



FACULTAD DE MATEMÁTICA, ASTRONOMÍA Y FÍSICA

TRABAJO ESPECIAL DE LA LICENCIATURA EN CIENCIAS DE LA
COMPUTACIÓN

Simulaciones avanzadas de los efectos de las drogas utilizadas en el tratamiento del SIDA

Autor:
Francisco Javier Herrero

Directores:
Pedro Pury
Daniel Gutson



Simulaciones avanzadas de los efectos de las drogas utilizadas en el tratamiento del SIDA.
Por Francisco Javier Herrero. Se distribuye bajo una Licencia Creative Commons
Atribución-CompartirIgual 2.5 Argentina
20 de Julio de 2013

Resumen

Uno de los principales obstáculos para la eliminación del VIH en un paciente es el reservorio de células con infección latente, debido a que los antirretrovirales no actúan en este. Se propone estudiar el tratamiento con antirretrovirales bajo la acción de la droga Vorinostat que promueve la replicación de los viriones, acelerando el proceso de infección y así permitiendo la manifestación del reservorio para convertirlo en blanco para la erradicación. Para esto se revisaron los modelos determinísticos basados en sistemas dinámicos continuos implementados anteriormente en ViSi y se implementaron tres modelos nuevos permitiendo finalmente simular tratamientos con un número arbitrario de cepas e incorporando la distinción entre replicación activa de viriones y estado de división celular de linfocitos por presencia de un antígeno. Para esto también hubo que realizar refactorizaciones en el desarrollo anterior e implementar plugins para generar escenarios de simulación de tratamientos. Finalmente se realizaron cuatro experimentos donde se logró finalmente representar el escenario de eliminación deseado.

Clasificación: I.6.3 Aplicaciones de Modelado y Simulación; J.3 Biología y Ciencias Médicas.

Palabras Clave: VIH, Simulación Viral, Antirretrovirales, Bioinformática.

Abstract

One of the main obstacles for VIH elimination on a patient is the cell reservoir with latent infection, because the antiretrovirals doesn't apply on this. We propose to study antiretrovirals treatment using Vorinostat drug, that promotes virion replication, accelerating the infection process and thus allowing reservoir manifestation to become an eradication blank. To achieve this we review the deterministic models based on continuous dynamic systems implemented before on ViSi and we implement three new models finally allowing to simulate treatments with an arbitrary number of strains and incorporating the distinction between active virions replication and lymphocytes cell division on antigen presence. Also for this had to be made refactorizations on previous development and implement plugins to generate treatment simulation scenarios. Finally four experiments where finally able to represent the desired eradication scenario.

Classification: I.6.3 Applications of Simulation and Modeling; J.3 Life and Medical Sciences.

Keywords: HIV, Viral Simulation, Antiretrovirals, Bioinformatics.

Agradecimientos

A mis padres, por su apoyo y ayuda incondicional.

A Daniel Gutson por su dirección en este trabajo y mentoría en C++.

Al Lic. Pedro Pury por su dirección y guía en la creación de este trabajo.

Al Dr. Roberto Daniel Rabinovich por tener la idea inicial de este proyecto, y cuyos aportes en momentos cruciales determinaron su éxito.

A Carlos Bederián, Pedro Pury y Gustavo Sibona por conformar el tribunal evaluador.

A la Dra. María Pilar Adamo por su colaboración en virología.

A los Colaboradores de Fu.De.P.A.N. que han estado siempre presentes durante el proceso.

Índice general

1. Introducción	8
1.1. Brevemente	8
1.2. Motivación	8
1.3. Estructura del Documento	9
I Marco Biológico del Problema	10
1.4. Virología	11
1.4.1. Clasificación	11
1.5. VIH	11
1.5.1. Estructura	12
1.5.2. Ciclo de replicación	12
1.5.3. Linfocitos T <i>Cluster of Differentiation 4</i> (CD4+)	14
1.5.4. Etapas de la Infección	14
1.6. Antirretrovirales	16
1.6.1. Inhibidores de Retrotranscriptasa (Inhibidores de RetroTranscriptasa (RTI))	16
1.6.2. Inhibidores de Proteasa (Inhibidores de Proteasa (PI))	16
1.6.3. Otros	16
1.6.4. Terapia combinada	17
II Formulación del Problema	18
2. Problema y propuesta	19
2.1. Problema	19
2.1.1. Resistencia Viral y Fallo Viroológico	19
2.1.2. Reservorios del VIH	19
2.1.3. Estrategias para eliminación de la infección	20
2.1.4. Vorinostat	20
2.2. Propuesta	20
3. Modelos matemáticos	21
3.1. Introducción	21
3.2. Modelo de Perelson, Kirschner y De Boer	21
3.2.1. Análisis Matemático del Modelo	22
3.2.2. Análisis numérico	24
3.3. Modelo de Kirschner-Webb Modificado	26
3.3.1. Inhibidores de Retrotranscipción	29
3.3.2. Inhibidores de Proteasa	29
3.3.3. Mutación de viriones	30
3.3.4. Consideraciones del modelo	30

3.4. Modelo de Kirschner-Webb Modificado con incorporación de Linfocitos latentes .	30
3.5. Modelo Matricial Multicepa	31
3.6. Modelo Perelson Extendido Matricial	33
III Implementación de Software	37
4. Refactorizaciones y mejoras	38
4.1. Vectorización de parámetros del modelo	38
4.1.1. Necesidad	38
4.1.2. Diseño previo	38
4.1.3. Refactorización propuesta	39
4.1.4. Implementación	39
4.2. Desacople de métodos numéricos	42
4.2.1. Necesidad	42
4.2.2. Diseño Previo	42
4.2.3. Refactorización Propuesta	43
4.2.4. Implementación	43
4.3. Herramientas para subvectores y submatrices	44
4.3.1. Necesidad	44
4.3.2. Refactorización propuesta	44
4.3.3. Implementación	45
4.4. Modificación de pasos de simulación dentro de una ejecución	46
4.4.1. Necesidad	46
4.4.2. Diseño Previo	46
4.4.3. Refactorización Propuesta	46
4.4.4. Implementación	47
4.5. Otros	47
4.5.1. Implementación de verbosity granular	47
4.5.2. Fix de CsvConfigFiler	48
5. Modelos y Plugins	49
5.1. Modelos	49
5.2. Plugins	49
5.2.1. SimplePlugin	49
5.2.2. CombinatoryTherapyPlugin	50
5.2.3. ErradicationTherapyPlugin	51
IV Resultados	53
6. Experimentos	54
6.1. Modelo Matricial Multicepa	54
6.1.1. Terapia Combinatoria	54
6.1.2. Eliminación de la infección con Vorinostat	55
6.2. Perelson Extendido Matricial	56
6.2.1. Sin tratamiento	56
6.2.2. Eliminación de la infección con Vorinostat	58
7. Conclusiones	60

8. Trabajo Futuro	61
8.1. Consideración de nuevos modelos	61
8.2. Mejoras de Software	62
8.2.1. Performance	62
8.2.2. Paralelización	62
8.2.3. Accesibilidad	62
Bibliografía	64
A. Acrónimos	67
B. Métricas	69
B.1. CCCC	69
B.2. CLOC	69
B.3. Cobertura de Código	70

Capítulo 1

Introducción

1.1. Brevemente

El objetivo de este proyecto es lograr desarrollar modelos capaces de simular la evolución de la infección por Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), basados en tratamientos con drogas antirretrovirales combinadas con una droga específica llamada Vorinostat. Para esto se extendió mediante plugins y refactorizaciones el simulador *Virus Simulator* (ViSi) [1] [2].

1.2. Motivación

Desde mediados de la década del 80, con el desarrollo de una terapia contra el VIH basada en el Azidotimidina (AZT), se han desarrollado diversos antivirales específicos contra diferentes funciones que participan en la replicación viral. Esta disponibilidad terapéutica ha permitido, si bien no la cura de la infección por VIH, sí una prolongación significativa y una mejora en la calidad de sobre-vida de los pacientes con esta infección. En la actualidad, el reservorio de células con infección latente es uno de los principales obstáculos para la eliminación del VIH en un individuo, dado que los antirretrovirales no actúan en ellos. Una variedad de enfoques diferentes han sido propuestos para reducir la generación de estos depósitos o bien purgarlos. Recientes estudios muestran que la droga Vorinostat tienen efectos tanto *in vitro* como *in vivo* reactivando la multiplicación viral en los linfocitos T Colaboradores (ver subsección 1.5.3) latentemente infectados por VIH, por lo que se está considerando la viabilidad de su uso en una terapia de eliminación del virus.

Uno de los enfoques que se propone estudiar es el tratamiento con antirretrovirales en combinación con esta droga, que promueve la replicación de los viriones, acelerando el proceso de infección y permitiendo la eliminación del virus en los reservorios de células latentemente infectadas ya sea por lisis de la célula a causa de la replicación o exponiendo antígenos en su superficie, exponiendo la célula a la actividad citotóxica. Dado que este tratamiento es altamente arriesgado para un paciente infectado, debido a que el Vorinostat incrementa considerablemente el estado de infección de este, es necesario analizar el impacto de esta droga mediante ensayos *in silice*, tanto para estudiar posibles tratamientos como para identificar factores necesarios para comprender el proceso infeccioso involucrado.

Con este objetivo, se analizó la relevancia de los modelos numéricos existentes, y la necesidad de incorporar nuevos modelos que involucren mas elementos representativos para la simulación de este tratamiento, así como el ajuste de parámetros en base a bibliografía existente. Finalmente se desarrollaron mejoras al simulador actual y plugins necesarios para realizar las simulaciones.

1.3. Estructura del Documento

En la Parte I (Marco Biológico del Problema) se da una breve introducción a conceptos de virología, se analiza el VIH en sus características relevantes para este simulador y se presentan los distintos tipos de antirretrovirales.

En la Parte II (Formulación del Problema), se presenta el campo donde se ubica el trabajo, una propuesta para el tratamiento del problema y el análisis de diversos trabajos que buscan modelar la infección por VIH.

En la Parte III (Implementación del Software) se muestran los pasos que condujeron a la obtención de la herramienta implementada. Para esto, primero se muestra las refactorizaciones, y luego los modelos y plugins implementados durante el proceso.

Finalmente, en la Parte IV (Resultados) mostramos los experimentos realizados, las conclusiones obtenidas a partir de los resultados de los experimentos y propuestas de mejoras para desarrollar en el futuro.

Parte I

Marco Biológico del Problema

Para comprender los conceptos básicos relacionados a biología general, se recomienda revisar la sección 2 del Trabajo Final de Grado de Pablo Oliva y Leandro Ramos [1].

1.4. Virología

En biología, un virus (del latín *virus*, toxina o veneno) es un agente infeccioso microscópico que sólo puede replicarse dentro de las células de otro organismo. El estudio de los virus recibe el nombre de virología, una rama de la microbiología. Los virus en general están compuestos por un material genético que porta la información hereditaria, que puede ser Ácido Desoxirribonucleico (ADN) o Ácido Ribonucleico (ARN), una cubierta proteica denominada cápside, y en algunos también se puede encontrar una doble capa lipídica (envoltura) que los rodea cuando están fuera de la célula.

1.4.1. Clasificación

Los virus están clasificados según taxonomía por el *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV), cuyo objetivo es clasificar los virus según diversos criterios como, tipo de ácido nucleico, estrategia de replicación, estructura de la cápside, presencia de envoltura y dimensiones. A partir de estos criterios se definen familias virales. Las clasificaciones de género están a cargo de subcomités. Una clasificación tradicional, que no es taxonómica pero que reporta utilidad práctica por estar basada en el mecanismo de producción del ARN Mensajero (ARNm), es la clasificación de Baltimore [3]. El genoma de los virus puede ser monocatenario (simple cadena) o bicatenario (doble cadena), de ARN o ADN, y pueden utilizar o no la transcriptasa inversa (retrotranscriptas). Además, los virus ARN monocatenarios pueden ser o positivos (+) o negativos (-). Así la clasificación caracteriza los grupos en números romanos:

- I **Virus ADN bicatenario:** Se replica usando una ADN polimerasa dependiente del ADN, no usando el ARN como intermediario durante la replicación.
- II **Virus ADN monocatenario:** Se replica de la misma forma que el grupo anterior, con la diferencia que forma una sola cadena de nucleótidos en vez de dos.
- III **Virus ARN bicatenario:** No depende de las polimerasas de la células huésped, pues incluyen estas enzimas en el virión.
- IV **Virus ARN monocatenario positivo:** Son idénticos al ARNm viral y por lo tanto pueden ser inmediatamente traducidos por la célula huésped.
- V **Virus ARN monocatenario negativo:** Es complementario del ARNm y por lo tanto debe convertirse en ARN positivo por una ARN polimerasa antes de la traducción.
- VI **Virus ARN monocatenario retrotranscrito:** Se replica en la célula huésped mediante transcripción inversa, es decir, mediante la formación de ADN a partir del molde ARN.
- VII **Virus ADN bicatenario retrotranscrito:** Se replica mediante un proceso en el que del ADN bicatenario se genera el ARNm, que es luego retrotranscrito de vuelta a ADN.

1.5. VIH

El VIH es virus del grupo VI de la clasificación de Baltimore, perteneciente al género *Lentivirus*, dentro de la familia *Retroviridae*, o comúnmente llamados retrovirus. Los Lentivirus son capaces de producir en las células infecciones latentes a largo plazo y efectos citopáticos a corto plazo, y producen enfermedades lentamente progresivas y mortales.

Se han identificado dos especies íntimamente relacionadas de VIH denominadas VIH-1 y VIH-2, que si bien tienen distintas características antigénicas y estructurales, causan un síndrome similar, siendo el VIH-1 la causa más frecuente del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA).

1.5.1. Estructura

En la figura 1.1 se muestra una partícula infecciosa de VIH-1. El virión consta de dos cadenas idénticas de ARN y las enzimas asociadas, que son la transcriptasa inversa, la integrasa y la proteasa, empaquetadas en un centro cónico compuesto de la proteína de la cápside p24 con una matriz circundante de proteína p17, todo ello rodeado de una envoltura de membrana fosfolipídica derivada de la célula huésped. Las proteínas de la membrana codificadas por el virus (gp41 y gp120) se encuentran unidas a la envoltura.

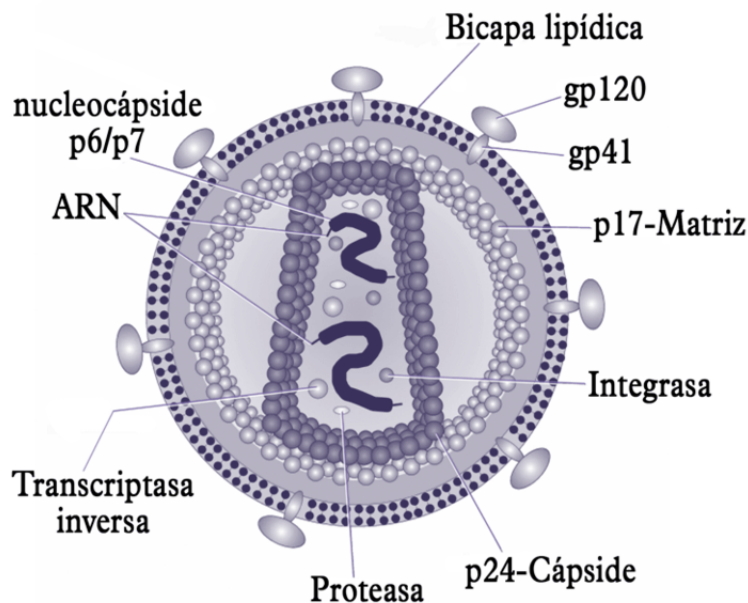


Figura 1.1: Estructura de un virión de VIH.¹

Así podemos identificar tres fases del proceso infeccioso:

1.5.2. Ciclo de replicación

El ciclo de replicación comprende varias etapas comunes a todos los retrovirus. En la figura 1.2 se puede observar el ciclo completo de replicación del VIH en un linfocito T CD4+, caracterizado por las siguientes etapas:

- Adsorción: El virus se une a receptores específicos de la célula gracias a la glicoproteína de superficie (CD4+).
- Fusión: Las membranas vírica y celular se fusionan y la cápside viral entra en la célula en un proceso que involucra tanto el CD4+ como el co-receptor (C-C quimiocina receptora de tipo 5 (CCR5) o C-X-C quimiocina receptora de tipo 4 (CXCR4)). El genoma viral entra en el citoplasma.

¹Dibujo original de Daniel Beyer, adaptado por Luis Fernández García (*GNU Free Document License* (GFDL)). Ver <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:VIH-virión.png>

²Dibujo original de Daniel Beyer, adaptado por Luis Fernández García (GFDL). Ver <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Ciclo-del-VIH.png>

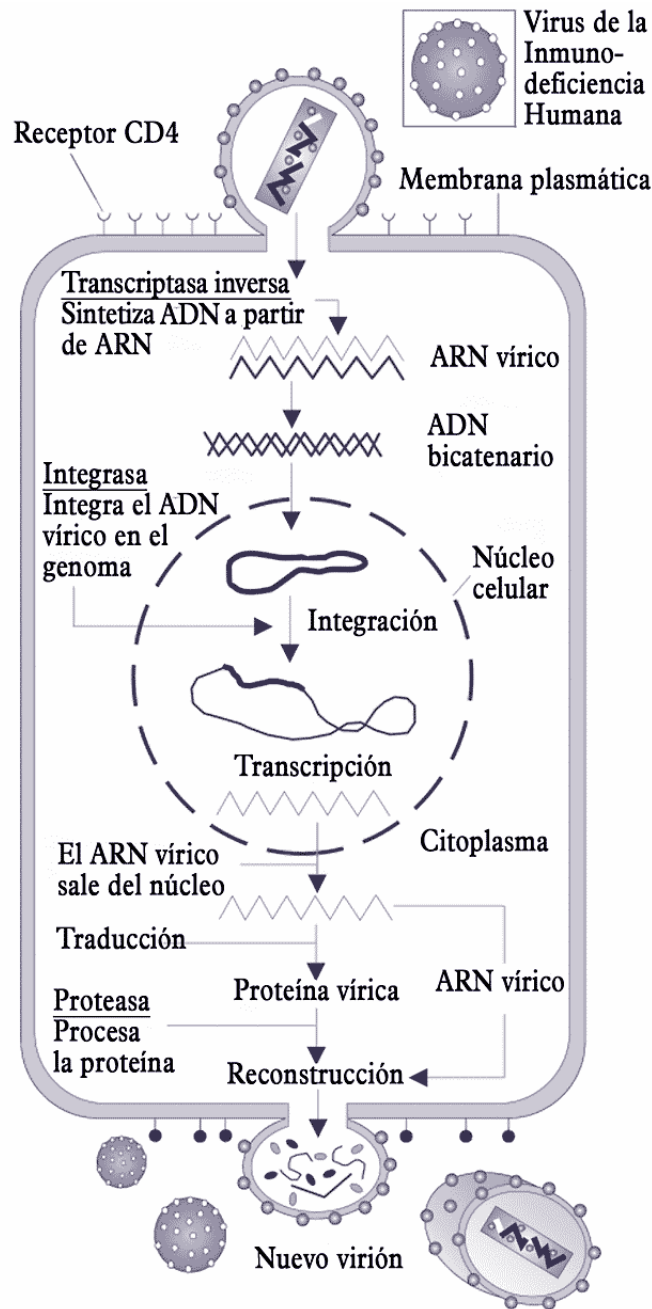


Figura 1.2: Ciclo de replicación del VIH.²

- Transcripción reversa: Una vez que el virión del VIH penetra en la célula, las enzimas del complejo nucleoproteico se activan. El centro de nucleoproteínas del virus se desestructura. Luego el genoma ARN se transcribe a la forma de ADN bicatenario por acción de la transcriptasa inversa del virus.
- Integración: El ADN viral permanece unido al complejo nucleoproteico, con el que pasa al núcleo celular junto con la integrasa viral en esa célula. Dentro del núcleo la integrasa cataliza la integración del ADN viral en el genoma de la célula huésped. Esta forma integrada del ADN del virus se denomina provirus. Este puede permanecer transcripcionalmente inactivo por un tiempo, generando un estado de latencia viral.
- Transcripción: La célula infectada, al generar ARN a partir del provirus, generará ARN

que sirve como genoma del nuevo virión y ARNm, necesarios para las poliproteínas y enzimas del virus.

- **Ensamblaje:** las proteínas de *gag* (ver Ref. [4]), y la transcriptasa inversa sintetizada a partir de la proteína *pol* se asocian con el ARN viral formando la cápside. Las proteínas de *env* se insertan en la membrana plasmática de la célula, y colaboran en la composición de la membrana del virión asociándose a la membrana de la célula.
- **Brotación:** Tras el ensamblaje, se produce la salida de la célula por gemación, durante la cual el virus adquiere la doble capa lipídica de su envoltura. En este proceso el virus arrastra parte de la membrana celular, donde se incluyen también las glicoproteínas de origen viral.
- **Maduración:** Las partículas gemadas son procesadas por la proteasa viral que corta las poliproteínas precursoras. La proteasa es activa solamente dentro del virión.

