mientras que el genotipo E3/E4 (ODDS = 0.041) se asocio con una disminución en el riesgo de contraer una infección por VIH-1.

Los genotipos E2/E4 y E4/E4 también mostraron una asociación que indica una mayor predisposición a adquirir infección por VHC en pacientes VIH-1

positivo, mientras que estos mismos polimorfismos se asocian a una menor frecuencia de adquirir infección por VHC en personas VIH-1 negativas ($p < 0.03$)

La presencia del genotipo E2/E4 da una probabilidad 3 veces mayor de adquirir la infección por VHC, mientras que el genotipo E3/E4 proporciona un riesgo menor de adquirirla, esto en personas sin infección por VIH-1 o por VHC.

Con respecto a la coinfección por VIH-1/VHC, los resultados del análisis de asociación mostraron que la presencia de los genotipos E3/E3 y E3/E4 disminuyen el riesgo relativo de la adquisición de la infección por VHC en 2 y 3 veces, respectivamente.

En el grupo de sujetos coinfectados, los factores de riesgo que presentaron asociación relativa con la presencia de la infección por VIH-1/VHC fueron la homosexualidad y la ingesta de alcohol, en cuya asociación se obtiene una ODDS de 1.6 y 3, respectivamente, implicando con ello que existe un mayor riesgo para adquirir la coinfección si se presentan estos factores. El uso de drogas intravenosas no presentó asociación con la presencia de la coinfección, mientras que en el uso de terapia transusional se presenta un riesgo disminuido para adquirir una coinfección por VIH-1/VHC, esto último probablemente debido a la aplicación intensiva de medidas de control y evaluación de los productos sanguíneos utilizados para dicha terapia.

CAPITULO VII

PERSPECTIVAS

Explorar los niveles de expresión de estos genes en los pacientes coinfectados y compararlos con la expresión en los sujetos mono infectados.

Evaluar la participación de cada uno de estos genes en la progresión de la enfermedad.

La comprensión de los mecanismos moleculares utilizados por estos virus y los genes del hospedero puede servir para idear nuevos procedimientos para retrasar la progresión de la enfermedad en las personas infectadas con el VIH-1.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

BIBLIOGRAFÍA

1. **AIDS epidemic update: 2004. ONUSIDA/OMS. Organización Mundial de la Salud. Consulta. Enero 2005. ISBN 92-8-173392-X: 1-38**
2. **Mandana Khalili, Brian W. Behm. Hepatitis C in the setting of HIV co-infection. Microbes and Infection. 2002 Oct; 4(12):1247-1251.Review**
3. **The Situation of the AIDS epidemic:2004. ONUSIDA/OMS. Organización Mundial de la Salud. UNAIDS. Agosto 2004. ISBN 92 9173 392: 1-35**
4. **Epidemiología del VIH/SIDA en México en el año 2003. Secretaría de Salud y Centro Nacional para la prevención y control del VIH/SIDA. Nov. 2003: 1-50**
5. **Weekly epidemiological record. World Health Organization. February 2000**
6. **Hepatitis C: Epidemiology Prevalence of HCV. National Center for Infectious Diseases. 2004: 1-45**
7. **Rosenberg S. Recent advances in the molecular biology of hepatitis C virus. J Mol Biol 2001;313(3): 451-64.**
8. **Laurence J. Coinfection with hepatitis viruses and HIV: good and bad news. AIDS Patient Care STDS 2001;15:599-602.**
9. **Maler IF, Wu GY. Hepatitis C and HIV co-infection: a review. World J Gastroenterol 2002;8:577-579.**
10. **Dewhurst, Steve. VIH-1: Biología molecular. Journal of Clinical Microbiology. 1998. Vol. 37 No. 7.**
11. **Fuente C, Santiago F, Deng L, et al. Gene expression profile of HIV-1 Tat expressing cells: a close interplay between proliferative and differentiation**