1.5.3. Linfocitos T CD4+

Una de las consecuencias de la infección con el VIH, es el agotamiento progresivo de los linfocitos T CD4+ (también llamados linfocitos T colaboradores). Debido a su rol significativo en la regulación inmune, este agotamiento es uno de los efectos más nocivos de la infección. Es por ello que modelar los efectos de la infección en la población de estas células provee mucha información significativa sobre el avance del virus.

1.5.4. Etapas de la Infección

El estadio de la enfermedad y su pronóstico o el efecto de una terapia con antirretrovirales en un paciente se mide a través de dos mediciones específicas:

1. Población de linfocitos T CD4+/ mm^3 . Se determina mediante citometría de flujo.
2. Cuantificación de la carga viral (copias/ mm^3), mediante *Polymerase Chain Reaction* (PCR) cuantitativa, entre otras técnicas.

A partir de estas mediciones se identifica el comportamiento del virus a lo largo de todo el proceso infeccioso.

La infección por VIH se presenta en diversas etapas, identificadas por un conjunto de síntomas e indicadores clínicos. Esta comienza con una infección aguda, sólo parcialmente controlada por una respuesta inmunitaria adaptativa, y evoluciona a una infección progresiva crónica de los tejidos linfoides periféricos. De esta manera, la persona infectada queda expuesta a diversas enfermedades oportunistas y eventualmente fallece. En la figura 1.3 se puede observar el recuento de Linfocitos T CD4+ y Viriones sueltos en sangre a lo largo del proceso de infección en el tiempo.

Fase Aguda

La infección primaria se produce cuando los viriones VIH presentes en los fluidos corporales de un individuo entran en las células de otro mediante los fenómenos de fusión mediados por los receptores descritos anteriormente. Dependiendo del sitio de exposición inicial, las primeras células infectadas pueden ser linfocitos T CD4+ y monocitos en sangre o linfocitos T CD4+, células dendríticas y macrófagos en las mucosas. Las células dendríticas desempeñan un papel importante en la diseminación inicial del VIH (ver Ref. [5]) debido a que su función es atrapar los

³Versión en español de la imagen producida por Jurema Oliveira para commons y traducida por Luis Fernández García (GFDL). Ver <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Hiv-timecourse-es.png>

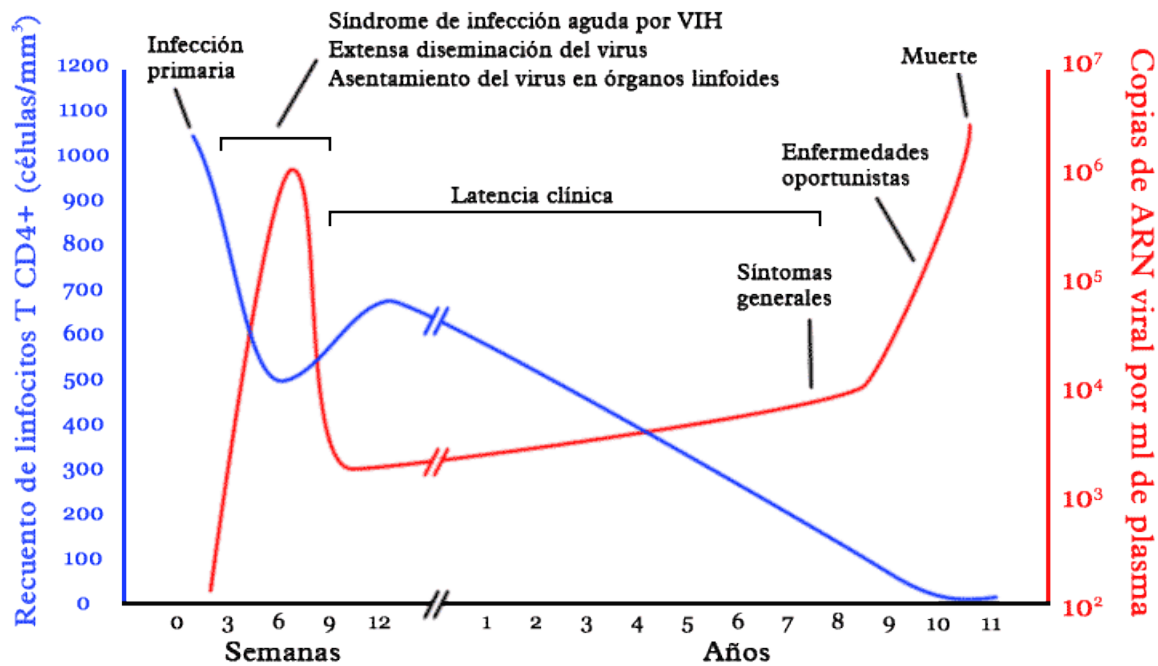


Figura 1.3: Diagrama sobre la historia natural de la infección por VIH ³

antígenos en los epitelios y migrar hacia los ganglios linfáticos. Una vez allí las células dendríticas pueden transferir el virus a las células T CD4+ mediante contacto intercelular. Luego se genera una replicación viral elevada, que ocasiona viremia. Esto permite al virus diseminarse por todo el organismo e infectar a los linfocitos T CD4+, macrófagos y células dendríticas de los tejidos linfoides periféricos. Al generarse este cuadro infeccioso el sistema inmunitario adaptativo pone en marcha respuestas inmunitarias tanto celulares como humorales dirigidas a los antígenos virales, controlando parcialmente la infección y la producción del virus.

Síntomas:

En una persona con buena salud, el número de linfocitos T CD4+ oscila entre 1200 y 1500 células por mm^3 .

Durante la fase asintomática de la infección, la proporción de linfocitos desciende en cuestión de semanas a cerca de unos pocos cientos de linfocitos T CD4+/ mm^3 , aumentando luego progresivamente hasta llegar a cerca de los 700 T CD4+/ mm^3 en la infección crónica. Las pruebas de carga viral, arrojarán como resultado una elevada cantidad de copias del VIH durante la fase aguda de la infección. A las 12 semanas de la exposición primaria la viremia desciende hasta niveles bajos. En algunos casos los niveles pueden llegar a ser indetectables si se aplican tratamientos. En esta fase se pueden identificar síntomas comunes como fiebre, cefalea, faringitis, entre otros.

Fase crónica

También denominada latencia clínica dado que el portador no presenta síntomas que puedan asociarse con la infección. Durante esta fase pueden detectarse niveles bajos del virus en sangre. No obstante, la destrucción de las células T CD4+ en los tejidos linfoides progresa ininterrumpidamente durante este período de latencia clínica, y el número de células T CD4+ en sangre disminuye constantemente. Se producen ciclos de producción y destrucción de estas células cuando el paciente está asintomático. Los linfocitos asociados a la membrana no se recuperan. Al principio el organismo puede reponer la producción de linfocitos T CD4+, pero con el tiempo el deterioro de los tejidos ocasiona una reducción en la producción de estos. Durante

esta fase, la respuesta inmunitaria a otras enfermedades puede estimular la producción de VIH y por lo tanto acelerar el proceso de deterioro. Esta fase puede durar de 3 a 10 años.

SIDA

El SIDA constituye la etapa crítica de la infección por VIH. En esta fase de la infección, el portador del VIH posee un sistema inmunológico incapaz de reponer los linfocitos T CD4+ que pierde bajo el ataque del VIH. El tejido linfoide periférico se encuentra en un estado de deterioro muy avanzado y es incapaz de recuperarse. El recuento de linfocitos T CD4+ desciende por debajo de los $200/mm^3$. Este fenómeno coincide con el aumento en las tasas de replicación del virus, que merma la capacidad de reacción del anfitrión ante otras enfermedades. De esta manera, el portador del virus es presa potencial de numerosas infecciones oportunistas que le pueden conducir a la muerte. La mayoría de los pacientes que han desarrollado SIDA no sobreviven más de 3 años sin recibir tratamiento antirretroviral.

1.6. Antirretrovirales

En la actualidad los tratamientos para un paciente infectado con VIH buscan interrumpir las etapas del proceso de replicación descritas anteriormente en 1.5.2. Para esto se elaboraron numerosos fármacos denominados antirretrovirales. Estos se pueden clasificar según la etapa de replicación en que actúan:

1.6.1. Inhibidores de Retrotranscriptasa (RTI)

Cuando el virus VIH infecta a la célula, la transcriptasa inversa contenida en el virión genera una copia ADN a partir de su genoma ARN. Este ADN copiado sirve de molde para la síntesis de un ADN complementario generándose ADN de doble cadena que migra al núcleo como parte de un complejo, luego es integrado dentro del ADN de la célula infectada con la ayuda de la integrasa, haciendo que la célula permanezca infectada de por vida. En el caso que la célula se divida, cada célula hija porta el provirus.

Si la transcriptasa inversa es inhibida, el VIH puede entrar a la célula pero no puede infectarla exitosamente, ya que la copia ADN del genoma viral no se realizará y la célula no hará proteínas virales de las partículas del virus. El ARN viral que entró a la célula, al no ser estable, tenderá a degradarse. Existen tres clases de RTI:

1. Inhibidores análogos de nucleósidos (NRTI).
2. Inhibidores no nucleósidos de transcriptasa inversa (NNRTI).
3. Inhibidores de transcriptasa análogos de nucleótido.

1.6.2. Inhibidores de Proteasa (PI)

Muchas proteínas virales, incluyendo las enzimas transcriptasa reversa, proteasa e integrasa, se originan de una proteína precursora mayor que se activa por acción de la proteasa.

Si la proteasa es inhibida, la partición de las poliproteínas no ocurrirá, y las partículas virales que se generen carecerán de la transcriptasa reversa, proteasa e integrasa. El efecto de bloquear la proteasa del VIH es que se generan viriones defectuosos o “no-infecciosos”.

1.6.3. Otros

Existen otro tipo de antirretrovirales, que no serán contemplados en este trabajo debido a que su efecto en la dinámica poblacional no ha sido modelado aún. Estos son:

Inhibidores de la entrada

Impiden la entrada del virus a la célula previniendo la infección de células sanas.

Inhibidores de la integrasa

Evitan la acción de la integrasa perteneciente únicamente al VIH-1.

Inhibidores de la adhesión

Evitan que el VIH se adhiera a la célula con el receptor CD4+.

1.6.4. Terapia combinada

Los antirretrovirales individualmente no suprimen la infección por VIH a largo plazo debido principalmente a que el virus es capaz de generar mutantes resistentes a cada uno de ellos, por lo cual actualmente se usan combinaciones de estos. Las combinaciones de antirretrovirales actúan incrementando el número de obstáculos para la mutación viral, manteniendo bajo el número de copias virales. Las combinaciones de antirretrovirales pueden ser de sinergismo positivo o negativo. Esto limita el número de combinaciones disponibles. Por ejemplo, la combinación de Didanosina (ddI) y AZT es de sinergismo negativo, ya que tomados juntos, cada fármaco inhibe la acción del otro. Otros factores que limitan las combinaciones son la aparición de efectos colaterales severos y la necesidad de un horario de administración complicado, lo que dificulta la adherencia apropiada al tratamiento [6].

Parte II

Formulación del Problema

Capítulo 2

Problema y propuesta

2.1. Problema

2.1.1. Resistencia Viral y Fallo Viroológico

Cuando una población de VIH tiene cepas con algún gen que les permite una mayor resistencia a una determinada sustancia tóxica en comparación con el resto de la población, ésta puede ejercer una fuerte presión selectiva si se recibe en dosis tales que sea más letal para las variantes sin el gen de resistencia. Las cepas resistentes tendrán más probabilidad de sobrevivir, reproducirse, y transmitir el gen a sus descendencia, de modo que aumentará el porcentaje de la población resistente a esta dosis particular.

Las mutaciones ocurren permanentemente en el material genético viral, principalmente porque el mecanismo de retrotranscripción adolece de verificación, como si lo tiene el de transcripción en el núcleo. Algunas de esas mutaciones implican un cambio en algunos codones de los genes involucrados en la síntesis de las proteínas virales mencionadas anteriormente. Muchas de esas mutaciones son contraproducentes y producen proteínas no funcionales o bien no alteran el aminoácido resultante del codón. En particular, algunas mutaciones eventualmente cambian el aminoácido codificado de forma tal que el mecanismo de inhibición del antirretroviral deja de ser efectivo.

Actualmente tanto las terapias simples como combinadas pueden dejar de ser efectivas a largo plazo. La causa de esto es que dada la aplicación de un fármaco, este deja de ser efectivo al cabo de unos meses debido a que el virus genera resistencia. Este fenómeno es denominado *fallo virológico*. El fallo virológico predispone al fallo inmunológico y eventualmente a la progresión de la inmunodeficiencia. El fallo virológico aislado, en ninguna circunstancia, es una causa para discontinuar el tratamiento antirretroviral.

2.1.2. Reservorios del VIH

Teniendo en cuenta el fenómeno de resistencia viral, uno podría pensar que mediante una terapia combinada de antirretrovirales intensiva podría eliminar el virus del hospedador sin darle tiempo de generar resistencia. Estas terapias son denominadas *Highly Active AntiRetro Viral Therapy* (HAART), y han sido estudiadas con intensidad desde los comienzos de las terapias combinadas.

En pacientes tratados con terapias HAART, no se produce el *clearance* del VIH en el cuerpo debido a que persiste en un pequeño reservorio de células denominado *reservorio viral latente*. El número de estas células van de 1 a 2 millones en un paciente dado [7]. Si bien pueden ser halladas en el torrente sanguíneo, su número es relativamente pequeño y tampoco se ha logrado establecer con claridad mecanismos de latencia.

Es desconocido si persisten en una ubicación anatómicamente privilegiada como el sistema nervioso central que es menos accesible a farmacología o inmunoterapias. Si bien muchas células

pueden contribuir al reservorio, las mejor caracterizadas son los linfocitos T CD4+ quiescentes (en reposo). Estos contienen el provirus pero no producen virus infeccioso a menos que sean estimulados, o la transcripción viral sea inducida de alguna otra manera. Otros linfocitos quiescentes de gran importancia son los linfocitos de memoria que son los que mas viven y son responsables de la permanencia del virus a largo plazo (meses a años). La mayoría de los linfocitos quiescentes no producen ARN viral y son inmunes a terapias que inhiben la transcripción. También son probablemente inmunes a agentes farmacológicos o inmunoterapias que apuntan a las proteínas virales.

2.1.3. Estrategias para eliminación de la infección

Dado que las terapias HAART que son prolongadas conllevan riesgos por toxicidad de los antiretrovirales [8], se ha hecho un enfoque más reciente en generar estrategias para purgar células latentemente infectadas y por lo tanto eliminar el VIH del paciente, aunque está en actual debate si es teórica o prácticamente viable [9].

Existen numerosas formas propuestas para superar este obstáculo. Muchas de estas apuntan a activar la transcripción de las células latentemente infectadas, estimulándolas mediante Citoquinas, estimulación del Receptor de linfocitos T (TcR) o induciendo directamente la transcripción viral [9].

Una vez que la transcripción viral es activada se considera que las células infectadas quiescentes van a ser destruidas por los cambios degenerativos causados por el virus. A esto se le denomina *Cytopathic Effect* (CPE). En teoría la infección de nuevas células puede ser prevenida mediante el tratamiento en simultaneo con HAART. Alternativamente, las células latentemente infectadas pueden ser activadas y eliminadas por inmunoterapias o por respuesta de los linfocitos T citotóxicos (CD8+) específicos, que inducirán la muerte de las células infectadas por VIH. De todas formas es desconocido si la activación de transcripción viral de células latentemente infectadas son eliminadas por CPE. Tampoco ha sido explorada la habilidad de eliminar los linfocitos reactivados mediante T *Cluster of Differentiation 8* (CD8+) específicos.

2.1.4. Vorinostat

Las enzimas que remodelan la cromatina como la Histona Deacetilasa (HDAC) parecen jugar un papel importante en el mantenimiento de la latencia. El inhibidor *SuberoylAnilide Hydroxamic Acid* (SAHA), denominado comúnmente como Vorinostat, que es una droga aprobada por la *Food and Drug Administration* (FDA) (ente estadounidense regulador de alimentos y medicamentos) que ha mostrado previamente causar la reactivación *in vitro* de células latentemente infectadas por VIH-1 de individuos que están recibiendo tratamiento HAART [10, 11].

También se hicieron observaciones de estas células y se demostró que la reactivación viral no causa la muerte de los T CD4+ quiescentes por CPE y que los T CD8+ específicos del VIH también fallan en matar los T CD4+ quiescentes activados [12]. Esto último sugiere que la reactivación de VIH-1 latente sólo no purga el reservorio viral latente.

2.2. Propuesta

En este trabajo, realizado con la colaboración de la Fundación para el Desarrollo de la Programación en Ácidos Nucleicos (FuDePAN), se propone extender ViSi para poder simular, con un grado de detalle avanzado, modelos que pongan de manifiesto el problema. Se busca lograr garantizar que las modificaciones de software sean modulares, para que su funcionalidades puedan ser extendidas fácilmente, permitiendo realizar un conjunto más amplio de experimentos. El código fuente es libre, bajo licencia *GNU General Public License third version* (GPLv3), y se puede obtener en el repositorio del proyecto [2].

Capítulo 3

Modelos matemáticos

3.1. Introducción

El objetivo de este capítulo es resumir brevemente los modelos matemáticos considerados en este trabajo final de grado. Solo se consideraron modelos determinísticos basados en sistemas dinámicos continuos.

Los modelos matemáticos analizados fueron el Modelo de Perelson, Kirschner y De Boer [13] y Kirschner & Webb Modificado [1].

A partir de estos modelos, se propusieron e implementaron tres modelos nuevos:

1. Modelo de Kirschner & Webb Modificado con incorporación de linfocitos latentes (variante de Kirschner Webb Modificado)
2. Modelo Matricial Multicepa (versión generalizada del anterior)
3. Modelo Perelson Extendido Matricial.

3.2. Modelo de Perelson, Kirschner y De Boer

El trabajo de Alan Perelson, Denise Kirschner y Rob De Boer [13] es uno de los primeros intentos por modelar la interacción del VIH con linfocitos T CD4+. Este modelo considera cuatro poblaciones, cuantificadas en concentraciones:

- T : concentración de linfocitos T CD4+ sin infectar.
- T^* : concentración de linfocitos T CD4+ latentemente infectados.
- T^{**} : concentración de linfocitos T CD4+ activamente infectados.
- V : concentración de viriones libres.

Se consideran latentemente infectados a los linfocitos que contienen el provirus pero no están produciendo progenie viral, y activamente infectados a los linfocitos que están produciendo virus. Para este modelo la dependencia espacial es ignorada y se parte de la idea de que las interacciones dadas ocurren en un compartimento bien mezclado como lo es el torrente sanguíneo. Dada la naturaleza determinista del modelo, este no toma en cuenta las variabilidades producidas en las etapas tempranas de la infección. A fines prácticos sólo se consideran los viriones infectantes.

Los parámetros involucrados están descriptos en la tabla 3.1. Se asume que que la dinámica de las poblaciones está dada por:

$$\frac{dT}{dt} = s - \mu_T T + rT \left(1 - \frac{TT^* + T^{**}}{T_{\text{máx}}} \right) - k_1 VT \quad (3.1)$$

$$\frac{dT^*}{dt} = k_1 VT - \mu_T T^* - k_2 T^* \quad (3.2)$$

$$\frac{dT^{**}}{dt} = k_2 T^* - \mu_b T^{**} \quad (3.3)$$

$$\frac{dV}{dt} = N\mu_b T^{**} - k_1 VT - \mu_V V \quad (3.4)$$

Como se puede observar en las ecuaciones, se considera la tasa de sobrevivencia de los linfocitos no infectados μ_T igual a la tasa de sobrevivencia de los linfocitos latentemente infectados.

Si un linfocito encuentra un antígeno para el cual es específico, este es estimulado a crecer. Esta dinámica es compleja y excede el modelo tratado. Dado que estamos tratando con células T CD4+ de todas las especificidades, se asume una tasa constante r de reproducción de linfocitos T CD4+ estimulados a crecer.

Dado que la reproducción de linfocitos no puede crecer indefinidamente, tanto por la regulación del sistema inmune como por una limitación de los recursos necesarios para la mitosis, se incorpora el factor de Verhulst $(1 + (T - T^* + T^{**})/T_{\text{máx}})$, donde $T_{\text{máx}}$ es la concentración máxima de linfocitos T CD4+. De esta manera su crecimiento pasa de ser exponencial a ser logístico, acotado por $T_{\text{máx}}$.

Se asume que las células activamente infectadas son generadas de las células latentemente infectadas a una tasa constante k_2 . Esta activación involucra células latentemente infectadas estimuladas a dividirse. *In vitro* se ha podido observar que una variedad de estímulos incluyendo antígenos y mitógenos inducen la expresión del VIH. Esto implica que k_2 debería ser una tasa, como r . Sin embargo, también incluye la probabilidad de que la estimulación induzca la producción viral.

El parámetro μ_b representa la tasa de mortalidad resultante de la acción del desgaste propio de la célula productora de viriones como de todo el sistema inmune que puede neutralizar la célula por acción de anticuerpos, fagocitosis por macrófagos e inducción de la apoptosis. Si bien las células activamente infectadas se pueden dividir dos o tres veces y generar células hijas, esta expansión es suficientemente pequeña y es ignorada.

El número total de viriones producidos por una célula infectada durante su vida, incluyendo todas sus células hijas, es considerado por el factor N . Por simplicidad se asume una tasa de producción de viriones constante igual a N veces la tasa de muerte de la célula.

El virus libre es disminuido por unión con las células sanas a una tasa $k_1 VT$. Esta unión también ocurriría en los linfocitos latentemente infectados causando superinfección, pero se rechaza esta posibilidad para mantener el modelo lo más simple posible. Las células activamente infectadas tienden a perder su CD4, por lo que la unión de viriones a estos es también ignorada. Por último la tasa $\mu_V T$ considera la pérdida de infectividad, muerte viral y clearance del cuerpo infectado.

3.2.1. Análisis Matemático del Modelo

A continuación se transcriben algunos resultados analíticos obtenidos por Perelson et al. [13] que son de utilidad para entender la dinámica asintótica del modelo para tiempos largos. Este modelo es razonable en el sentido de que ninguna población puede pasar a ser negativa ni crecer indefinidamente. El ortante R_+^4 es denominado región invariante positiva del modelo, que significa que si la trayectoria comienza en ese ortante permanece allí siempre.

Dentro de la región invariante positiva del modelo hay dos posibles estados estables:

Parámetro	Significado
s	Tasa de generación de nuevos linfocitos T a partir del timo y médula ósea
μ_T	Tasa de muerte de linfocitos T CD4+ sin infectar y latentemente infectados
r	Tasa de crecimiento temprana para la población de células T CD4+
$T_{\text{máx}}$	Población máxima posible de linfocitos T CD4+ en total
k_1	Tasa constante para los linfocitos T CD4+ siendo infectados por virus libres
k_2	Tasa de conversión de linfocitos T CD4+ latentes a infectados
μ_b	Tasa de muerte de los linfocitos T CD4+ activamente infectados
μ_V	Tasa de muerte de los virus libres
N	Número de virus libres producidos por lisis de una célula T CD4+

Cuadro 3.1: Parámetros de las ecuaciones Perelson et al. [13]

- **Estado no infectado:** El virus está totalmente ausente. Esta dado por

$$\bar{T} = T_0, \quad \bar{T}^* = \bar{T}^{**} = \bar{V} = 0, \quad (3.5)$$

donde T_0 está dado por

$$T_0 = \frac{p + \sqrt{p^2 + 4s\gamma}}{2\gamma} \quad (3.6)$$

utilizando los parámetros p y γ definidos como

$$p = r - \mu_T, \quad \gamma = r/T_{\text{máx}}. \quad (3.7)$$

- **Estado endémicamente infectado:** En este estado las poblaciones son

$$\bar{T} = \frac{\mu_v k_3}{k_1(Nk_2 - k_3)} \quad (3.8a)$$

$$\bar{T}^* = \frac{\mu_v \bar{V}}{Nk_2 - k_3} \quad (3.8b)$$

$$\bar{T}^{**} = \frac{k_2 \mu_V \bar{V}}{\mu_b(Nk_2 - k_3)} \quad (3.8c)$$

$$\bar{V} = \frac{s\alpha^2 + p\alpha\mu_V - \gamma\mu_V^2}{k_1\mu_V(\alpha + \beta\mu_V)} \quad (3.8d)$$

donde

$$\begin{aligned} k_3 &= k_2 + \mu_T \\ \alpha &= k_1 \left(\frac{Nk_2}{k_2 + \mu_T} - 1 \right) \\ \beta &= \frac{\gamma}{k_3} \left(1 + \frac{k_2}{\mu_b} \right) \end{aligned}$$

Para que el estado estable no infectado sea asintóticamente estable se requiere que $N < N_{crit}$, donde

$$N_{crit} = \frac{k_3 (\mu_V + k_1 T_0)}{k_2 k_1 T_0}. \quad (3.9)$$

En caso contrario el sistema se estabilizará en un estado estable endémicamente infectado.

3.2.2. Análisis numérico

Con motivo de estudiar los factores que influyen en el tiempo que tarda el modelo en alcanzar el estado endémicamente infectado, así como la variación de máximos y mínimos de poblaciones durante el proceso, se realizaron simulaciones teniendo en cuenta la variación de los coeficientes mas importantes del modelo. Estos son la tasa de infección de T CD4+ sanos (k_1) y tasa de activación de linfocitos T CD4+ latentemente infectados (k_2). Por último se analizaron estos dos coeficientes y su influencia en el número de virus libres producidos por lisis (N) mínimo necesario para que el modelo se establezca con un estado endémicamente infectado.

Tasa de infección de T CD4+ sanos

Se realizaron 7 simulaciones haciendo variaciones de k_1 partiendo de 4×10^{-5} a 1×10^{-4} T CD4+ por mm^3 /día, realizando un incremento de 1×10^{-5} en cada simulación.

En la figuras 3.1 y 3.2 se observan los resultados en términos de la concentración de cada población. Las líneas horizontales corresponden a los valores esperados en estado endémicamente infectados según las ecuaciones de 3.8. En la figura 3.3 se puede observar la distribución de los máximos y mínimos para cada población, para cada variación de k_1 . De las gráficas se puede observar que el estado endémicamente infectado tarda menos tiempo en ocurrir a medida que aumenta la tasa de infección de los linfocitos, así como disminuye la población del estado endémicamente infectado. También es importante remarcar que a medida que aumenta la tasa de infección, se genera un pico de viremia mas elevado.

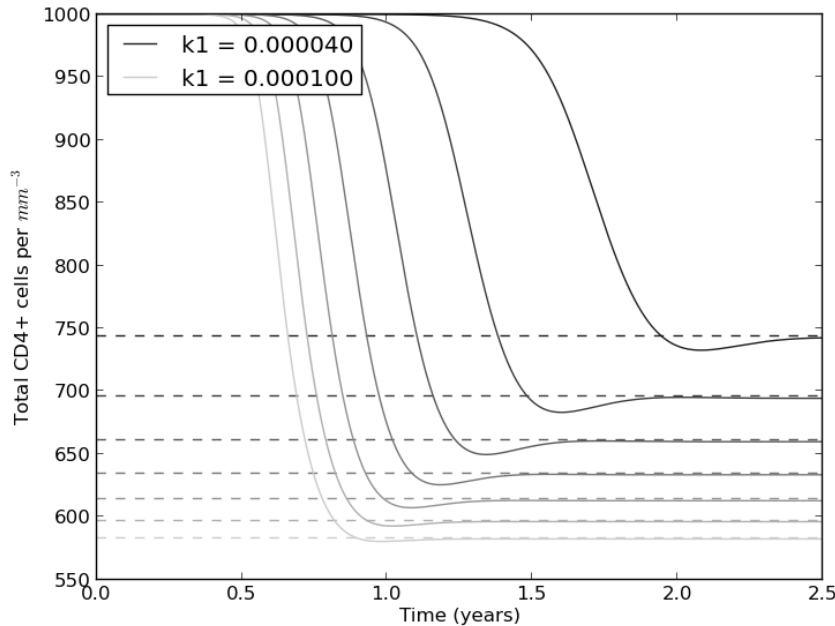


Figura 3.1: Concentraciones de T CD4+ a lo largo del tiempo con variaciones de k_1

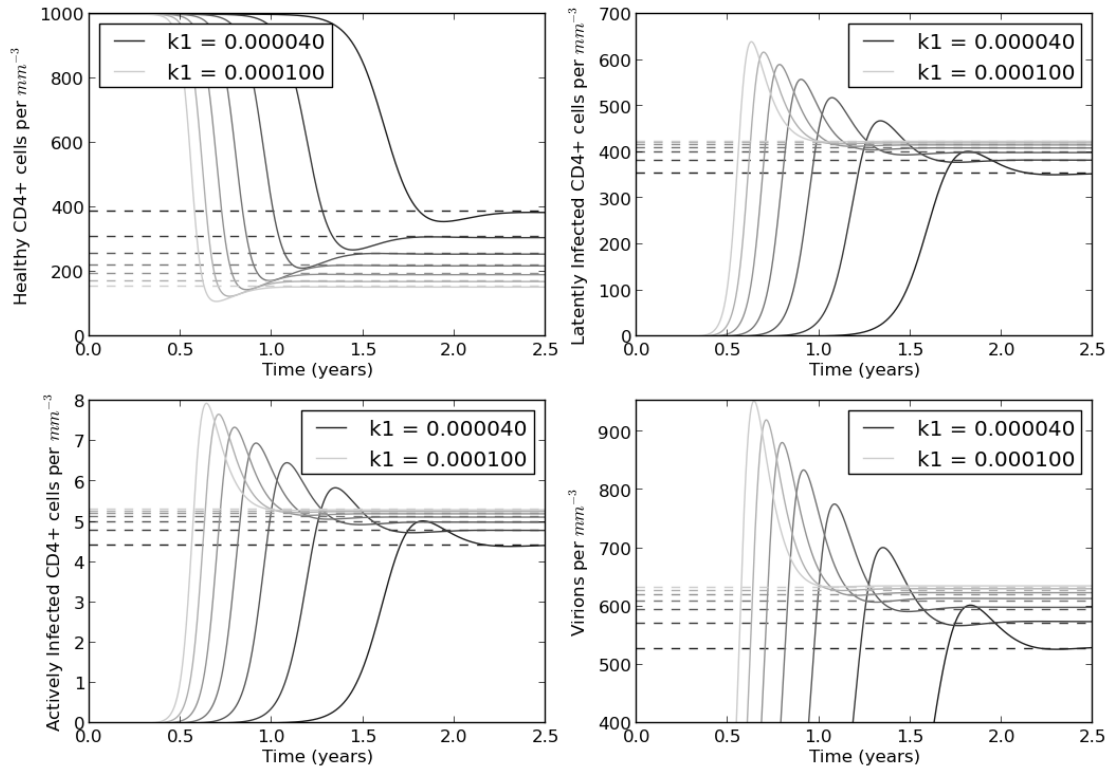


Figura 3.2: Concentraciones a lo largo del tiempo con variaciones de k_1

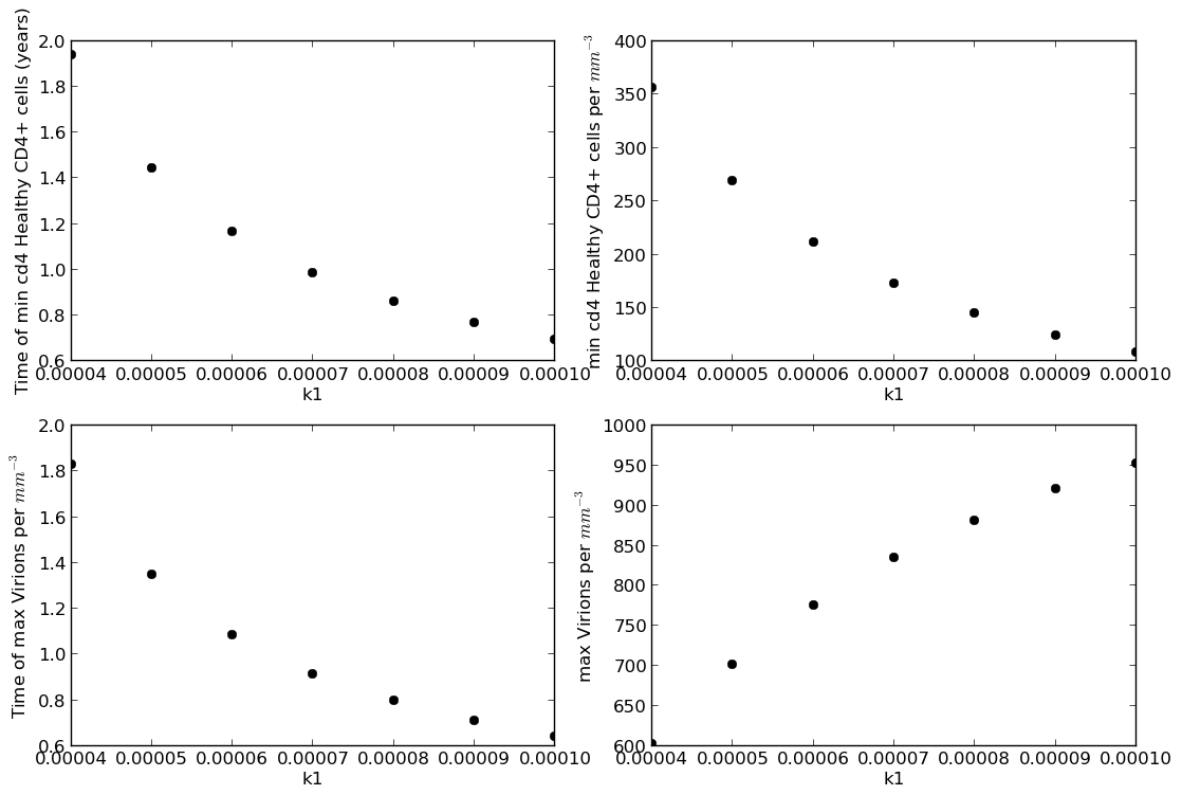


Figura 3.3: Valores mínimos y máximos alcanzados para las poblaciones según las variaciones de k_1

Tasa de activación de linfocitos T CD4+ latentemente infectados

Se realizaron 18 simulaciones haciendo variaciones de k_2 partiendo de 3×10^{-3} a 2×10^{-2} T CD4+ por $mm^3/día$, realizando un incremento de 1×10^{-3} en cada simulación.

En la figuras 3.4 y 3.5 se observan los resultados en términos de la concentración de cada población. Se omitieron las líneas horizontales de estado endémicamente infectado a fines de hacerlo mas legible. En la figura 3.6 se puede observar la distribución de los máximos y mínimos para cada población, para cada variación de k_2 .

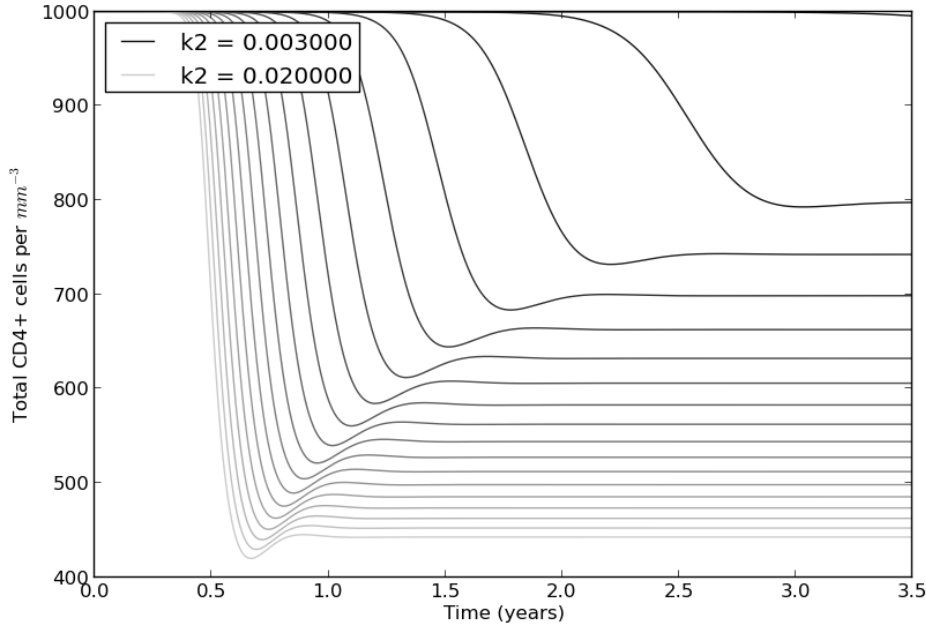


Figura 3.4: Concentraciones de T CD4+ a lo largo del tiempo con variaciones de k_2

Una observación importante sobre la figura 3.5 es que los máximos tanto de viremia como de linfocitos latentes son poco sensibles al valor de k_2 a diferencia de los mínimos. Sin embargo, los máximos de los latentemente infectados cambian mucho con el valor de k_2 .

Número de virus libres producidos por lisis

En la figura 3.7 se muestran los valores de N_{crit} en función de k_1 y k_2 , utilizando la ecuación 3.9. Se puede observar que la cantidad mínima de número de virus libres producidos por lisis necesarias para que se alcance el estado endémicamente infectado es menor a medida que la tasa de activación de linfocitos latentemente infectados aumenta. Lo mismo sucede con la tasa de infección de linfocitos latentes.

3.3. Modelo de Kirschner-Webb Modificado

El modelo Kirschner-Webb modificado, es un modelo realizado en el Trabajo Especial de Licenciatura realizado por Pablo Oliva y Leandro Ramos [1]. Este se basa en el modelo presentado anteriormente, incorporando conceptos introducidos Kirschner y Webb [14] y Perelson y Nelson [15]. Está orientado a la simulación de los efectos de dos familias principales de antirretrovirales (PI y RTI), discriminando dos cepas virales diferenciadas. A diferencia del modelo anterior no se hace una distinción entre los linfocitos T CD4+ infectados latentes y activos.

Este modelo toma en cuenta 7 poblaciones cuantificadas en concentraciones:

- T : concentración de linfocitos T CD4+ sin infectar.

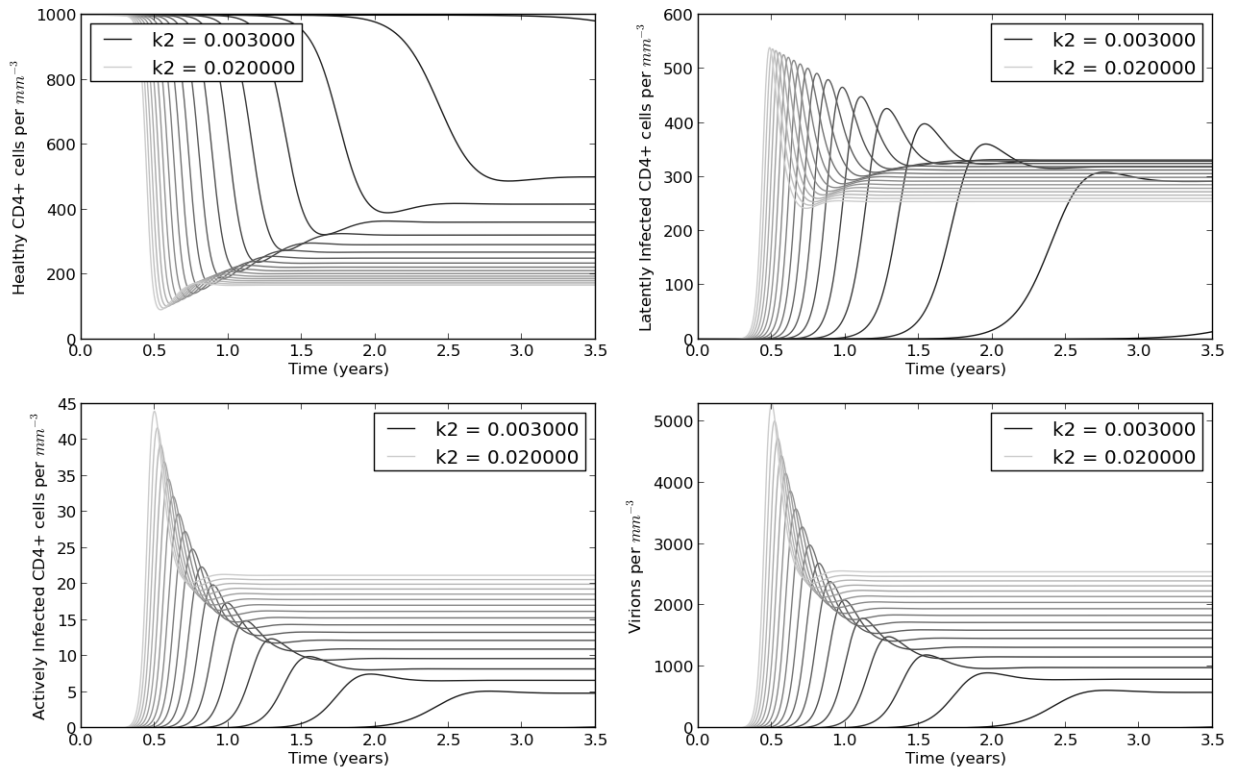


Figura 3.5: Concentraciones a lo largo del tiempo con variaciones de k_2

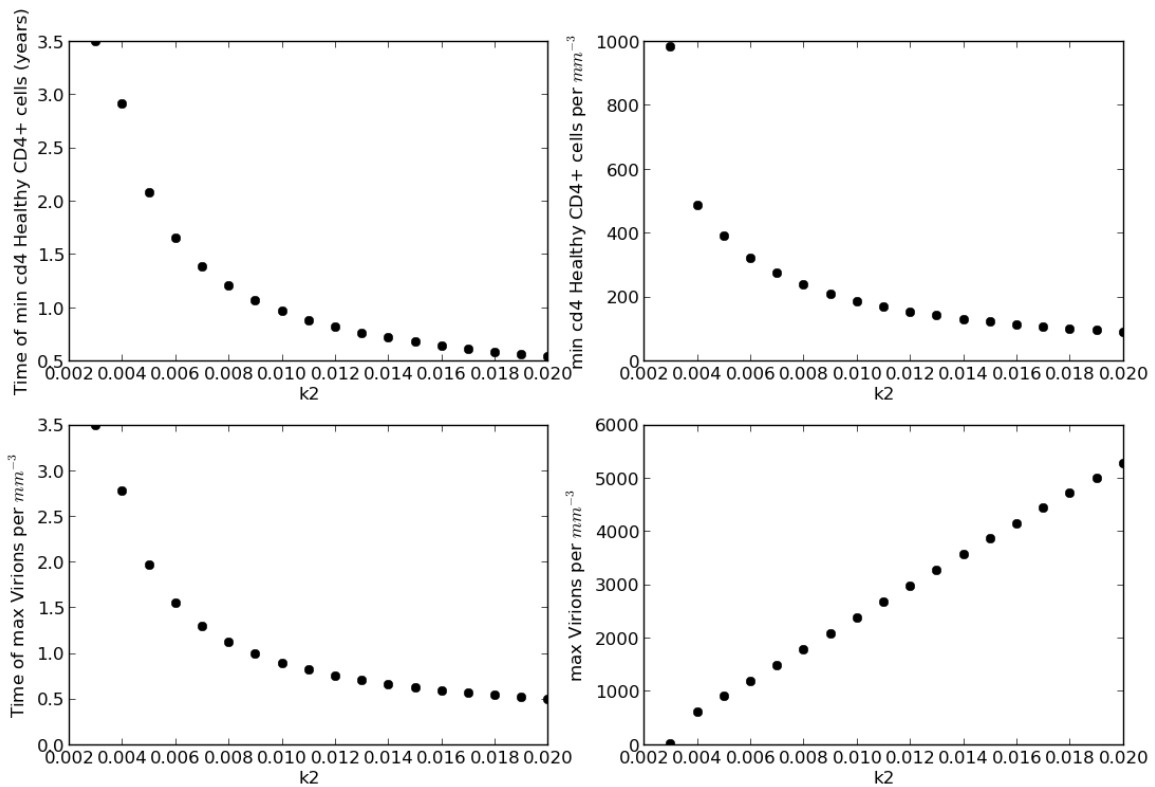


Figura 3.6: Valores mínimos y máximos alcanzados para las poblaciones según las variaciones de k_2