- signals. *BMC Biochem.* 2002;3 (1): 1-14
12. Wu Y. HIV-1 gene expression: lessons from provirus and non-integrated DNA. *Retrovirology* 2004;1: 1-13
 13. Gómez-Cordero I, Álvarez-García M. Biología y métodos diagnósticos del virus de la hepatitis C. *Rev Biomed.* 2003;14: 253-268
 14. Kato N. Molecular virology of hepatitis C virus. *Acta Med. Okayama.* 2001;55: 133-159
 15. Choo Q-L, Richman KH, Han JH et al. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89: 2451-2455
 16. Buck J, Purcell RH, Miller RH. Sequence analysis of the 5' noncoding region of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89: 4942-4946
 17. Pestova RV, Shatsky IN, Fletcher SP et al. A prokaryotic-like mode of cytoplasmic eukaryotic ribosome binding to the initiation codon during internal translation initiation of hepatitis C and classical swine fever virus RNAs. *Genes Dev* 1998;12: 67-83
 18. Sreevatsan S, Bookout JB, Ringpis FM et al. Algorithmic approach to high-throughput molecular screening for alpha interferon-resistant genotypes in hepatitis C patients. *J Clin Microbiol* 1998;36: 1895-1901
 19. Yamada N, Tanihara KJ, Takada A et al. Genetic organization and diversity of the 3' noncoding region of the hepatitis C virus genome. *Virology* 1998;2: 955-968
 20. Grakoui A, Wychowski C, Lin C et al. Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. *J Virol* 1993;67: 1385-1395

-
21. Zhu NL, Khoshanan A, Schneider R *et al.* Hepatitis C virus core protein binds to the cytoplasmic domain of tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 and enhances TNF-induced apoptosis. *J Virol* 1998;72: 3691-3697
22. Lin C, Lindenbach BD, Pragai BM *et al.* Processing in the hepatitis C virus E2-NS2 region: Identification of p7 and two distinct E2-specific products with different C termini. *J Virol* 1994;68: 5063-5073
23. Ralston R, Thudium K, Berger K *et al.* Characterization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia viruses. *J Virol* 1993;67: 6753-6761
24. Kato N, Ootsuyama Y, Tanaka T *et al.* Marked sequence diversity in the putative envelope proteins of hepatitis C viruses. *Virus Res* 1992;22: 107-123
25. Kato N, Ootsuyama Y, Sekiya H *et al.* Genetic drift in hypervariable region 1 of the viral genome in persistent hepatitis C virus infection. *J Virol* 1994;68: 4776-4784
-
26. Farci P, Shimoda A, Wong D *et al.* Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees by hyperimmune serum against the hypervariable region 1 of the envelope 2 protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93: 15394-15399
27. Santolini E, Pacini L, Fipaldini C *et al.* The NS2 protein of hepatitis C virus is a transmembrane polypeptide. *J Virol* 1995;69: 7461-7471
28. Gale MJJ, Korth MJ, Tang NM *et al.* Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein

- kinase by the non-structural 5A protein. *Virology* 1997;230: 217-227
29. Yamashita T, Kaneko S, Shirota Y *et al.* RNA-dependent RNA polymerase activity of the soluble recombinant hepatitis C virus NS5B protein truncated at the C-terminal region. *J Biol Chem* 1998;273: 15479-15486
30. Thursz M. Genetic susceptibility in infectious diseases. *Biotechnol Genet Eng Rev* 2000;17: 253-64.
31. McNicholl JM., Cuenco KT. Host genes and infectious diseases. HIV, other pathogens, and a public health perspective. *Am J Prev Med* 1999;16: 141-54.
32. McNicholl JM, Downer MV, Udhayakumar VF, *et al.* Host-pathogen interactions in emerging and re-emerging infectious diseases: a genomic perspective of tuberculosis, malaria, HIV infection, hepatitis B and cholera. *Annu Rev Public Health* 2000;21: 15-46.
33. Kaslow RA, McNicholl JM. Genetic determinants of HIV-1 infection and its manifestations. *Proc Assoc Am Physicians* 1999;111: 299-307.
34. Dragic T. An overview of the determinants of CCR5 and CXCR4 co-receptor function. *J Gen Virol* 2001;82: 1807-14.
35. Moore JP, Trkola AF, Dragic T. Co-receptors for HIV-1 entry. *Curr Opin Immunol* 1997;9: 551-62.
36. Trkola AF, Dragic TF, Arthos JF, *et al.* CD4-dependent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its co-receptor CCR-5. *Nature* 1996;384: 184-7.
37. Dragic TF, Litwin VF, Allaway GP, *et al.* HIV-1 entry into CD4+ cells is