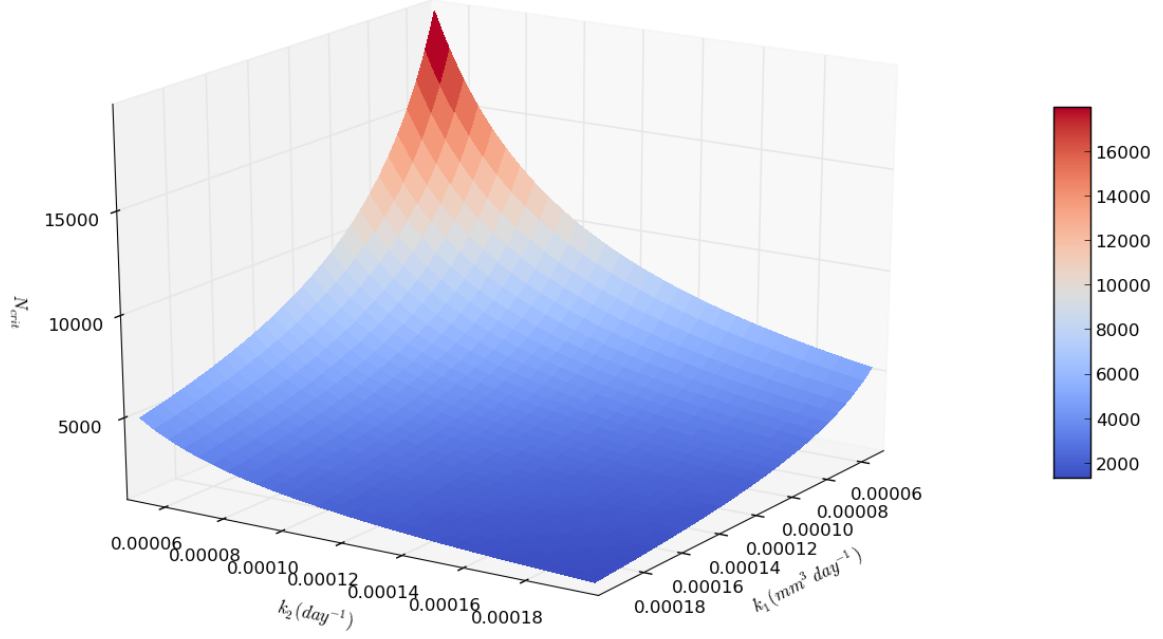


Figura 3.7: Valores de N_{crit}

- T_1 : concentración de linfocitos T CD4+ infectados por viriones de cepa 1.
- T_2 : concentración de linfocitos T CD4+ infectados por viriones de cepa 2.
- V_1^{PB} : concentración de viriones de cepa 1 con proteasa bloqueada.
- V_2^{PB} : concentración de viriones de cepa 2 con proteasa bloqueada.
- V_1^{PNB} : concentración de viriones de cepa 1 con proteasa no bloqueada.
- V_2^{PNB} : concentración de viriones de cepa 2 con proteasa no bloqueada.

Las ecuaciones del modelo son las siguientes

$$\frac{dT}{dt} = s + pT \left(1 - \frac{T + T_1 + T_2}{T_{\text{máx}}} \right) - \mu_T T - T(\theta_2^{RTI} k_2 V_{PNB}^2 + \theta_1^{RTI} k_1 V_{PNB}^1) \quad (3.10)$$

$$\frac{dT_1}{dt} = \theta_1^{RTI} k_1 V_{PNB}^1 T - \mu_{T_1} T_1 \quad (3.11)$$

$$\frac{dT_2}{dt} = \theta_2^{RTI} k_2 V_{PNB}^2 T - \mu_{T_2} T_2 \quad (3.12)$$

$$\frac{dV_1^{PB}}{dt} = \theta_1^{PI} q \mu_{T_1} n_1 T_1 + \theta_2^{PI} (1 - q) \mu_{T_2} n_2 T_2 - c_1 V_1^{PB} \quad (3.13)$$

$$\frac{dV_1^{PNB}}{dt} = (1 - \theta_1^{PI}) q \mu_{T_1} n_1 T_1 + (1 - \theta_2^{PI}) (1 - q) \mu_{T_2} n_2 T_2 - c_1 V_1^{PNB} \quad (3.14)$$

$$\frac{dV_2^{PB}}{dt} = \theta_2^{PI} q \mu_{T_2} n_2 T_2 + \theta_1^{PI} (1 - q) \mu_{T_1} n_1 T_1 - c_2 V_2^{PB} \quad (3.15)$$

$$\frac{dV_2^{PNB}}{dt} = (1 - \theta_2^{PI}) q \mu_{T_2} n_2 T_2 + (1 - \theta_1^{PI}) (1 - q) \mu_{T_1} n_1 T_1 - c_2 V_2^{PNB} \quad (3.16)$$

$$(3.17)$$

En la Tabla 3.2 se detalla el significado de la notación utilizada.

Parámetro	Significado
s	Tasa de generación de nuevos linfocitos T a partir del timo y médula ósea
$T_{\text{máx}}$	Población máxima posible de los linfocitos T CD4+ en total
p	Tasa de proliferación de los linfocitos T CD4+
k_1	Tasa de infección de linfocitos T CD4+ por viriones de cepa 1
k_2	Tasa de infección de linfocitos T CD4+ por viriones de cepa 2
μ_T	Tasa de muerte de linfocitos T CD4+ sin infectar y latentemente infectados
μ_{T_1}	Tasa de muerte de los linfocitos T CD4+ infectados por viriones de cepa 1
μ_{T_2}	Tasa de muerte de los linfocitos T CD4+ infectados por viriones de cepa 2
q	$1 - q$ es la probabilidad de una mutación significativa
n_1	Cantidad de viriones de la primera cepa producidos por linfocito T CD4+ infectado
n_2	Cantidad de viriones de cepa 2 producidos por linfocito T CD4+ infectado
c_1	Tasa de eliminación de viriones de cepa 1
c_2	Tasa de eliminación de viriones de cepa 2
θ_1^{PI}	Efectividad de los inhibidores de proteasa en los viriones de cepa del grupo 1
θ_2^{PI}	Efectividad de los inhibidores de proteasa en los viriones de cepa del grupo 2
θ_1^{RTI}	Efectividad de los inhibidores de transcriptasa inversa en los viriones de cepa 1
θ_2^{RTI}	Efectividad de los inhibidores de transcriptasa inversa en los viriones de cepa 2

Cuadro 3.2: Parámetros de las ecuaciones del modelo de Kirschner-Webb modificado

3.3.1. Inhibidores de Retrotranscripción

Los RTI inhiben la retrotranscriptasa, de manera que los viriones que se fusionaron a las células sanas no pueden retrotranscribirse y el proceso infeccioso es interrumpido. Esto se manifiesta mediante la disminución del último término de la ecuación 3.10. A su vez los RTI, como todas las drogas antiretrovirales, poseen efectos tóxicos en el paciente, por lo cual su aplicación pocas veces se lleva a nivel de saturación. Esto implica que la efectividad de la acción antirretroviral nunca es completa. Luego el factor θ_i^{RTI} representa la efectividad de retrotranscripción de la cepa viral i , siendo $\theta_i^{RTI} = 1$ equivalente a una retrotranscripción 100% efectiva, y $\theta_i^{RTI} = 0$ una retrotranscripción nula.

3.3.2. Inhibidores de Proteasa

Los PI causan que las células infectadas produzcan viriones no infecciosos. Luego, en la presencia de un PI consideraremos dos tipos de partículas virales: viriones infecciosos en una concentración V_i^{PB} y viriones no infecciosos en una concentración V_i^{PNB} . Esta notación es en cierta manera imprecisa, ya que aún en la ausencia de un PI, no toda partícula de virus es infecciosa. Luego, para ser más preciso, V_i^{PB} denota la población de partículas de virus que no

han sido influenciadas por un PI y por lo tanto sus poliproteínas fueron separadas, mientras que V_i^{PNB} denota la población de partículas de virus con poliproteínas no partidas. Así como los RTI, la actividad antirretroviral de drogas PI tampoco llega a ser completa. Luego se asume que θ_i^{PI} es la efectividad de la PI o combinaciones de PI.

3.3.3. Mutación de viriones

Como se explica en [15] no todos los 10^{10} viriones producidos por día infectarán otras células, algunos serán defectuosos, otros, si bien infecciosos, serán eliminados. Ahora bien, considerando que cerca de 100 viriones son producidos por día en una sola célula T CD4+ en fase productora, se tendrán 10^8 muestras de ARN viral, potencialmente distintas, generadas por día. Así es de esperar un promedio de $0,25 \times 10^8$ mutantes sean generadas por día con un cambio en una sola base nucleica. Dado que cada una de las 10^4 bases en la secuencia del VIH-1 puede mutar a cualquiera de las 3 otras bases, hay un total de $3^i \binom{n}{i}$ posibles secuencias de longitud n con i mutaciones. Luego tomando $n = 10^4$ e $i = 1$, hay un 3×10^4 posibles mutantes con una sola base mutada, y esencialmente todas ellas serán generadas en un día. De esta forma, la resistencia a una droga, que sólo requiere un cambio de base, es esperable que ocurra rápidamente. Siguiendo el mismo razonamiento, la probabilidad de una mutación de dos bases sigue siendo alta, y en una población grande, muchos viriones mostrarán resistencia si sólo dos bases mutadas son requeridas.

En este trabajo suponemos que en cada replicación, existe una probabilidad de $(1 - q)$ de que una mutación significativa ocurra, y que la proporción q permanece igual a su cepa inicial. Una mutación “significativa” implica que un virión de la cepa 1 se convierta en un virión de la cepa 2 (también infectiva), o vice versa. Una observación importante es que las probabilidades de mutación entre cepas son simétricas; esta suposición se basa en los resultados de McLean y Nowak en la Ref. [16].

3.3.4. Consideraciones del modelo

Los experimentos presentados en el Trabajo Final de Grado ViSi (ver Ref. [1]) de este modelo mostraban que la infección aceleraba su proceso de años a semanas, siendo esto causado posiblemente por la ausencia de un reservorio de linfocitos T CD4+ en estado de latencia, como fue modelado en primera instancia por el modelo de Perelson et al. [13].

3.4. Modelo de Kirschner-Webb Modificado con incorporación de Linfocitos latentes

Este modelo es similar a la anterior, con la diferencia de que en este modelo si se tienen en cuenta los linfocitos T CD4+ latentemente infectados y activamente infectados. Esta discriminación se realizó de manera análoga a la planteada en el modelo inicial de Perelson et al. [13].

El modelo toma en cuenta 9 variables:

- T : concentración de linfocitos T CD4+ sin infectar.
- T_1^* : concentración de linfocitos T CD4+ latentemente infectados por viriones de la primera cepa.
- T_2^* : concentración de linfocitos T CD4+ latentemente infectados por viriones de la segunda cepa.
- T_1^{**} : concentración de linfocitos T CD4+ activamente infectados por viriones de la primera cepa.

- T_2^{**} : concentración de linfocitos T CD4+ activamente infectados por viriones de la segunda cepa.
- V_1^{PB} : concentración de viriones de la primer cepa con proteasa bloqueada.
- V_2^{PB} : concentración de viriones de la segunda cepa con proteasa bloqueada.
- V_1^{PNB} : concentración de viriones de la primer cepa con proteasa no bloqueada.
- V_2^{PNB} : concentración de viriones de la segunda cepa con proteasa no bloqueada.

Las ecuaciones del modelo son las siguientes:

$$\frac{dT}{dt} = s + pT \left(1 - \frac{T + T_2^* + T_1^* + T_2^{**} + T_1^{**}}{T_{\text{máx}}} \right) - \mu_T T - T(\theta_2^{RTI} k_2 V_{PNB}^2 + \theta_1^{RTI} k_1 V_{PNB}^1) \quad (3.18)$$

$$\frac{dT_1^*}{dt} = \theta_1^{RTI} k_1 V_{PNB}^1 T - \mu_T T_1^* - l_1 T_1^* \quad (3.19)$$

$$\frac{dT_2^*}{dt} = \theta_2^{RTI} k_2 V_{PNB}^2 T - \mu_T T_2^* - l_2 T_2^* \quad (3.20)$$

$$\frac{dT_1^{**}}{dt} = l_1 T_1^* - \mu_{T_1^{**}} T_1^{**} \quad (3.21)$$

$$\frac{dT_2^{**}}{dt} = l_2 T_2^* - \mu_{T_2^{**}} T_2^{**} \quad (3.22)$$

$$\frac{dV_1^{PB}}{dt} = \theta_1^{PI} q \mu_{T_1^{**}} n_1 T_1^{**} + \theta_2^{PI} (1 - q) \mu_{T_2^{**}} n_2 T_2^{**} - c_1 V_1^{PB} \quad (3.23)$$

$$\frac{dV_1^{PNB}}{dt} = (1 - \theta_1^{PI}) q \mu_{T_1^{**}} n_1 T_1^{**} + (1 - \theta_2^{PI}) (1 - q) \mu_{T_2^{**}} n_2 T_2^{**} - c_1 V_1^{PNB} \quad (3.24)$$

$$\frac{dV_2^{PB}}{dt} = \theta_2^{PI} q \mu_{T_2^{**}} n_2 T_2^{**} + \theta_1^{PI} (1 - q) \mu_{T_1^{**}} n_1 T_1^{**} - c_2 V_2^{PB} \quad (3.25)$$

$$\frac{dV_2^{PNB}}{dt} = (1 - \theta_2^{PI}) q \mu_{T_2^{**}} n_2 T_2^{**} + (1 - \theta_1^{PI}) (1 - q) \mu_{T_1^{**}} n_1 T_1^{**} - c_2 V_2^{PNB} \quad (3.26)$$

$$(3.27)$$

En la Tabla 3.3 se detalla el significado de la notación utilizada. Se mantuvo la distinción de parámetros de las cepas, incorporando los coeficientes l_1 y l_2 de las correspondientes tasas de activación de linfocitos latentemente infectados discriminados por cepa viral.

3.5. Modelo Matricial Multicepa

El modelo Matricial Multicepa es una versión generalizada del modelo anterior, donde en vez de contar con sólo dos cepas, este permite plantear un sistema con un número arbitrario de cepas. Siendo $M > 0$ la cantidad de cepas a modelar, el modelo cuenta con $1 + 4 * M$ poblaciones medidas en concentración:

- T : concentración de linfocitos T CD4+ sin infectar.
- T_i^L : concentración de linfocitos T CD4+ latentemente infectados por viriones de la cepa i .
- T_i^I : concentración de linfocitos T CD4+ activamente infectados por viriones de la cepa i .
- V_i^{PNB} : concentración de viriones de la cepa i con proteasa no bloqueada.
- V_i^{PB} : concentración de viriones de la cepa i con proteasa bloqueada.

Parámetro	Significado
s	Tasa de generación de nuevos linfocitos T a partir del timo y médula ósea.
$T_{\text{máx}}$	Población máxima posible de los linfocitos T CD4+ en total.
p	Tasa de proliferación de los linfocitos T CD4+.
k_2	Tasa de infección de linfocitos T CD4+ por viriones de la segunda cepa.
k_1	Tasa de infección de linfocitos T CD4+ por viriones de la primer cepa.
l_2	Tasa de conversión de linfocitos T CD4+ latentes a infectados por viriones de la segunda cepa.
l_1	Tasa de conversión de linfocitos T CD4+ latentes a infectados por viriones de la primer cepa.
μ_T	Tasa de muerte de linfocitos T CD4+ sin infectar y latentemente infectados.
$\mu_{T_2^*}$	Tasa de muerte de los linfocitos T CD4+ latentemente infectados por viriones de la segunda cepa.
$\mu_{T_1^*}$	Tasa de muerte de los linfocitos T CD4+ latentemente infectados por viriones de la primer cepa.
$\mu_{T_2^{**}}$	Tasa de muerte de los linfocitos T CD4+ activamente infectados por viriones de la segunda cepa.
$\mu_{T_1^{**}}$	Tasa de muerte de los linfocitos T CD4+ activamente infectados por viriones de la primer cepa.
q	$1 - q$ es la probabilidad de una mutación significativa.
n_2	Cantidad de viriones de la segunda cepa producidos por linfocito T CD4+ infectado.
n_1	Cantidad de viriones de la primer cepa producidos por linfocito T CD4+ infectado.
c_2	Tasa de muerte de viriones de la segunda cepa.
c_1	Tasa de muerte de viriones de la primer cepa.
θ_2^{PI}	Influencia de los inhibidores de proteasa en la segunda cepa.
θ_1^{PI}	Influencia de los inhibidores de proteasa en la primer cepa.
θ_2^{RTI}	Influencia de los inhibidores de transcriptasa inversa en la segunda cepa.
θ_1^{RTI}	Influencia de los inhibidores de transcriptasa inversa en la primer cepa.

Cuadro 3.3: Parámetros de las ecuaciones del modelo de Kirschner-Webb modificado con linfocitos latentes

donde $i = 1, \dots, M$.

Así, el modelo Matricial Multicepa con $M = 2$ es equivalente al modelo Kirschner Webb modificado con linfocitos latentes, y con $M = 1$ es equivalente al modelo Perelson, Nelson y De Boer.

Las ecuaciones del modelo son las siguientes:

$$\frac{dT}{dt} = s + rT \left(1 - \frac{T_{tot}}{T_{max}} \right) - \mu_T T - \sum_{j=1}^M \theta_j^{RTI} k_j^1 V_j^{PNB} T \quad (3.28)$$

$$\frac{dT_i^L}{dt} = \theta_i^{RTI} k_i^1 V_i^{PNB} T - \mu_T T_i^L - k_i^2 T_i^L \quad (3.29)$$

$$\frac{dT_i^I}{dt} = k_i^2 T_i^L - \delta_i T_i^I \quad (3.30)$$

$$\frac{dV_i^{PNB}}{dt} = \sum_{j=1}^M \theta_j^{PI} Q_{ij} N_j \delta_j T_j^I - c_i V_i^{PNB} \quad (3.31)$$

$$\frac{dV_i^{PB}}{dt} = \sum_{j=1}^M (1 - \theta_j^{PI}) Q_{ij} N_j \delta_j T_j^I - c_i V_i^{PB} \quad (3.32)$$

$$i = 1, \dots, M. \quad (3.33)$$

En la Tabla 3.4 se detalla el significado de la notación utilizada. La matriz \mathcal{Q} , representa las probabilidades de mutación entre las distintas cepas en el momento de replicación. Para ser consistente, se debe garantizar que

$$\sum_{i=1}^M Q_{ij} = 1 \quad \forall j = 1, \dots, M. \quad (3.34)$$

A su vez, dado que las probabilidades de mutación entre dos cepas son simétricas, se debe garantizar que

$$Q_{ij} = Q_{ji} \quad \forall i, j = 1, \dots, M. \quad (3.35)$$

Por simplicidad, se optó en las simulaciones utilizar la matriz \mathcal{Q} definida de la forma

$$Q_{ij} = \begin{cases} 1 - (M - 1)p & \text{para } i = j \\ p & \text{para } i \neq j \end{cases} \quad (3.36)$$

donde $p \ll 1$ es la probabilidad de aparición de una mutante durante el proceso de replicación. Por definición $0 \leq 1 - (M - 1)p$, por lo tanto asumimos que $p \leq \frac{1}{(M-1)}$.

3.6. Modelo Perelson Extendido Matricial

Este modelo surge a partir de la necesidad de modelar los efectos del Vorinostat, teniendo en cuenta que el proceso de activación es independiente del proceso de infección. En Perelson et al. [13] se proponía ignorar este proceso con motivo de simplificar el modelo, siendo la diferencia despreciable. Tomando en cuenta que el Vorinostat influye en la activación del proceso de replicación viral en forma discriminada al proceso de activación del linfocito T CD4+, surge la necesidad de independizar el proceso de infección y activación. De esta manera se puede representar el incremento en la producción de viriones de los linfocitos T CD4+ quiescentes infectados, así como la disminución de la tasa de replicación de linfocitos T CD4+ activos sin infectar.

Siendo $M > 0$ la cantidad de cepas a modelar, el modelo cuenta con $2 + 4 * M$ poblaciones medidas en concentración:

- T_Q : concentración de linfocitos T CD4+ sin infectar quiescentes.

Parámetro	Significado
M	Número de cepas distinguibles en el modelo.
T	Número de T CD4+ no infectados por unidad de volumen.
T_j^L	Número de T CD4+ no infectados por unidad de volumen, latentemente infectados por la cepa j
T_j^I	Número de T CD4+ no infectados por unidad de volumen, activamente infectados por la cepa j
T_{tot}	Número total de T CD4+ presentes por unidad de volumen $T_{tot} = T + \sum_{j=1}^M (T_j^L + T_j^I)$.
T_{max}	Número máximo de T CD4+ por unidad de volumen, según regulación del sistema inmune.
V_j^{PNB}	Número de viriones libres de la cepa j con proteasa no bloqueada.
V_j^{PB}	Número de viriones libres de la cepa j con proteasa bloqueada.
V_j	Número total de viriones libres de la cepa j presentes por unidad de volumen $V_j = V_j^{PNB} + V_j^{PB}$.
s	Tasa de generación de T CD4+ a partir del timo y médula ósea
r	Tasa máxima de crecimiento de la población T CD4+ no infectada.
μ_T	Tasa de mortalidad en la población T CD4+ no infectada.
k_j^1	Tasa de infección por la cepa j .
k_j^2	Tasa de activación de T CD4+ latentemente infectados por la cepa j .
δ_j	Tasa de clearance en la población de la cepa j .
c_j	Número medio de viriones liberados por célula T CD4+ infectada con la cepa j .
N_j	Número medio de viriones liberados por célula T CD4+ infectada con la cepa j .
Q_{ij}	Probabilidad de aparición de la cepa i , en la replicación de células infectadas por la cepa j .
θ_j^{RTI}	Influencia de los inhibidores de transcriptasa inversa de la cepa j .
θ_j^{PI}	Influencia de los inhibidores de proteasa de la cepa j .

Cuadro 3.4: Parámetros de las ecuaciones del Modelo Matricial Multicepa

- T_A : concentración de linfocitos T CD4+ sin infectar activos.
- T_i^{QI} : concentración de linfocitos T CD4+ quiescentes infectados por viriones de la cepa i .
- T_i^{AI} : concentración de linfocitos T CD4+ activos infectados por viriones de la cepa i .
- V_i^{PNB} : concentración de viriones de la cepa i con proteasa no bloqueada.
- V_i^{PB} : concentración de viriones de la cepa i con proteasa bloqueada.

donde $i = 1, \dots, M$.

Las ecuaciones del modelo son las siguientes:

$$\frac{dT_Q}{dt} = s_T - \mu_Q T_Q - \xi T_Q - \sum_{j=1}^M \theta_j^{RTI} \gamma_{Qj} V_j^{PNB} T_Q \quad (3.37)$$

$$\frac{dT_A}{dt} = \xi T_Q + r T_A \left(1 - \frac{T_{tot}}{T_{max}} \right) - \mu_A T_A - \sum_{j=1}^M \theta_j^{RTI} \gamma_{Aj} V_j^{PNB} T_A \quad (3.38)$$

$$\frac{dT_i^{QI}}{dt} = \theta_i^{RTI} \gamma_{Qi} V_i^{PNB} T_Q - \xi_i T_i^{QI} - \mu_{Qi} T_i^{QI} \quad (3.39)$$

$$\frac{dT_i^{AI}}{dt} = \theta_i^{RTI} \gamma_{Ai} V_i^{PNB} T_A + \xi_i T_i^{QI} - \mu_{Ai} T_i^{AI} \quad (3.40)$$

$$\begin{aligned} \frac{dV_i^{PNB}}{dt} &= \sum_{j=1}^M \theta_j^{PI} \mathcal{Q}_{ij} \left(N_{Qj} \mu_{QIj} T_j^{QI} + N_{Aj} \mu_{AIj} T_j^{AI} \right) \\ &\quad - (\gamma_{Qi} T_Q + \gamma_{Ai} T_A) V_i^{PNB} - c_i V_i^{PNB} \end{aligned} \quad (3.41)$$

$$\frac{dV_i^{PB}}{dt} = \sum_{j=1}^M (1 - \theta_j^{PI}) \mathcal{Q}_{ij} \left(N_{Qj} \mu_{QIj} T_j^{QI} + N_{Aj} \mu_{AIj} T_j^{AI} \right) - c_i V_i^{PB} \quad (3.42)$$

$$i = 1, \dots, M. \quad (3.43)$$

En la Tabla 3.5 se detalla el significado de la notación utilizada.

El término *activo* en este modelo hace referencia a que el linfocito T CD4+ está en proceso de división celular, y quiescente en caso contrario. Todas las poblaciones de linfocitos infectados están produciendo viriones, con tasas independientes, siendo N_{Qj} la cantidad media de viriones liberados por un linfocito quiescente infectado por la cepa j a lo largo de su vida, y N_{Aj} la cantidad media de viriones liberados por un linfocito activo de la misma cepa.

En este modelo se decidió también incorporar la disminución de viriones que infectan a los linfocitos, representado en el segundo término de la ecuación 3.41, que si bien se descartaron en los modelos anteriores por ser una población poco representativa, puede tener una influencia importante en el proceso infeccioso masivo bajo los efectos de la droga Vorinostat.

Parámetro	Significado
T_{max}	Número máximo de T CD4+ por unidad de volumen, según regulación del sistema inmune.
V_j	Número de viriones libres de la cepa j , por unidad de volumen.
s_T	Tasa basal de generación de T CD4+ en timo y médula ósea.
ξ	Tasa de activación de linfocitos no infectados en presencia de antígenos.
ξ_j	Tasa de activación de linfocitos infectados por la cepa j .
r	Tasa máxima de reproducción de linfocitos T CD4+ activados no infectados.
μ_Q	Tasa de mortalidad en linfocitos T CD4+ quiescentes no infectados.
μ_{QIj}	Tasa de mortalidad en linfocitos T CD4+ quiescentes infectados por la cepa j .
μ_A	Tasa de mortalidad en linfocitos T CD4+ activados no infectados.
μ_{AIj}	Tasa de mortalidad en linfocitos T CD4+ activados infectados por la cepa j .
γ_{Qj}	Tasa de infección de linfocitos quiescentes por viriones de la cepa j .
γ_{Aj}	Tasa de infección de linfocitos activados por viriones de la j .
c_j	Tasa de clearance en la población de viriones libres de la cepa j .
N_{Qj}	Número medio de viriones liberados por un linfocito T CD4+ quiescente infectado por la cepa j .
N_{Aj}	Número medio de viriones liberados por un linfocito T CD4+ activado infectado por la cepa j .
Q_{ij}	Probabilidad de aparición de la cepa i en la replicación de células infectadas por la cepa j .
θ_j^{RTI}	Influencia de los inhibidores de transcriptasa inversa de la cepa j .
θ_j^{PI}	Influencia de los inhibidores de proteasa de la cepa j .

Cuadro 3.5: Parámetros de las ecuaciones del Modelo Perelson Extendido Matricial

Parte III

Implementación de Software

Capítulo 4

Refactorizaciones y mejoras

En esta sección se revisan los cambios realizados en ViSi a partir de necesidades que se fueron identificando a lo largo del desarrollo de las simulaciones.

Las refactorizaciones realizadas durante este proceso mantuvieron la idea original de respetar los principios de diseño basados en SOLID ¹ y *Responsibility Driven Design* (RDD) ([18]), teniendo como objetivo principal facilitar la implementación de plugins para extender modelos que requieran mas complejidad.

El código fuente del proyecto se puede acceder desde el repositorio oficial (ver Ref. [2]), dispuesto en la carpeta `/src`.

4.1. Vectorización de parámetros del modelo

4.1.1. Necesidad

Cada parámetro de un modelo a simular, estaba declarado como atributo de la clase del solver, así como atributo de la clase del modelo. Esto obligaba al usuario a declarar en cada modelo nuevo los atributos tanto del solver como del estado, así como volver a implementar las funcionalidades básicas de logging, inicialización de variables, y actualización de valores del estado en cada paso de simulación.

Además, dentro de los atributos no quedaba una distinción clara sobre cuáles atributos son variables poblacionales, coeficientes del modelo o columnas adicionales (como por ejemplo total de linfocitos).

Se buscó simplificar la implementación de un modelo nuevo, reduciendo la duplicación de código.

4.1.2. Diseño previo

Si el usuario quisiera, a modo de ejemplo, implementar un modelo poblacional donde solamente exista una población T tal que $\frac{dT}{dt} = c$ para una constante c dada, éste debía implementar las clases como se muestra en la figura 4.1. Como se observa en las notas, al inicializar se cargaban los valores de los atributos de *State* uno por uno al vector *vars*, y luego en cada paso de simulación se actualizaban los valores del estado a partir del vector *vars*. A su vez se veía obligado a implementar los métodos de logging y lectura de valores de configuración utilizando cada atributo.

¹Acrónimo mnemónico de Single responsibility principle, Open-closed principle, Liskov substitution principle, Interface segregation principle and Dependency inversion principle (ver Ref. [17])

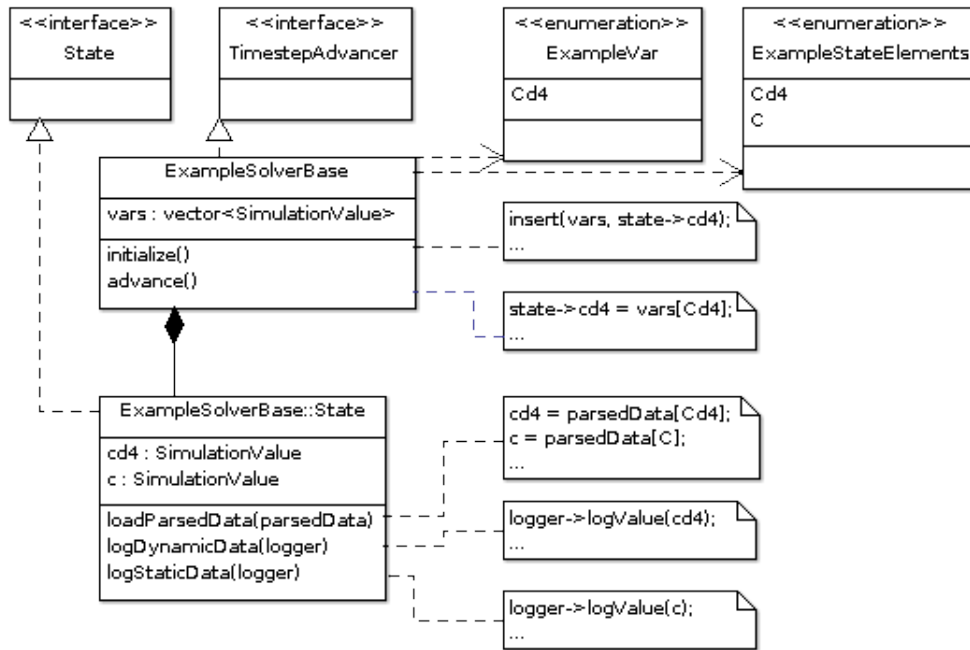


Figura 4.1: Diagrama de Clases de ejemplo, antes de refactorizar.

4.1.3. Refactorización propuesta

Se analizan y proponen los siguientes cambios:

- Los coeficientes solamente se manipulan desde **State**.
- Se manejan los coeficientes como vectores, discriminados en variables, constantes y adicionales.
- Se realiza una implementación parcial de **State**, que luego será extendida por los modelos implementados por el usuario.
- Se realiza una implementación genérica de los métodos de inicialización de solver, así como los métodos de carga de parámetros iniciales de configuración y logging.
- Los vectores estarán indexados por enumeraciones declaradas en el **State** del usuario, de manera que puedan ser extendidas en las clases derivadas.
- Se delega a la implementación del usuario la carga de los labels de logging.

4.1.4. Implementación

Como se puede observar en el diagrama de clases de la figura 4.2, se implemento una clase parcial de **State** llamada **StatePartialImplementation**. Los métodos mencionados se encargaron de recorrer los vectores para logging. Las 3 enumeraciones vacías se utilizaron como método de extensión de enumeraciones.

Los métodos `initializeDynamicIdentifiers` y `logStaticFields` permitieron mediante el patrón de diseño *Template Method* (ver Ref. [19]) implementar delegar la responsabilidad de cargar los labels de log, mientras que los valores se cargan en forma genérica en `StatePartialImplementation`.

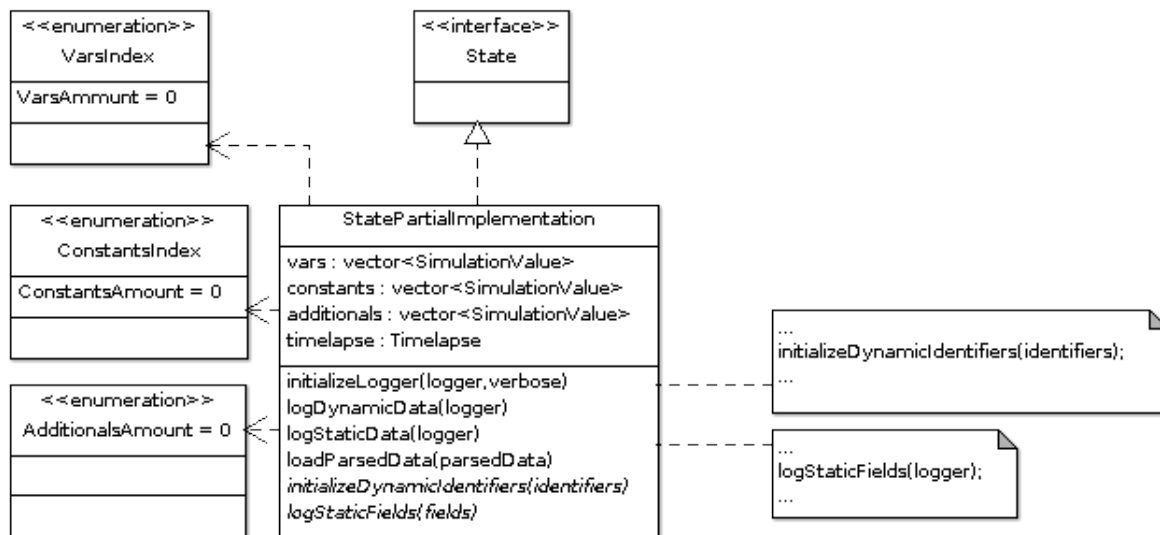


Figura 4.2: Diagrama de Clases de refactorización

En la figura 4.3 se puede observar como quedaría la implementación del ejemplo anterior ($\frac{dT}{dt} = c$) utilizando `StatePartialImplementation`. La versión final de `State` es la encargada de inicializar en su constructor a los vectores.

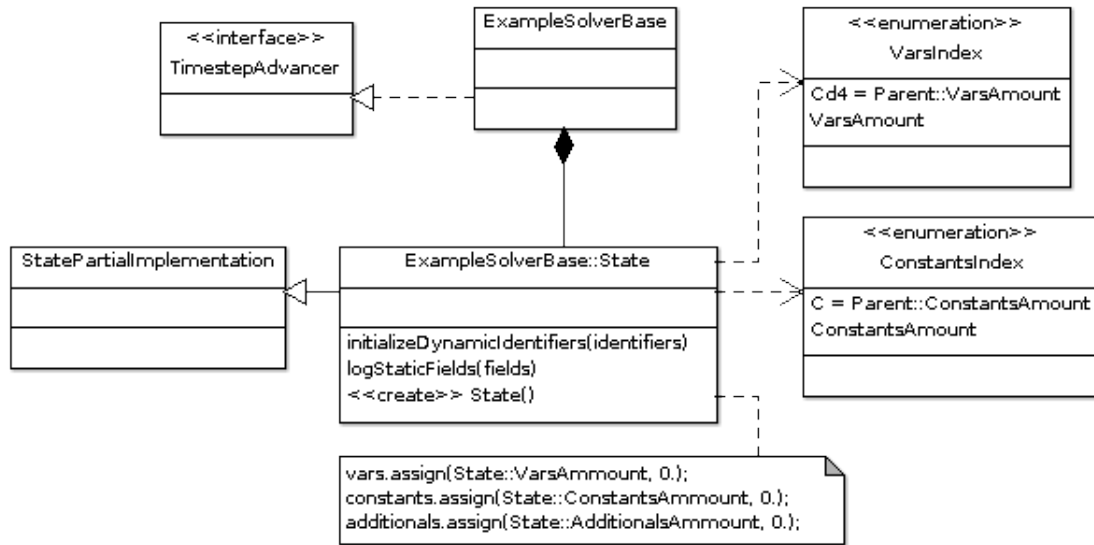


Figura 4.3: Ejemplo de implementación utilizando StatePartialImplementation

Refactorización de condiciones de terminación

Las condiciones de terminación utilizadas en los plugins están representados por las clases templatizadas basadas en `TerminationCondition` y `TerminationEventAction`.

En particular la clase `GenericTrespassingCondition` es una condición de terminación que toma como entrada:

- Una dirección `Direction`: Indica si la pendiente es ascendente o descendente. Sus valores posibles son `Up` o `Down`.
- Un umbral `Threshold`: Indica el valor umbral donde ocurrirá la condición.
- Un puntero a la instancia del estado.
- Un puntero a miembro de `State`: Indica el coeficiente que se va a controlar en la condición.

Este último (puntero a miembro), hace referencia a los parámetros de la simulación, que ahora pasaron a ser vectores. Esto llevó a reimplementar la condición de terminación para que considere el vector que se va a utilizar y el índice dentro de este, donde se encuentra alojado el coeficiente. Luego de la refactorización, la clase `GenericTrespassingCondition` quedó implementada de la siguiente forma:

```

template<class State>
class GenericTrespassingCondition :
    public ThresholdBasedCondition<ModelBasedCondition<State> >
{
public:
    typedef SimulationValue State::* StateMember;
private:
    const StateMember stateMember;
}

```

```

    virtual bool applies() const
    {
        return this->basicThresholdApplies(this->state->*stateMember);
    }
public:
    GenericTrespassingCondition(const typename ThresholdCondition::Direction dIn,
                               const typename ThresholdCondition::Threshold tIn,
                               State* s, StateMember m):
        ThresholdBasedCondition<ModelBasedCondition<State>>(dIn, tIn, s), stateMember(m) {}
};

```

4.2. Desacople de métodos numéricos

4.2.1. Necesidad

Para cada modelo a simular, se debían generar clases que lo extiendan para implementar el método virtual `advance()`, encargado de realizar un paso de simulación. Esto hacía que, si se utilizaba el mismo método que en otros modelos, se generase una duplicación de código innecesario dificultando el mantenimiento.

Por otro lado, cada vez que se necesitaba agregar datos derivados se debía recurrir a un método denominado *Curiously Recurring Template Pattern* (CRTP) (ver Ref. [20]), extendiendo con un template el estado para poder insertar los parámetros adicionales. Esto implicaba implementar también las funciones de logging y la actualización de parámetros en cada paso de simulación.

Por tanto, es necesario desacoplar los métodos numéricos de manera que sean reutilizables para cada modelo, y generar una forma simplificada de agregar datos derivados.

4.2.2. Diseño Previo

La figura 4.4 nos muestra la implementación previa a la refactorización, tomando como ejemplo un modelo llamado `ExampleSolverBase`, al que se le requiere incorporar un parámetro derivado `derivedVariable`. A su vez se extiende mediante dos clases que representan los métodos numéricos mayormente utilizados, basados en Runge Kutta [21]. La clase `ExampleSolverBaseError` calcula y actualiza en cada paso de simulación el error acumulado.