-
- mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 1996;381:667-673.
38. Murphy PM. Chemokine receptors: structure, function and role in microbial pathogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 1996;7: 47-64.
39. Samson MF, Libert FF, Doranz BJ, *et al.* Resistance to HIV-1 infection in Caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* 1996;382: 722-5.
40. Rana S, Besson G, Cook D *et al.* Role of CCR5 in infection of primary macrophages and lymphocytes by macrophage-tropic strains of human immunodeficiency virus: resistance to patient-derived and prototype isolates resulting from the Δ ccr5 mutation. *J Virol.* 1997;71: 3219-3227
41. Agrawal L, Lu X, Qingwen J, *et al.* Role for CCR5 Delta32 protein in resistance to R5, R5X4, and X human immunodeficiency virus type 1 in primary CD4+ cells. *J Virol.* 2004; 78(5): 2277-87
-
42. Venkatesan SF, Petrovic AF, Van Ryk DIF, *et al.* Reduced cell surface expression of CCR5 in CCR5 Delta 32 heterozygotes is mediated by gene dosage, rather than by receptor sequestration. *J Bio Chem* 2002;277: 2287-301.
43. Samson MF, Soularue PF, Vassart GF, Parmentier M. The genes encoding the human CC-chemokine receptors CC-CKR1 to CC-CKR5 (CMKBR1-CMKBR5) are clustered in the p21.3-p24 region of chromosome 3. *Genomics* 1996;36: 522-6.
44. Samson MF, LaRosa GF, Libert FF, *et al.* The second extracellular loop of

CCR5 is the major determinant of ligand specificity. J Biol Chem 1997;272: 21934-21941.

- 45. Paxton WA, Martin SR, Tse D, et al. Relative resistance to HIV-1 infection of CD4 lymphocytes from persons who remain uninfected despite multiple high-risk sexual exposure. Nat Med. 1996;2(4): 412-417**
- 46. Kupfer B, Kaiser R, Brackmann HH, et al. Protection against parenteral HIV-1 infection by homozygous deletion in the C-C chemokine receptor 5 gene. AIDS.1999;13(9): 1025-1028**
- 47. Kuipers H, Workman C, Dyer W, et al. An HIV-1-infected individual homozygous for the CCR5 D32 allele and the SDF-1 3¢A allele. AIDS.1999;13(3): 433-434**
- 48. Huang Y, Paxton WA, Wolinsky SM, et al. The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disprogression. Nat Med. 1996;2(11): 1240-1243**

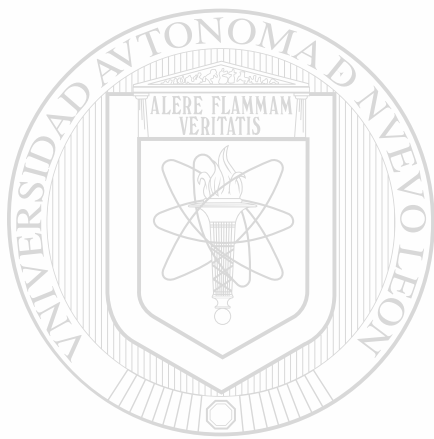
- 49. Balotta C, Bagnarelli P, Violin M, et al. Homozygous delta 32 deletion of the CCR-5 chemokine receptor in an HIV-1-infected patient. AIDS. 1997;11(10): F67-F71**
- 50. Wu L, Paxton WA, Kassam N, et al. CCR5 levels and expression pattern correlate with infectability by macrophage-tropic HIV-1, in vitro. J Exp Med. 1997;185: 1681-1692**
- 51. Ansari-Lari MA, Liu XM, Metzker ML, Rut AR, Gibbs RA. The extent of genetic variation in the CCR5 gene. Nat Genet 1997;16: 221-222.**
- 52. Martinson JJ, Hong LF, Karanickolas RF, Moore JP, Kostrikis LG. Global**