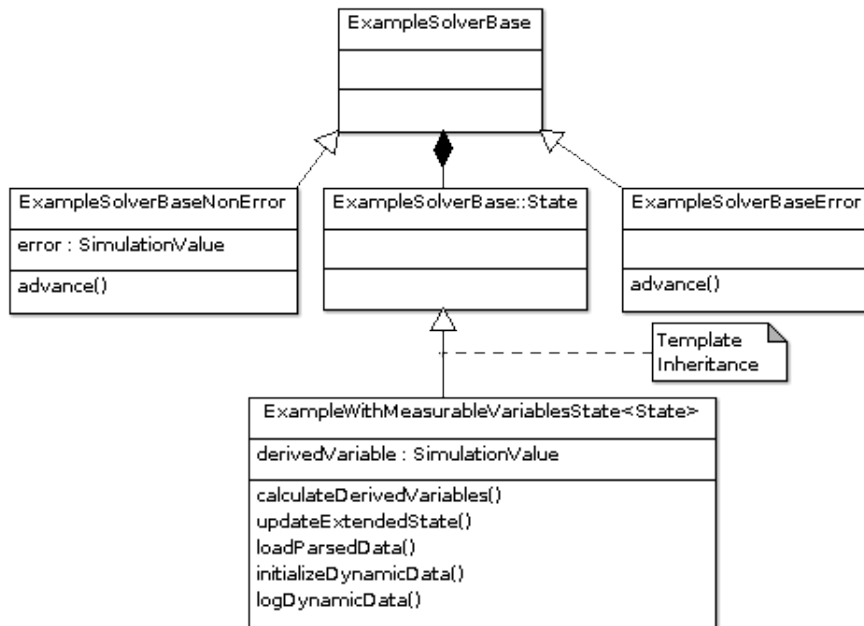


Figura 4.4: Ejemplo de implementación de métodos numéricos, antes de refactorizar.

4.2.3. Refactorización Propuesta

Para solucionar este problema se propone:

- Implementar una clase genérica templatizada para cada método numérico que permita extender cualquier Solver basado en `StatePartialImplementation`.
- Desplazar el parámetro de error para el método Runge Kutta con error al vector de adicionales de `State`.
- Delegar a cada Solver la responsabilidad de incorporar parámetros adicionales propios del modelo, mediante el método virtual `updateExtendedState`.

4.2.4. Implementación

En la figura 4.5 se puede observar la implementación que se realizó de los métodos numéricos. El parámetro `SolverBase` es el parámetro del template, de los cuales heredan `GenericSolverError` y `GenericSolverNonError`. En la clase `GenericSolverError` se implementó una extensión de `SolverBase::State`. En esta clase se agregó una columna adicional, que es inicializada en el constructor de `GenericSolverError`, y actualizada en el método `advance`.

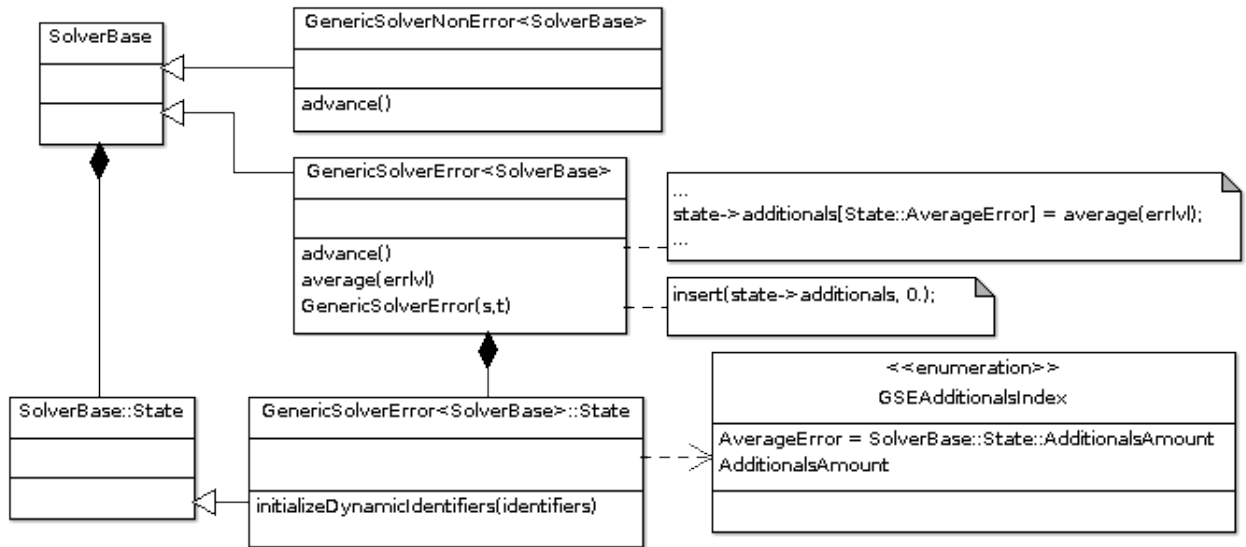


Figura 4.5: Implementación de templates para métodos numéricos

A modo de ejemplo, si deseásemos implementar el modelo `ExampleSolverBase` para cada método numérico simplemente declaramos:

```

ExampleSolverError = GenericSolverError<ExampleSolverBase>;
ExampleSolverNonError = GenericSolverNonError<ExampleSolverBase>;
  
```

Estos templates fueron implementados en un módulo aparte dentro de `Core`, denominado `GenericSolvers`.

4.3. Herramientas para subvectores y submatrices

4.3.1. Necesidad

Los métodos ofrecidos por la biblioteca `odeint` (ver Ref. [22]) para cálculo numérico de sistema de ecuaciones diferenciales utilizada en ViSi, trabaja utilizando una función o una clase funtorial que toma un vector que representa las variables de cada ecuación, otro vector que representa la función evaluada en cada ecuación y por último el tiempo. Esa función es la encargada de evaluar las funciones representadas en el sistema de ecuaciones diferenciales. En los métodos donde la cantidad de ecuaciones es fija, es directa su implementación. En cambio en el caso de los sistema de ecuaciones donde hay una cantidad parametrizada de ecuaciones, como lo son los modelos matriciales, es necesario representar todas las ecuaciones de manera simple en un solo vector, de manera que puedan operar de forma segura, garantizando que sea performante, dado que se sitúa en un lugar crítico de la simulación.

También, en el caso de los métodos matriciales, existe una matriz de mutabilidad Q , que corresponde a los parámetros constantes representados en un vector, por lo que es deseable poder manipular de forma simple esta matriz dentro del vector.

4.3.2. Refactorización propuesta

Dado que no existía una implementación previa que contemple este escenario se decide:

- Implementar clases templatizadas que permitan manipular subvectores.
- Estas clases deberán tener una implementación de clases constantes, para garantizar acceso de solo lectura en tiempo de compilación.
- Implementar una clase que permita manipular una submatriz.

4.3.3. Implementación

En la figura 4.6 se observa el diagrama de clases de las clases que se implementaron para manipulación de subvectores y submatrices. Las clases toman como parámetros de template el valor `Offset` que representa el desplazamiento dentro del vector contenedor y `Size` que representa la cantidad de elementos de `EmbeddedVectorT` y `EmbeddedMatrixT`, o la dimensión de una matriz cuadrada en el caso de `EmbeddedMatrixT`. La diferencia entre `EmbeddedVectorT` y `CEmbeddedVectorT` radica en que la referencia al vector contenedor es constante, de manera que esta clase garantiza que ningún elemento puede ser modificado en tiempo de compilación.

Si bien no se muestra en el diagrama por practicidad, la implementación del operador de indexación (`operator[]`) está implementado de manera sobrecargada, para poder ser utilizado como variable referenciada o como constante, según el contexto.

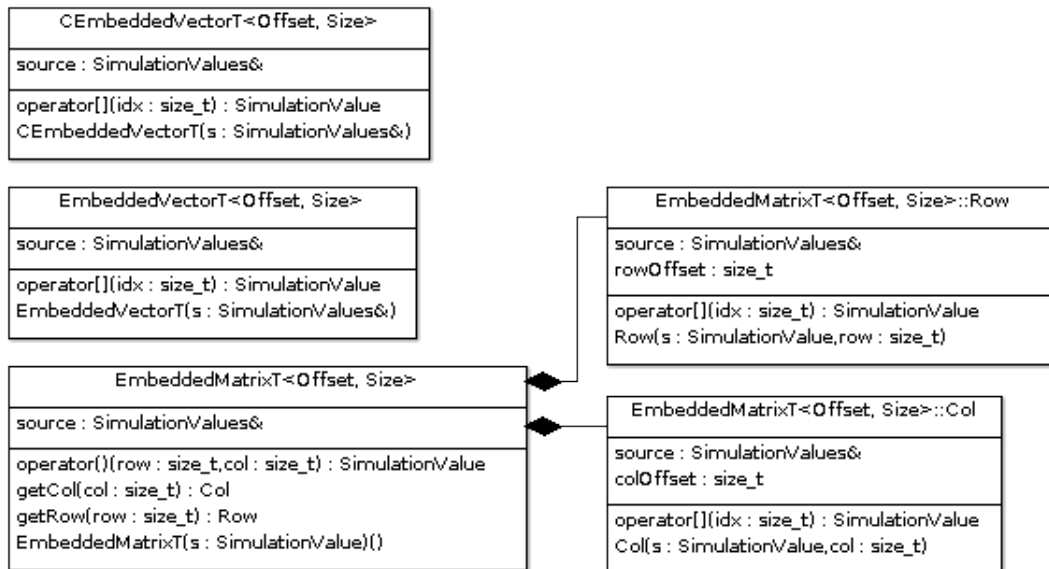


Figura 4.6: Diagrama de Clases de módulo VectorUtils

Se agruparon las clases en un módulo llamado `VectorUtils`, para ser utilizado en los modelos que lo necesiten.

4.4. Modificación de pasos de simulación dentro de una ejecución

4.4.1. Necesidad

La aplicación ViSi nos permite configurar como parámetro de ejecución el delta de tiempo entre pasos de simulación. Este valor permanecía constante durante toda la ejecución del proceso y no existía un mecanismo para poder cambiar los pasos de simulación entre llamadas al plugin. Esto era necesario en algunos escenarios como los de tratamiento con Vorinostat donde se deseaba, a partir de un umbral infeccioso, poder observar el progreso de las poblaciones con mayor granularidad temporal (de días a horas o minutos).

4.4.2. Diseño Previo

El parámetro de delta de tiempo entre pasos de simulación se declaraba desde los parámetros de entrada mediante la opción `-r`. Esta opción estaba implementada en la clase `BasicGenericPlugin`, que era extendida por los plugins definidos por el usuario. Como se puede observar en la figura 4.7, este parámetro era configurado en el método de inicialización del Plugin, quien se encargaba de crear las clases del `State` y el `Advancer`. Al crear el `advancer`, se inicializaba el atributo `timestep` que estaba protegido, por lo que no podía ser modificado por fuera de la clase.

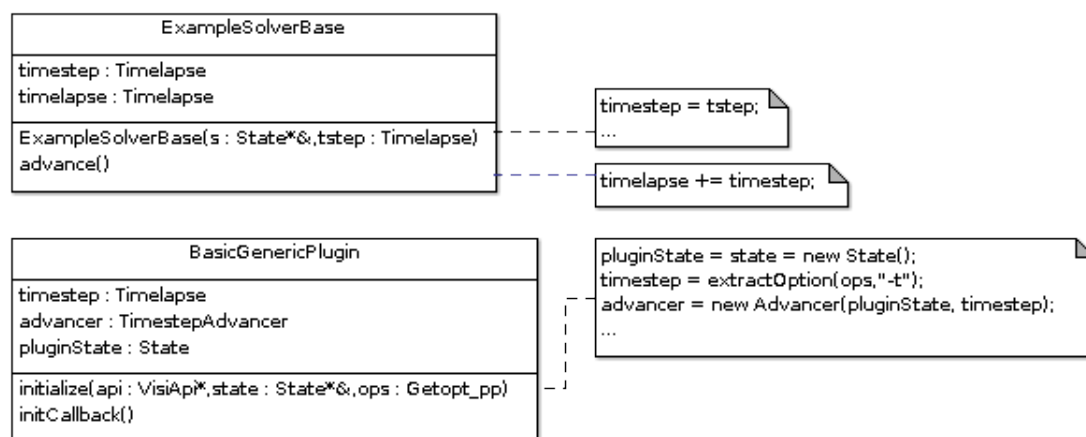


Figura 4.7: Clases que involucran timestep

El método `initCallback`, que se ejecutaba al terminar un evento, registraba la condición de terminación para logging, utilizando el atributo `timestep`. Este atributo, al estar protegido, podía ser modificado por los plugins que lo extienden, cambiando el delta de tiempo para logging, pero sin modificar el `timestep` que determinaba el delta de tiempo entre pasos de simulación.

4.4.3. Refactorización Propuesta

Para poder modificar el delta de tiempo entre pasos de simulación se propone desplazar los atributos `timestep` y `timedelta` de manera que sea accesible desde el plugin.

4.4.4. Implementación

La figura 4.8 muestra el resultado de la refactorización. Los atributos `timestep` y `timedelta` se situaron en la clase `StatePartialImplementation` y los pasos de simulación e inicialización se reescribieron en términos del estado.

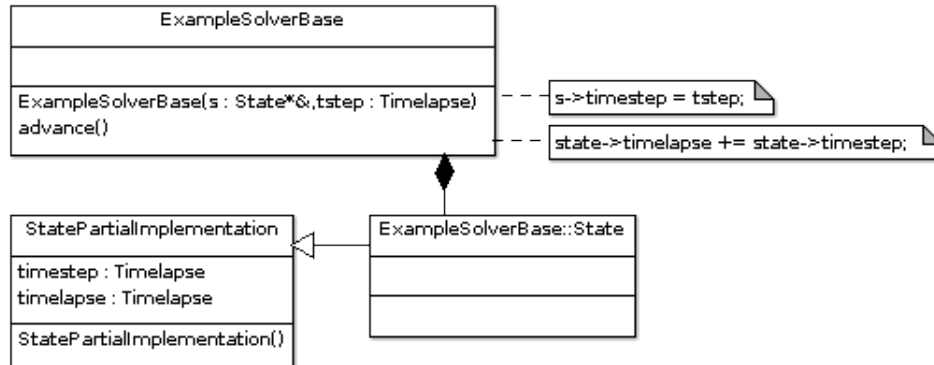


Figura 4.8: Refactorización de Timestep

Así, si deseáramos modificar el `timedelta` de los pasos de simulación desde algún callback de un plugin definido por el usuario se puede fácilmente cambiar, y este será independiente del `delta` de logging:

```
class ExamplePlugin: public BasicGenericPlugin<ExampleSolver, ExampleSolver::State>
{
    ...
public:
    customEventCallback()
    {
        ...
        statePlugin->timedelta = NEW_TIME_DELTA;
        timestep = NEW_LOGGING_TIME_DELTA;
        ...
    }
    ...
};
```

4.5. Otros

En esta sección se muestran algunas mejoras menores, sin necesitar un análisis de refactorización mayor.

4.5.1. Implementación de verbosity granular

Necesidad

Dado que la implementación del parámetro `verbosity` para logging estaba definida como un booleano, esto no posibilitaba la implementación de distintos niveles de logging. Esto se hacía necesario a medida que la cantidad de parámetros crecía considerablemente y se requería hacer observaciones precisas de logging según la granularidad de las poblaciones que se deseaban observar.

Implementación

Se modificó el parámetro de `verbosity` a entero positivo y la clase `StatePartialImplementation` de manera que desde la implementación de usuario de `State` se decida la granularidad de logging en función de este parámetro.

4.5.2. Fix de `CsvConfigFiler`

Necesidad

Los scripts auxiliares implementados en Python, utilizan una librería para manipulación del formato *Comma Separated Value* (CSV) (ver Ref. [23]) para elaborar programáticamente los parámetros de entrada de una simulación. Esta confecciona los archivos con este formato de manera compacta, sin dejar espacio entre los separadores de celdas.

Este formato no era reconocido por `CsvConfigFiler` debido a que el archivo, para ser reconocido por el parser, debía tener por lo menos un espacio luego de cada separador.

Implementación

Se declaró explícitamente el separador utilizando la clase `Separator` de la librería `mili`.

Capítulo 5

Modelos y Plugins

En esta sección se revisan los modelos y plugins implementados en ViSi, necesarios para realizar las simulaciones. El código fuente del proyecto se puede acceder desde el repositorio oficial (ver Ref. [2]), dispuesto en la carpeta `/src`.

5.1. Modelos

Se implementaron tres modelos en el desarrollo del proyecto, de los mencionados en el capítulo 3, representados por clases que extienden `TimeStepAdvancer` que son:

1. `KirchnerWebbLatentSolverBase`: Implementación del Modelo Kirschner Webb Modificado con incorporación de linfocitos latentes (Secc. 3.4).
2. `MatricialMultistrainSolverBase`: Implementación del Modelo Matricial Multicepa (Secc. 3.5).
3. `PerelsonExtendedMatricialSolverBase`: Implementación del Modelo Perelson Extendido Matricial (Secc. 3.6).

Las tres clases fueron implementadas haciendo uso de las refactorizaciones anteriormente mencionadas como se mostró en el ejemplo de la figura 4.3. En los solvers matriciales se hizo uso de las herramientas mencionadas en la sección 4.3.

5.2. Plugins

Se implementaron tres tipos de plugin diferentes, con el objetivo de generar un conjunto de escenarios de las simulaciones utilizadas en el proyecto. A continuación se detallan estos y los modelos en que fueron implementados.

5.2.1. SimplePlugin

Este tipo de plugin es el correspondiente a una simulación simple, donde los parámetros iniciales del modelo no son afectados. Este toma como parámetros los básicos necesarios para todo plugin, que son:

- `temporalResolution`: Tiempo entre cada paso de simulación en días.
- `maximumTime`: Tiempo máximo de simulación en días.

En la figura 5.1 se puede observar el diagrama de estado de `SimplePlugin`. La flecha de transición ocurre instantáneamente en términos del tiempo de simulación del modelo. En la etiqueta de la flecha de transición, la izquierda de la barra se describe la condición de transición, y a la derecha las modificaciones o acciones que se realizan en el estado del modelo. El coeficiente t representa el tiempo de simulación total.

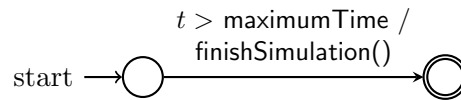


Figura 5.1: Diagrama de estados de `SimplePlugin`

Este plugin fue implementado para los tres solvers mencionados en la sección anterior.

5.2.2. CombinatoryTherapyPlugin

Este tipo de plugin fué realizado previamente en el Trabajo Especial de Licenciatura de Pablo Oliva y Leandro Ramos [1]. En este trabajo se implementa el mismo plugin para los solvers `KirchnerWebbLatentSolverBase` y `MatricialMultistrainSolverBase` con dos cepas. Tiene como finalidad la simulación de escenarios de tratamiento combinatorio utilizando un inhibidor de retrotranscriptasa y un PI, en distintas fases del paciente, teniendo dos cepas virales independientes.

Este plugin toma como parámetros de entrada los parámetros:

- `temporalResolution`: Tiempo entre cada paso de simulación en días.
- `maximumTime`: Tiempo máximo de simulación en días.
- `firstThreshold`: Umbral de conteo de linfocitos mínimo para empezar el primer tratamiento.
- `newValue1`: Coeficiente de efectividad de el primer tratamiento.
- `secondThreshold`: Umbral de conteo de linfocitos mínimo para empezar el segundo tratamiento.
- `antiviralEffectTime`: Tiempo que transcurre antes de empezar a controlar el segundo umbral.
- `newValue2`: Coeficiente de efectividad de el segundo tratamiento.
- `rTIFirst`: Valor booleano que indica si se aplica primero el RTI y luego el PI, o al revés.

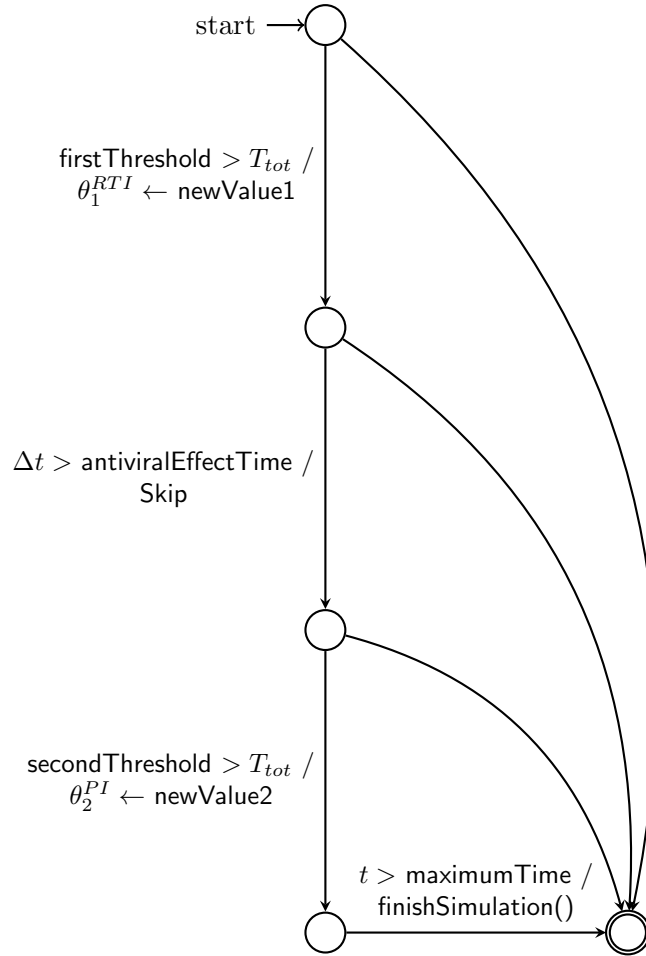


Figura 5.2: Diagrama de estados de `CombinatoryTherapyPlugin`, con `rTiFirst` \leftarrow `True`

En la figura 5.2 se puede observar el diagrama de estado de `CombinatoryTherapyPlugin`. El coeficiente Δt representa el tiempo transcurrido desde que sucedió la transición anterior.