- distribution of the CCR2-64/CCR5-59653T HIV-1 disease-protective haplotype. *AIDS* 2000;14: 483-489.
53. Martinson JJ, Chapman NH, Rees DC, Liu YT, Clegg JB. Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion. *Nat Genet* 1997;15: 100-103.
54. Woitas RP, Ahlenstiel GF, Iwan AF, et al. Frequency of the HIV-protective CC chemokine receptor 5-Delta32/Delta32 genotype is increased in hepatitis C. *Gastroenterology* 2002;122: 1721-1728.
55. Flint M, Maidens C, Loomis-Price LD, et al. Characterization of hepatitis C virus E_s glycoprotein interaction with a putative cellular receptor, CD81. *J Virol* 1999;73: 6235-6244.
56. Hennig BJ, Hellier SF, Frodsham AJ, et al. Association of low-density lipoprotein receptor polymorphisms and outcome of hepatitis C infection. *Genes Immun* 2002;3: 359-367.
-
57. Germi RF, Crances JM, Grain DF, et al. Cellular glycosaminoglycans and low density lipoprotein receptor are involved in hepatitis C virus adsorption. *J Med Virol* 2002;68: 206-215.
58. Agnello V, Abel G, Elfahal M, Knight GB, Zhang QX. Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96: 12766-12771.
59. Laurence J. Potential roles for chemokine receptor CCR5 in the pathobiology of hepatitis C infection. *Gastroenterology* 2002;122: 2069-2072.

60. **Germi RF, Crance JM, Garin DF, Zarski JP, Drouet E. [Receptors for hepatitis C virus: update data]. Gastroenterol Clin Biol 2001;25: 1011-1015.**
61. **Shi SF, Polyak SJ, Tu HF, Taylor DR, et al. Hepatitis C virus NS5A colocalizes with the core protein on lipid droplets and interacts with apolipoproteins. Virology 2002; 292:198-210.**
62. **Shi SF, Lai MM. Hepatitis C viral RNA: challenges and promises. Cell Mol Life Sci. 2001;58: 1276-1295.**
63. **Wozniak MA, Itzhaki RF, Faragher EB, et al. Apolipoprotein E-epsilon 4 protects against severe liver disease caused by hepatitis C virus. Hepatology 2002;36:456-463.**
64. **Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. 1987;162: 156-159.**
-
65. **Rivas-Estilla AM, Sánchez LV, O Matsui, Campollo O, Armendariz-Borunda J, Segura J and A Panduro. Identification of Hepatitis C virus (HCV) genotypes in infected patients from the West of Mexico. Hepatology Research 1998;12: 121-130.**
66. **A Mummidi S, Ahuja SS, et al. The human CC chemokine receptor 5 (CCR5) gene. J Biol Chem. 1997;272(49): 30662-30671.**
67. **A Liu R, Zhao X, et al. Functional analysis of the proximal CCR5 promoter. AIDS Res Hum Retroviruses. 1998.;14(17): 1509-1519**
68. **Carrington M, Kissner T, et al. Novel alleles of the chemokine-receptor**

- gene CCR5. *Am J Hum Genet.* 1997;61: 1261-1267
69. Carrington M, Dean M, *et al.* Genetics of HIV-1 infection: chemokine receptor CCR5 polymorphism and its consequences. *Hum Mol Genet.* 1999;8: 1939-1945
70. Quillent C, Oberlin E, *et al.* HIV-1 resistance phenotype conferred by combination of two separate inherited mutations of CCR5 gene. *Lancet.* 1998;351: 14-18
71. Kostrikis L, Neumann A, *et al.* A polymorphism in the regulatory region of the CC-chemokine receptor 5 gene influences perinatal transmission of human immunodeficiency virus type 1 to African-American children. *J Virol.* 1999;73: 10264-10271
72. González E, Barnshad M, *et al.* Race-specific HIV-1 disease-modifying effects associated with CCR5 haplotypes. *PNAS.* 1999;96:12004-12009
73. Sambrook J, Russell D. *Molecular Cloning a Laboratory Manual.* 2002. Third Edition. Volume 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
74. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. *Short Protocols in Molecular Biology.* 2002. Fifth Edition. Volume 1. Editorial Board.
75. Management of Hepatitis C: 2002. NIH Consensus State Sci Statements. 2002 Jun 10-12;19(3): 1-46
76. Wenham PR, Price WH, Blandell G. Apolipoprotein E genotyping by one-stage PCR. *Lancet.* 1991 May 11;337(8750):1158-1159
77. Yamada M, Kakumu S, Yoshioka K, Higashi Y, Tanaka K, Ishikawa