5.2.3. `ErradicationTherapyPlugin`

Este plugin está implementado para los solvers matriciales, y tiene como objetivo simular escenarios de tratamiento con Vorinostat, conjuntamente con un RTI.

Este plugin toma como entrada los parámetros:

- `temporalResolution`: Tiempo entre cada paso de simulación en días.
- `maximumTime`: Tiempo máximo de simulación en días.
- `firstThreshold`: Umbral de conteo de linfocitos mínimo para empezar el tratamiento con un RTI.
- `rTiValue`: Coeficiente de efectividad del RTI.
- `secondThreshold`: Umbral de conteo de linfocitos mínimo para empezar el segundo tratamiento.
- `antiviralEffectTime`: Tiempo que transcurre antes de empezar a controlar el segundo umbral.

- `actFactor`: Coeficiente de efectividad del Vorinostat.
- `actEffectTime`: Tiempo que transcurre antes de retirar el tratamiento con Vorinostat.

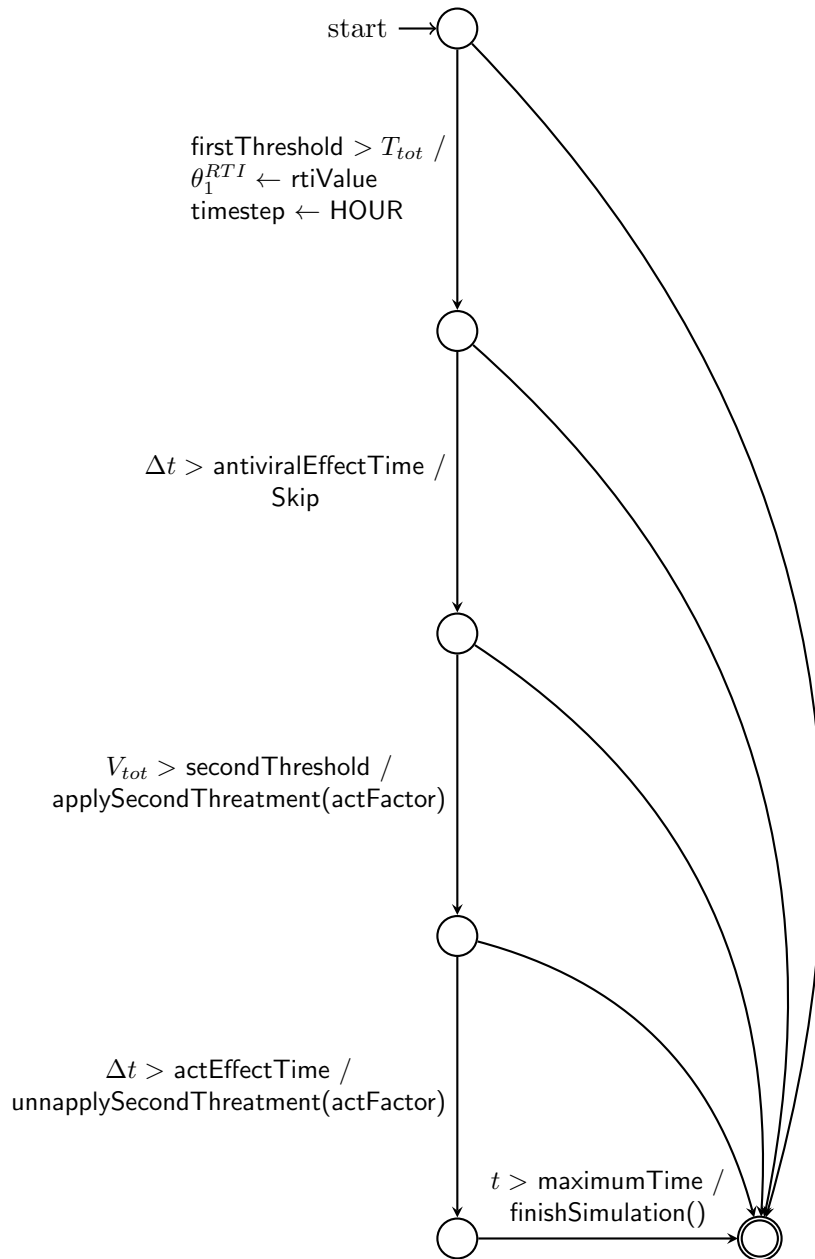


Figura 5.3: Diagrama de estados de `ErradicationTherapyPlugin`

En la figura 5.3 se observa el diagrama de estados de `ErradicationTherapyPlugin`. Las funciones `applySeconThreatment` y `unnaplySecondThreatment` varían según el solver que se utilicen. La descripción detallada de las modificaciones que realizan en los coeficientes del modelo para estas funciones se pueden observar en las subsecciones 6.1.2 y 6.2.2.

Parte IV

Resultados

Capítulo 6

Experimentos

6.1. Modelo Matricial Multicepa

6.1.1. Terapia Combinatoria

Basados en el experimento 9 del Trabajo Especial de Licenciatura de Pablo Oliva y Leandro Ramos [1], se realizó una simulación con el propósito de observar el impacto de incorporar la consideración de linfocitos T CD4+ latentemente infectados en los tiempos de infección. En este experimento, se avanza la simulación hasta que la población total de linfocitos T CD4+ (T_{tot}) cae por debajo de un umbral. En este punto, se simula la administración de un PI con una efectividad del 80%. Dado que el modelo no tiene en cuenta la farmacocinética de la dosis aplicada, se asume una concentración constante. Luego se continúa la simulación hasta que T_{tot} vuelve a caer bajo el umbral. Cuando esto sucede, se aplica un RTI con una efectividad del 80%.

La simulación se realiza hasta un período de 6 años, momento en el cual convergió a su estado estable no infectado. Para la primera simulación se utilizó como umbral la cantidad de 900 linfocitos por mm^3 ; para la segunda, 870 linfocitos por mm^3 . Se utilizaron dos cepas en esta simulación, siendo una resistente al RTI la primera, y resistente al PI la segunda.

Resultados preliminares de estas simulaciones fueron presentadas en el 3er. Congreso Argentino de Bioinformática y Biología Computacional¹.

Resultados

En la figura 6.1 se pueden observar los resultados de la simulación. Se puede observar como, en ambas simulaciones, la cantidad de viriones de la cepa resistente al PI (strain 2) se incrementa con retardo dado que su tasa de infección es menor.

¹3CAB2C llevado a cabo los días 26, 27 y 28 de Septiembre de 2012 en Oro Verde, Entre Ríos, Argentina. Ver <http://bioingenieria.edu.ar/eventos/bioinformatica2012/>

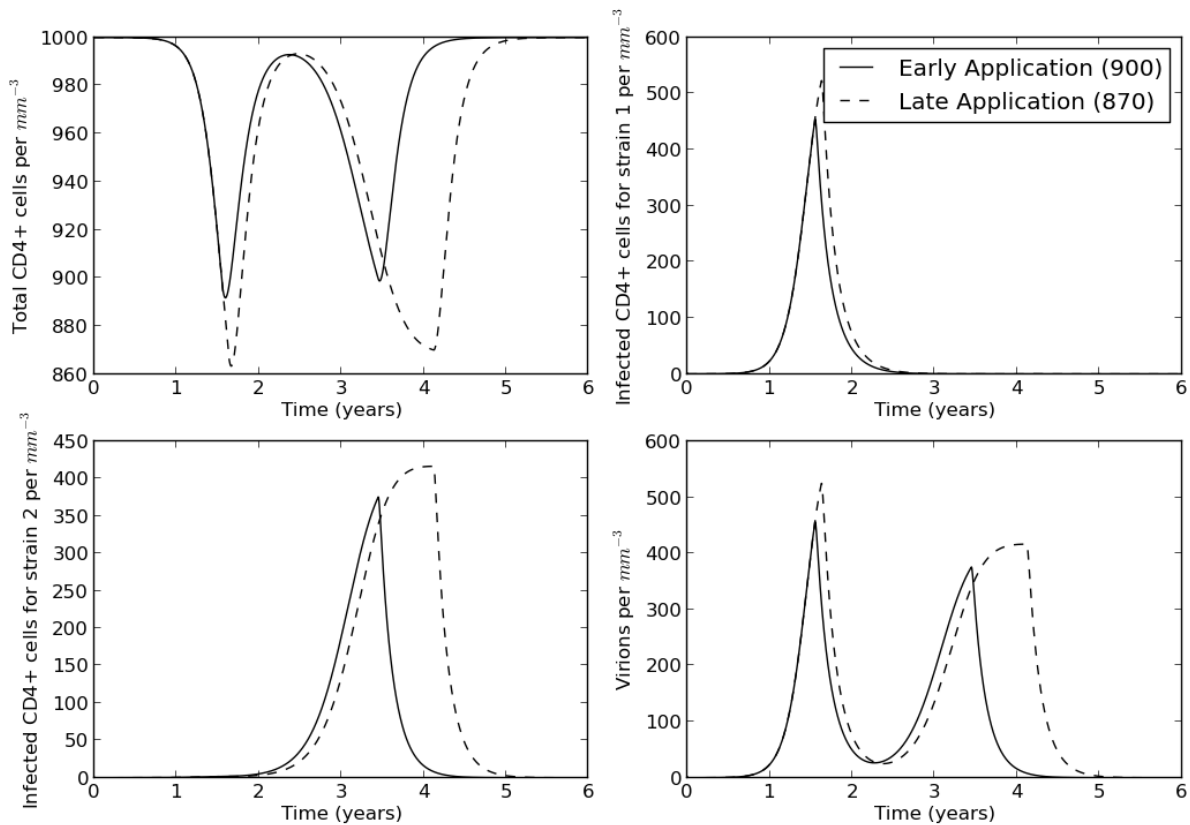


Figura 6.1: Poblaciones de terapia combinatoria RTI PI con modelo matricial en dos cepas.

Conclusiones

Si bien la incorporación de la población de linfocitos T CD4+ latentemente infectados aporta en el retardo del fallo virológico, el umbral necesario para tener un efecto de resistencia en términos de años fue elevado, distando de los umbrales reales utilizados para el diagnóstico de un fallo virológico. Esto se debe a que el estado endémicamente infectado estable es demasiado elevado luego del primer tratamiento, haciendo que el segundo umbral nunca se alcance en caso de utilizar umbrales inferiores a 870 linfocitos por mm^3 . 3.2.2.

6.1.2. Eliminación de la infección con Vorinostat

En un primer intento de simular el efecto del Vorinostat en un tratamiento, se realizó la siguiente simulación utilizando una sola cepa viral. En este experimento, se avanza la simulación hasta que la población total de linfocitos T CD4+ (T_{tot}) cae por debajo de un umbral. A partir de este momento se aplica un tratamiento con un RTI. De aquí en adelante se distinguen dos simulaciones. En una solamente se mantiene el tratamiento con el inhibidor de retrotranscriptasa, y en la segunda además se administra Vorinostat durante 10 días. La aplicación de Vorinostat se interpretó con las siguientes modificaciones en los coeficientes del modelo:

- Se disminuye un 90% la tasa de crecimiento de los linfocitos T CD4+ sanos (r), tomando en cuenta que para replicarse las células necesitan tener el ADN empaquetado, efecto menguado por la droga.

- Se aumenta un 350 % la tasa de activación de linfocitos T CD4+ latentemente infectados (k_i^2). Esto se modificó dado que el Vorinostat permite que el ADN que está empaquetado se relaje permitiendo la transcripción para generar ARN.
- Se aumenta un 350 % la tasa de *clearance* de linfocitos T CD4+ activamente infectados (k_i^2). Esto se tuvo en consideración debido a que al aumentar la activación de linfocitos T CD4+ latentemente infectados, estos pasan a tener menos expectativa de vida.

Los pasos de simulación a partir del umbral donde se aplica el RTI son de 1 hora.

Resultados

En la figura 6.2 se pueden observar los resultados de la simulación, a partir de la aplicación del RTI.

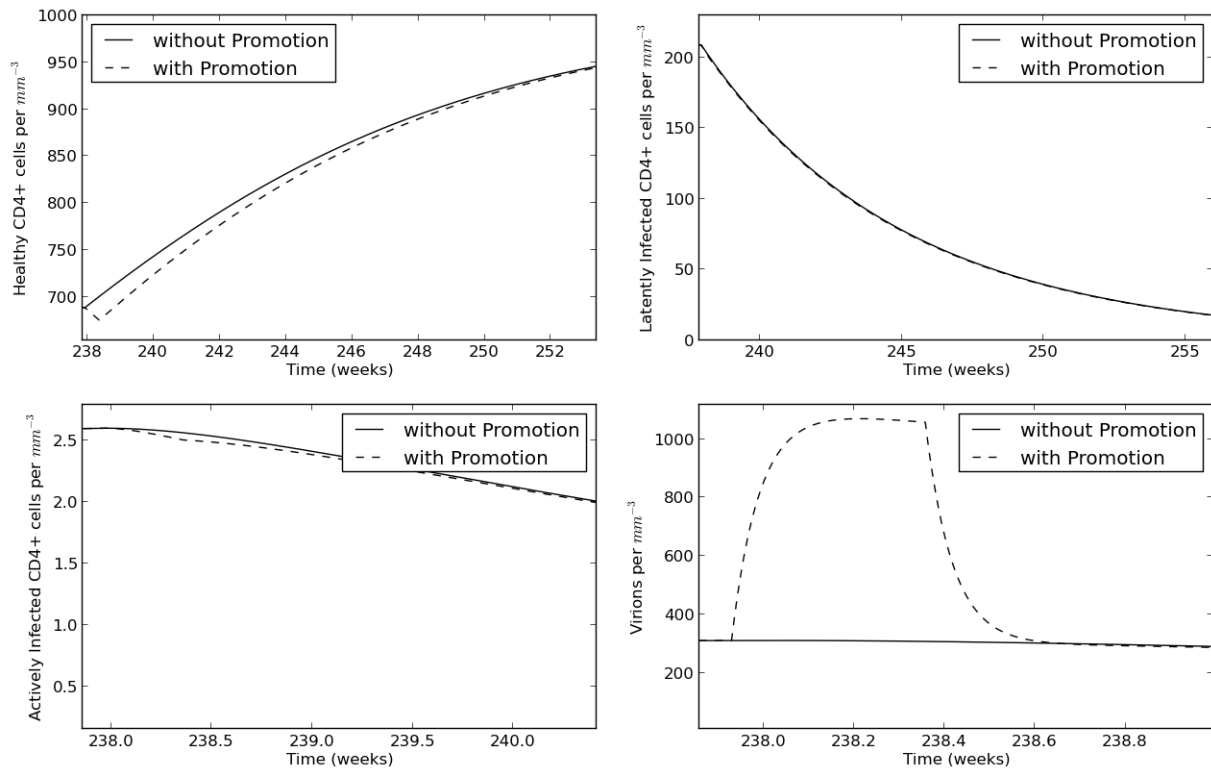


Figura 6.2: Poblaciones de terapia con Vorinostat, utilizando el modelo matricial en una cepa.

Conclusiones

A pesar de las modificaciones realizadas en los coeficientes, el modelo Matricial no es suficiente para describir los efectos del Vorinostat en la promoción de linfocitos.

6.2. Perelson Extendido Matricial

6.2.1. Sin tratamiento

En este experimento, se procede a simular por un lapso de 5 años el modelo de Perelson Extendido Matricial, siguiendo coeficientes similares a los del modelo Perelson et al. [13], en

ausencia de tratamiento.

Resultados

En la figura 6.3 se pueden observar los resultados de la simulación.

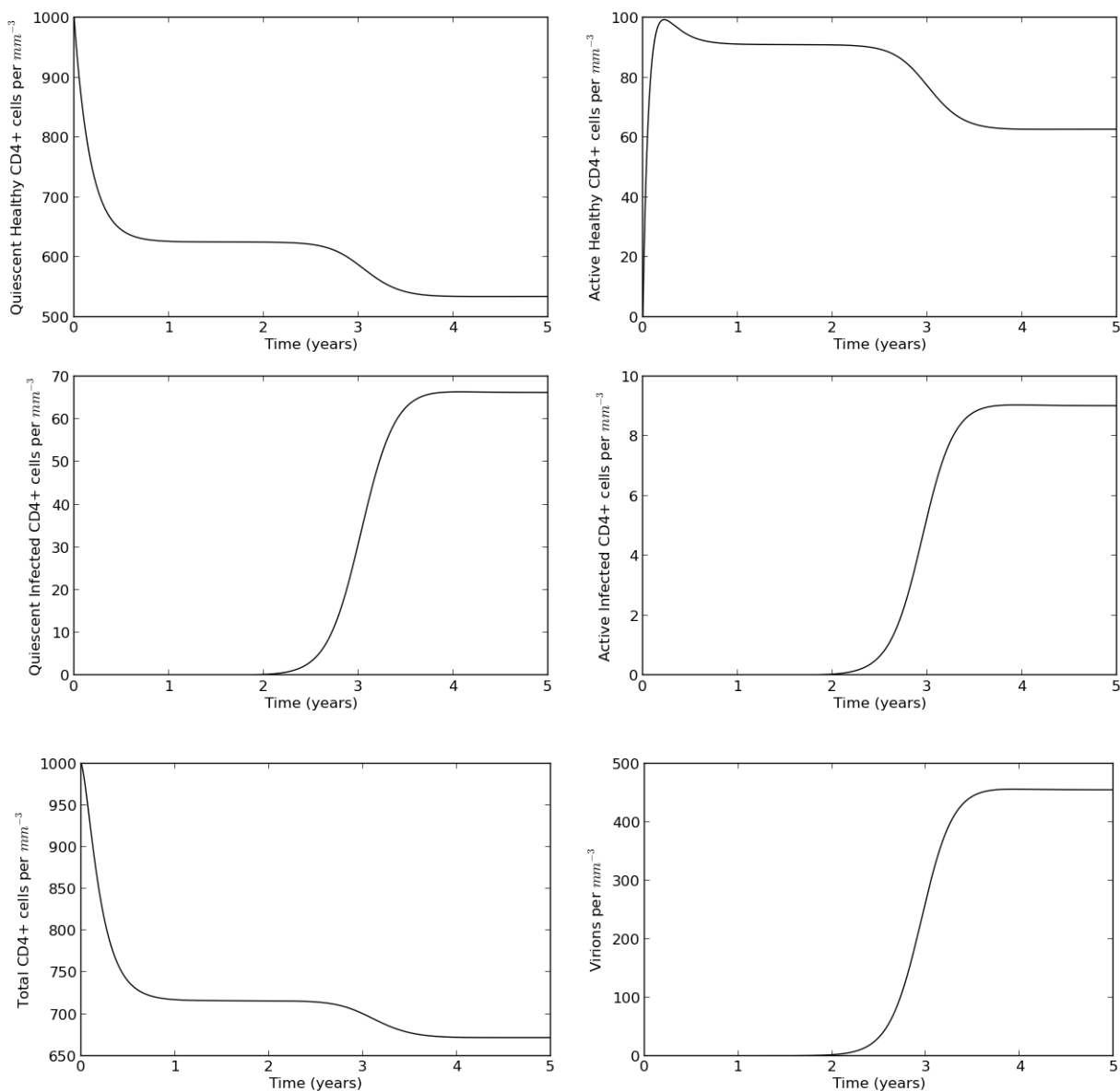


Figura 6.3: Poblaciones de Perelson Extendido Matricial con una cepa sin tratamiento

Conclusiones

En este modelo se puede observar una meseta estacionaria de aproximadamente dos años en los linfocitos sanos, para los que luego hay un incremento importante de producción viral que lleva al estado endémicamente infectado. Se observa, basándose en esta simulación, que los estados estables son diferentes a los obtenidos al modelo planteado en Perelson et al. [13].

6.2.2. Eliminación de la infección con Vorinostat

En un segundo intento de simular el efecto del Vorinostat en un tratamiento, se realizó la siguiente simulación. En este experimento, se avanza la simulación hasta que la población total de linfocitos T CD4+ (T_{tot}) cae por debajo de un umbral. A partir de este momento se aplica un tratamiento con un RTI. De aquí en adelante se distinguen dos simulaciones. En una solamente se mantiene el tratamiento con el inhibidor de retrotranscriptasa, y en la segunda además se administra Vorinostat durante 1 año. La aplicación de Vorinostat se interpretó con las siguientes modificaciones en los coeficientes del modelo:

- Se aumenta la producción media de viriones de un T CD4+ quiescente infectado (N_Q) igualando la producción media de viriones de un T CD4+ activo infectado (N_A). Esto se modificó dado que el Vorinostat permite que el ADN que está empaquetado se relaje permitiendo la transcripción para generar ARN.
- Se aumenta la tasa de muerte de T CD4+ Quiescentes Infectados (μ_{QI}) igualando la tasa de muerte de T CD4+ Activos Infectados (μ_{AI}). Esto se tuvo en consideración debido a que al aumentar la producción de viriones de los T CD4+ quiescentes infectados, estos pasan a tener menos expectativa de vida.
- Se disminuye un 90% la tasa de replicación de T CD4+ Activos sanos (r), tomando en cuenta que para replicarse las células necesitan tener el ADN empaquetado, efecto menguado por la droga.
- Las tasas de activación (ξ , ξ_1) no se alteraron.