**Takayanagi M. Hepatitis C virus genotypes are not responsible for
developm serious liver disease. Dif Dis Sci. 1994 Feb;39(2):234-239**



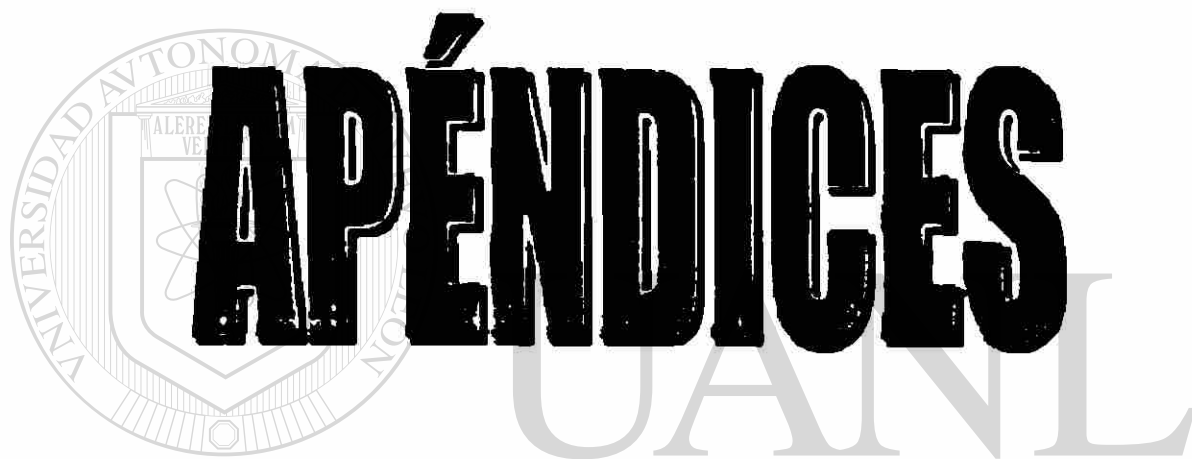
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

APÉNDICE A

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Las hepatitis virales son un problema de salud muy importante en todo el mundo. En nuestro medio no contamos con información de que tan extendida esta está enfermedad. Si consideramos que una persona que esta infectada, puede no saberlo por no presentar ninguna sintomatología, es importante hacer estudios en sangre, que nos pueda decir si una persona tiene o no este virus, lo que facilitaría un diagnóstico temprano y la posibilidad de referirla al médico adecuado para su tratamiento.

Procedimiento del estudio.

Durante la visita se le tomará la muestra de sangre del brazo para hacer en dicha muestra los estudios para el virus de la hepatitis C. No será necesaria la interrupción de los tratamientos que este recibiendo en ese momento.

Riesgos asociados al estudio.

Los riesgos de esta prueba son muy raros y no ponen en peligro la vida del paciente. El mayor riesgo podría ser algún moretón en el sitio en donde se extrae la sangre.

Beneficios que aportará el estudio al paciente.

Inmediatos.

1. Realización de pruebas diagnósticas para el virus de la hepatitis de manera gratuita.

Mediatos.

2. De acuerdo a los resultados, el médico tratante podrá elegir los medicamentos adecuados y así, el paciente tienen mayores posibilidades de mejorar.

En tiendo que estoy en mi derecho de solicitar cualquier aclaración y obtener información sobre la investigación que solicite en cualquier momento del desarrollo de la misma. Además, entiendo que estoy en libertad de retirarme en el momento que lo desee y si tomara esta decisión no me afectará en futuros tratamientos que requiera en el Hospital Universitario.

Entiendo que la información obtenida de la investigación será manejada en forma confidencial y que en ningún momento se violará mi privacidad.

Además el Hospital Universitario de la U.A.N.L. estará en disposición de brindarme tratamiento médico o quirúrgico sin costo, en caso de que resultara dañado directamente por cualquiera de los procedimientos del proyecto de investigación, y en caso de daño permanente, tendré derecho a ser indemnizado de acuerdo al daño sufrido.

Responsables de la Investigación:

Investigador principal:

Dra. Ana María Rivas Estilla, Investigadora de la Facultad de Medicina - U.A.N.L.

Investigadores asociados, Facultad de Medicina - U.A.N.L.

DR. Javier Ramos Jiménez

DR. Hugo Barrera Saldaña

Paciente

Nombre:

Dirección:

Testigo

Nombre:

Dirección:

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Testigo

Nombre:

Dirección:

Investigador

Fecha _____

APÉNDICE B

Preparación de Reactivos ^{73.74}

TBE

Tris base	108 g
Ácido Bórico	55 g
EDTA	7.4 g
H ₂ O destilada hasta aforar	1 litro

EDTA 0.5 M pH 8.0

EDTA	186.1 g
H ₂ O destilada hasta aforar	1 litro

Agarosa al 2 %

Agarosa	2 g
Buffer TBE 1X	100 ml

TE 100X (Tris-EDTA)

Tris-HCl pH 8.0 2 M	25 ml
EDTA pH 8.0 0.5 M	10 ml
H ₂ O destilada hasta aforar	50 ml

TSNT (Solución de Lisis Tritón-SDS)

Tritón 100X	
SDS 1 %	
NaCl 100 Mm	
Tris-HCl pH 8.0 10 mM	
EDTA pH 8.0 1 mM	

SEVAG (24:1)

Cloroformo	24 ml
Alcohol isoamílico	1 ml

APÉNDICE C

Electroforesis en geles de agarosa ^{73,74}

1. Pesar 2 g de agarosa para preparar 100 ml de agarosa al 2 %.
 2. Colocarla en un matraz Erlenmeyer de 250 ml y agregar 100ml de buffer TBE 1X (Anexo B).
 3. Calentar en horno de microondas por 1 min y dejar enfriar hasta aproximadamente 50 °C.
 4. Preparar el molde y colocar el peine adecuado.
 5. Vaciar la agarosa en el molde y dejar gelificar.
 6. Retirar el peine y posteriormente separar el gel del molde y colocarlo en la cámara de electroforesis, que debe contener buffer TBE 1X. El buffer debe cubrir completamente al gel.
 7. Colocar las muestras y el marcador de peso molecular adecuado en los pocillos, mezclados con jugo azul.
 8. Conectar correctamente los cables de la cámara a la fuente de poder. El ánodo (polo -) debe estar orientado del lado donde están los pocillos y escoger el voltaje adecuado.
-
9. Dejar correr hasta el nivel deseado y tefir con bromuro de etidio.
 10. Observar el gel mediante una lámpara de luz UV y documentarlo.

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

EDA GUADALUPE RAMÍREZ VALLES

**Candidato para el grado de
Maestro en Ciencias con Especialidad en
Biología Molecular e Ingeniería Genética**

Tesis:

**DETERMINACIÓN DE LA PREVALENCIA DE LA
INFECCIÓN CON EL VHC EN SUJETOS
INFECTADOS CON VIH-1 Y ANÁLISIS DE
POLIMORFISMOS DE MARCADORES
MOLECULARES ASOCIADOS
A LA COINFECCIÓN**

Campo de estudio: Biología Molecular

Biografía:

Datos personales: Nacida en la ciudad de Durango, Durango, el 15 de Febrero de 1960.

Educación:

LICENCIATURA:

**Químico Farmacéutico Biólogo
Facultad de Ciencias Químicas de la
Universidad Autónoma de Nuevo León, 1988.**

ESPECIALIDAD:

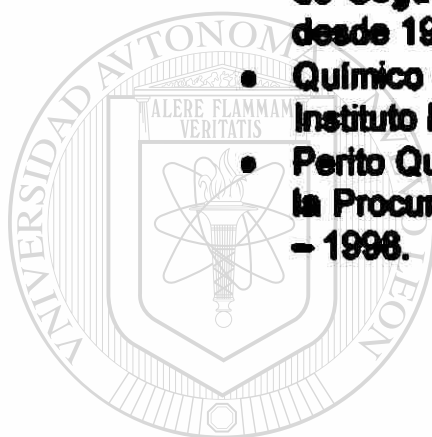
**Administración de Servicios de Salud.
Facultad de Contaduría y Administración de la
Universidad Juárez del Estado de Durango, 1993.**

DIPLOMADOS:

- **Hematología.**
Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Zacatecas, 1986.
- **Sangre y Componentes Seguros.**
Secretaría de Salud y Universidad Juárez del Estado de Durango, 2001

EXPERIENCIA PROFESIONAL:

- **Químico Clínico en el Laboratorio de Análisis Clínicos del Instituto de Seguridad Social al Servicio de los trabajadores del Estado, desde 1986 a la fecha.**
- **Químico Clínico Suplente en el Laboratorio de Análisis Clínicos del Instituto Mexicano del Seguro Social, 1982 – 1998.**
- **Perito Químico Forense de la Dirección de Servicios Periciales de la Procuraduría General de Justicia del Estado de Durango, 1993 – 1998.**



UANL

EXPERIENCIA DOCENTE:

- **Maestra de la Escuela de Ciencias Químicas de la Universidad Juárez del Estado de Durango desde 1988 a la fecha; impartiendo los cursos regulares de las materias de:**
 - ✓ **Química Orgánica III, hasta la fecha.**
 - ✓ **Fisiología y Bioquímica de Microorganismos, hasta la fecha.**
 - ✓ **Análisis Químico Clínico I, hasta la fecha.**

PUESTOS DESEMPEÑADOS:

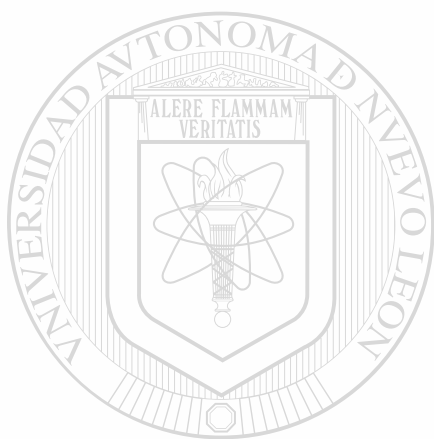
- **Representante Titular por la carrera de Químico Farmacéutico Biólogo ante el consejo Técnico Consultivo de la Escuela de Ciencias Químicas de la Universidad Juárez del Estado de Durango, 1998-2001.**

- ◆ **Coordinador de la Carrera de Químico Farmacéutico Biólogo de la Escuela de Ciencias Químicas de la Universidad Juárez del Estado de Durango, 1999 – 2000.**
- ◆ **Jefe Médico del Laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital General de Durango de la Secretaría de Salud, 1998.**
- ◆ **Presidente de la Academia de la Carrera de Químico Farmacéutico Biólogo de la Escuela de Ciencias Químicas de la U. J. E. D., 1996 - 1998.**
- ◆ **Representante del Consejo Médico del Instituto de Seguridad Social al Servicio de los trabajadores del Estado, Delegación Durango, 1993-1994.**
- ◆ **Jefe Médico del Laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital General "Dr. Santiago Ramón y Cajal" del Instituto de Seguridad Social al Servicio de los trabajadores del Estado, Delegación Durango, 1993-1995.**
- ◆ **Miembro del Comité de Admisión de la Escuela de Ciencias Químicas de la Universidad Juárez del Estado de Durango., 1993-1994.**
- ◆ **Jefe del Laboratorio Toxicología y Química Forense de la Dirección de Servicios Periciales de la Procuraduría General de Justicia del Estado de Durango, 1993 – 1998.**
- ◆ **Representante Titular por la carrera de Químico Farmacéutico Biólogo ante el consejo Técnico Consultivo de la Escuela de Ciencias Químicas de la Universidad Juárez del Estado de Durango, 1992-1994.**
- ◆ **Jefe General de Laboratorios de la Escuela de Ciencias Químicas de la Universidad Juárez del Estado de Durango, 1992.**
- ◆ **Encargada de la Dirección de la Escuela de Ciencias Químicas de la Universidad Juárez del Estado de Durango, 1990-1991.**

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

PARTICIPACIÓN EN PROYECTOS

- **Elaboración del Proyecto FOMES 2000 para la DES "Escuela de Ciencias Químicas – Instituto de Investigación Científica" de la Universidad Juárez del Estado de Durango.**



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