Luego del año de tratamiento, en la simulación, se revierten los coeficientes de la aplicación de Vorinostat mencionados a sus valores originales.

Resultados

En la figura 6.4 se pueden observar los resultados de la simulación, a partir de la aplicación del RTI. Los quiebres observados en la figura a partir del año de tratamiento corresponden al efecto de suprimir el tratamiento con vorinostat.

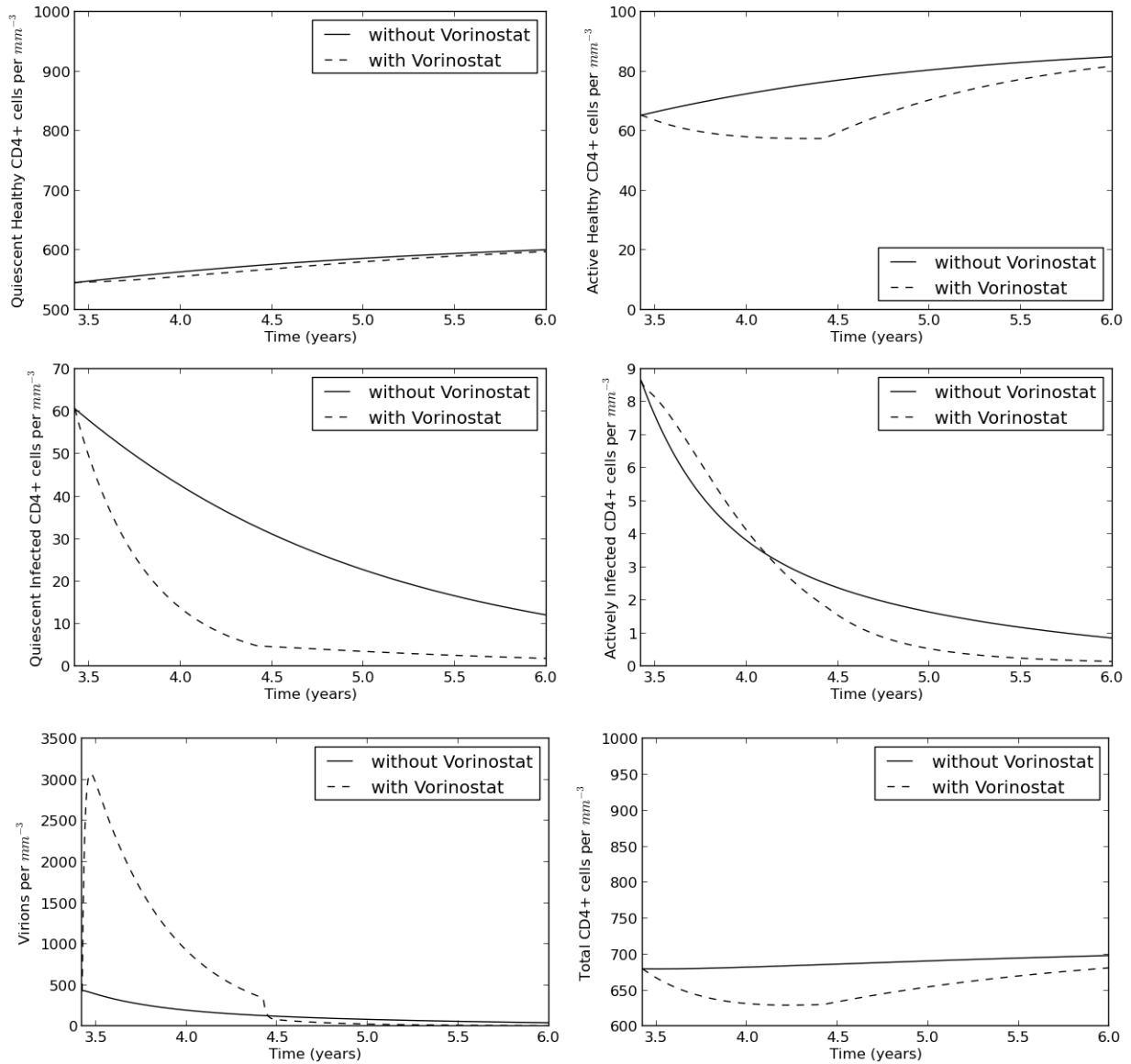


Figura 6.4: Poblaciones de terapia con Vorinostat, utilizando el modelo Perelson Extendido Matricial con una sola cepa

Conclusiones

Si bien los parámetros considerados en la simulación no corresponden a un tratamiento realista, debido a que las concentraciones de viremia alcanzados son mortales, se logró generar un escenario en el cual el aporte del Vorinostat por un intervalo de tiempo acelera el proceso de estabilización hacia el estado estable no infectado en un paciente bajo tratamiento con un RTI.

Capítulo 7

Conclusiones

Este trabajo surge como una continuación del proyecto iniciado por Leandro Ramos y Pablo Oliva, a partir de la necesidad de disponer de un primer banco de pruebas, previo a las pruebas *in vitro*, para evaluar terapias antivirales en el tratamiento de la infección por VIH.

Una de las ideas iniciales de este trabajo era la de lograr implementar un modelo capaz de discriminar una cantidad arbitraria de cepas virales para así generar una interconexión entre las cepas resistentes conocidas para cada antirretroviral existente. Esto último se vio interrumpido debido a que los modelos se presentaban aún muy simplificados y la computación de cepas resistentes presentaba algunos inconvenientes conceptuales y manejo combinatorio de resistencias en órdenes de magnitud poco manejables. Sin embargo se sentaron las bases para el manejo de múltiples cepas de forma exitosa, con una generalización razonable mediante el Modelo Matricial Multicepa.

El modelo Kirschner Webb Modificado con incorporación de linfocitos latentes fue un modelo intermedio realizado con el fin de analizar el impacto de un reservorio de linfocitos latentes, que fue presentado en el 3^{er} Congreso Argentino de Bioinformática y Biología Computacional, llevado a cabo los días 26, 27 y 28 de Septiembre de 2012 en Oro Verde, Entre Ríos, Argentina.

Luego de esto se decidió aplicar los modelos al problema concreto de simular los efectos de un tratamiento experimental utilizando la droga Vorinostat, que determinó finalmente el modelo Perelson Extendido Matricial. Si bien este modelo todavía no logra manifestar un comportamiento razonable de las concentraciones virales y de linfocitos, logra modelar el efecto esperado de la droga, que refuerza el modelo conceptual planteado por los expertos, donde la rápida activación de linfocitos induce a un estado de viremia elevado que permite al antirretroviral actuar de forma efectiva acelerando el proceso de cura.

De todas maneras las simulaciones no son concluyentes y es necesario la incorporación de mas parámetros reales obtenidos *in vitro* para ajustar los coeficientes, así como la revisión de factores determinantes en este proceso para la reafirmación del éxito de un tratamiento de alto riesgo para el paciente como lo es el tratamiento con Vorinostat.

Una de las observaciones que se puede extraer en la experiencia de lo realizado en este proyecto es que la dificultad mas grande de modelar un tratamiento es la falta de información concerniente a las métricas de los procesos internos que, dado que son difíciles de observar y mucho mas aún de medir, obligan a inducir coeficientes a modo provisorio en función de tener coherencia con el comportamiento que se desea simular, pero no permiten conclusiones suficientemente sólidas para ser llevadas a cabo en un paciente real.

A pesar de esto, el modelado de tratamientos permite dar un sustento a las conjeturas presentes sobre el proceso infeccioso y escenarios de tratamientos, mostrando que existe una representación correcta y coherente de este.

Capítulo 8

Trabajo Futuro

8.1. Consideración de nuevos modelos

Existen varias mejoras posibles a los modelos presentados en este trabajo, para representar con mas riqueza fenómenos característicos del proceso de replicación del virus, que pueden ser factores determinantes de un tratamiento exitoso. A continuación se enumeran algunas de ellas:

- Modelado de la expansión y contracción programada de las células latentemente infectadas en el proceso de activación por presencia de otros antígenos, con el objetivo de representar los saltos virales observados en el estado de latencia [24].
- Incorporación de población de viriones absorbidos por eritrocitos para tener en cuenta su influencia en el proceso infeccioso.
- Incorporación de población de células dendríticas como presentadoras del antígeno, para describir el proceso infeccioso en la fase temprana.
- Incorporación de otras células infectables por el VIH como son los macrófagos y células de memoria, con el objetivo de analizar reservorios conservados a largo plazo [25].
- Modelado de los distintos tejidos como compartimentos y la capacidad de traslación de los viriones por algún medio de transporte entre estos.
- Modelado del deterioro del sistema linfático, y su influencia en el aporte basal de linfocitos al sistema.

Además de las mejoras posibles a los modelos existe la necesidad de revisar, ajustar y mejorar los valores actualmente utilizados en los modelos, a partir de nuevas observaciones realizadas en laboratorios, seguimiento de sujetos infectados o análisis matemático de estos.

8.2. Mejoras de Software

8.2.1. Performance

A medida que los modelos van incorporando mas cepas virales la demanda de memoria y el tiempo de procesamiento aumenta, por lo que será vital generar mejoras para hacer el simulador mas performante. Para esto es necesario optimizar el manejo de la matriz de mutación Q , de manera que no demande mucho espacio de memoria y sea eficiente. A su vez se pueden implementar mejoras en el manejo de las herramientas de subvectores y submatrices para ser optimizadas en tiempo de compilación mediante el uso de *Expression Templates*.

8.2.2. Paralelización

Una mejora necesaria para ViSi es la posibilidad de que los plugins generen múltiples escenarios de simulación, que sean capaces de ejecutarse en paralelo. Esto reducirá el tiempo de procesamiento, permitiendo la interacción con plugins mas complejos que funcionen como agentes de otra aplicación que simule escenarios terapéuticos.

8.2.3. Accesibilidad

Actualmente la aplicación es utilizada mediante scripts bajo una terminal Linux. Esto dificulta el acceso a profesionales expertos en otras áreas, como Virología o Infectología, no familiarizados con el entorno o que por motivos diversos hacen uso de otras plataformas. Una mejora necesaria es la compatibilidad con otros sistemas operativos, y la implementación de una interfaz gráfica amigable para la ejecución de plugins, configuración de parámetros de entrada y exportación y análisis de los resultados.

Bibliografía

- [1] Leandro Ezequiel Ramos and Pablo Miguel Oliva. ViSi: Simulador extensible de la infección por VIH. Master's thesis, FaMAF - UNC, Córdoba, Argentina., Septiembre 2012. In collaboration with FuDePAN.
- [2] Leandro Ramos, Pablo Oliva, Francisco Herrero, and Gustavo Ojeda. ViSi FuDePAN virus simulator source code, 2012. URL <https://code.google.com/p/visi/>.
- [3] David Baltimore. Expression of animal virus genomes. *Bacteriological Reviews*, 35(3): 235–241, 1971. URL <http://mbr.asm.org/content/35/3/235.long>.
- [4] Freed E. Hiv-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. *Virology*, 1(251):1–15, 1998.
- [5] Stuart Turville, John Wilkinson, Paul Cameron, Joanne Dable, and Anthony L. Cunningham. The role of dendritic cell c-type lectin receptors in hiv pathogenesis. *Journal of Leukocyte Biology*, 74(5):710–718, 2003.
- [6] Andres Peralta Godoy and Ezequiel S. Velez. Generación de recomendaciones para terapias antivirales del vih. Master's thesis, FaMAF - UNC, Córdoba, Argentina., 03 2011. In collaboration with FuDePAN.
- [7] Chun TW, Carruth L, Finzi D, Shen X, DiGiuseppe JA, Taylor H, Hermankova M, Chadwick K, Margolick J, Quinn TC, Kuo YH, Brookmeyer R, Zeiger MA, Barditch-Crovo P, and Siliciano RF. Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in hiv-1 infection. *Nature*, 387(6629):183–188, May 1997.
- [8] Insights into the reasons for discontinuation of the first highly active antiretroviral therapy (HAART) regimen in a cohort of antiretroviral naive patients. I.CO.N.A. Study Group. Italian Cohort of Antiretroviral-Naive Patients. *AIDS*, 14:499–507, March 2000.
- [9] Richman DD, Margolis DM, Delaney M, Greene WC, Hazuda D, and Pomerantz RJ. The challenge of finding a cure for hiv infection. *Science*, 323(5919):1304–1307, March 2009.
- [10] Contreras X, Schweneker M, Chen CS, McCune JM, Deeks SG, Martin J, and Peterlin BM. Suberoylanilide hydroxamic acid reactivates hiv from latently infected cells. *J Biol Chem.*, 284:6782–6789, March 2009.
- [11] Archin NM, Espeseth A, Parker D, Cheema M, Hazuda D, and Margolis DM. Expression of latent hiv induced by the potent hdac inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 25:207–12, 2009.
- [12] Shan L, Deng K, Shroff NS, Durand CM, Rabi SA, Yang HC, Zhang H, Margolick JB, Blankson JN, and Siliciano RF. Stimulation of hiv-1-specific cytolytic t lymphocytes facilitates elimination of latent viral reservoir after virus reactivation. *Immunity*, 36(3):491–501, March 2012.

- [13] Alan S. Perelson, Denise E. Kirschner, and Rob De Boer. Dynamics of HIV infection of $cd4^+$ T cells. *Math. Biosci.*, 114(1):81–125, 1992. URL <http://141.214.51.57/lab/pubs/01.pdf>.
- [14] Denise E. Kirschner and F. G. Webb. A model for treatment strategy in the chemotherapy of AIDS. *Bull. Math. Biol.*, 58(2):367–390, 1996. URL malthus.micro.med.umich.edu/lab/pubs/06.pdf. Errata: <http://malthus.micro.med.umich.edu/lab/errata.html>.
- [15] Alan S. Perelson and Patrick W. Nelson. Mathematical analysis of HIV-1 dynamics in vivo. *SIAM Rev.*, 41:3–44, 1999. URL www.vc.ehu.es/campus/centros/farmacia/deptos-f/depme/33510.pdf.
- [16] McLean A and Nowak M. Competition between zidovudine sensitive and resistant strains of hiv. *AIDS*, (6):71–79, 1992. URL http://www.ped.fas.harvard.edu/people/faculty/publications_nowak/AIDS92.pdf.
- [17] Pankaj Jalote. *An integrated approach to software engineering*. Springer, 2005.
- [18] Rebeca Wirfs-Brock and Alan McKean. *Object Design Roles, Responsibilities and Collaborations*. Addison Wesley, 2002. ISBN 0201379430.
- [19] Erich Gamma, Richard Helm, Ralph Johnson, and John Vlissides. *Design patterns elements of reusable object-oriented software*. Addison-Wesley, 1995.
- [20] James O. Coplien. Curiously recurring template patterns. *C++ Report*, page 24–27, February 1995. URL <http://sites.google.com/a/gertrudandcope.com/info/Publications/InheritedTemplate.pdf>.
- [21] J Dormand and P Prince. A family of embedded runge-kutta formulae. *Journal of Computational and Applied Mathematics*, 6(1):19–26, 1980.
- [22] K. Ahnert and M. Mulansky. Odeint - Solving Ordinary Differential Equations in C++. In T. E. Simos, G. Psihoyios, C. Tsitouras, and Z. Anastassi, editors, *American Institute of Physics Conference Series*, volume 1389 of *American Institute of Physics Conference Series*, pages 1586–1589, September 2011. doi: 10.1063/1.3637934.
- [23] Y. Shafranovich. Common format and mime type for comma-separated values (csv) files. URL <http://tools.ietf.org/html/rfc4180>.
- [24] Libing Rong and Alan S. Perelson AS. Modeling latently infected cell activation: Viral and latent reservoir persistence, and viral blips in hiv-infected patients on potent therapy. *PLoS Computational Biology*, 5(10), October 2009.
- [25] Seema H. Bajaria and Denise E. Kirschner. CTL action during HIV-1 is determined via interactions with multiple cell types. In Wai-Yuan Tan and Hulin Wu, editors, *Deterministic and Stochastic Models of AIDS Epidemics and HIV Infections with Intervention*, pages 219–254. World Scientific Publishing Company, Singapore, 2005.
- [26] Thomas McCabe. A complexity measure. *IEEE Transactions on Software Engineering*, 2(4):308–320, 1976. URL <http://www.literateprogramming.com/mccabe.pdf>.

Apéndice A

Acrónimos

ADN Ácido Desoxirribonucleico	11
ARN Ácido Ribonucleico	11
ARNm ARN Mensajero	11
AZT Azidotimidina	8
CCCC <i>C and C++ Code Counter</i>	69
CD4+ <i>Cluster of Differentiation 4</i>	4
CD8+ <i>Cluster of Differentiation 8</i>	20
CLOC <i>Count Lines Of Code</i>	69
CSV <i>Comma Separated Value</i>	48
CPE <i>CytoPathic Effect</i>	20
CRTP <i>Curiously Recurring Template Pattern</i>	42
CCR5 C-C quimiocina receptora de tipo 5	12
CXCR4 C-X-C quimiocina receptora de tipo 4	12
ddI Didanosina	17
FDA <i>Food and Drug Administration</i>	20

FuDePAN Fundación para el Desarrollo de la Programación en Ácidos Nucleicos	20
GFDL <i>GNU Free Document License</i>	12
GPLv3 <i>GNU General Public License third version</i>	20
HAART <i>Highly Active AntiRetro Viral Therapy</i>	19
HDAC Histona Deacetilasa	20
ICTV <i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>	11
NNRTI Inhibidores no nucleósidos de transcriptasa inversa	16
NRTI Inhibidores análogos de nucleósidos	16
PI Inhibidores de Proteasa	4
PCR <i>Polymerase Chain Reaction</i>	14
RDD <i>Responsibility Driven Design</i>	38
RTI Inhibidores de RetroTranscriptasa	4
SAHA <i>SuberoylAnilide Hydroxamic Acid</i>	20
SIDA Síndrome de Inmuno-Deficiencia Adquirida	12
TcR Receptor de linfocitos T	20
VIH Virus de la Inmunodeficiencia Humana	8
ViSi <i>Virus Simulator</i>	8

Apéndice B

Métricas

B.1. CCCC

Las métricas obtenidas corriendo *C and C++ Code Counter* (CCCC) sobre el código se pueden ver en la tabla B.1.

	Métrica	Etiqueta	En Total	Por Módulo
	Cantidad de Módulos	NOM	54	
	Líneas de Código	LOC	1131	20.944
	Número Ciclomático de McCabe	MVG	45	0.833
	Líneas de Comentario	COM	1271	23.537
	LOC/COM	L_C	0.890	
	MVG/COM	M_C	0.035	
	Medida del Flujo de Información (inclusiva)	IF4	5934	109.889
	Medida del Flujo de Información (visible)	IF4v	5853	108.389
	Medida del Flujo de Información (concreta)	IF4c	514	9.519
	Líneas de Código Rechazadas por el Parser	REJ	151	

Cuadro B.1: Valores devueltos por CCCC

Ver la Ref. [26] para una descripción del Número Ciclomático de McCabe.

B.2. CLOC

Las métricas obtenidas corriendo *Count Lines Of Code* (CLOC) sobre el código se pueden ver en la tabla B.1

Lenguaje	Archivos	Blanco	Comentarios	Código
C++	17	130	590	669
C++ Header	21	166	768	674
Total	38	296	1358	1343

Cuadro B.2: Valores devueltos por CLOC

A partir de estos datos, se puede ver que la proporción entre líneas de código y comentarios ($\frac{LOC}{COM}$) es aproximadamente 1.2 en los archivos .cpp, 0.8 en los *headers*, y 1 en todo el programa. Hay que tener en cuenta en esta correlación que todos los archivos han sido comentados con la licencia GPLv3.

B.3. Cobertura de Código

Una de las primeras propuestas para garantizar la calidad del código es realizar tests sobre el mismo, para controlar su correcto funcionamiento. Como la cantidad de tests necesarios para garantizar el correcto funcionamiento para todos los *inputs* posibles suele ser demasiado grande, se eligen casos considerados especialmente representativos. Una de las técnicas para disminuir el tiempo de testing y garantizar estabilidad del código a lo largo del desarrollo es la implementación de los test de forma automática. Esto a su vez permite evaluar la representatividad de los tests realizados, mediante una de las métricas más usadas llamada la cobertura de código, que mide el porcentaje del código fuente del programa que ha sido testeado. Para esto se utilizó la herramienta `lcov` sobre el código completo, del cual se obtuvieron los resultados que se muestran en la tabla B.3.

Cobertura	Porcentaje	Cubiertas	Totales
Clases	57 %	13	23
Condicionales	16 %	95	590
Ficheros	57 %	13	23
Líneas	28 %	90	317
Paquetes	83 %	5	6

Cuadro B.3: Cobertura de Testing

Adicionalmente a los test automáticos, se ejecutaron los catorce experimentos desarrollados anteriormente, mas los realizados en esta tesis, donde se pudo observar el correcto funcionamiento del simulador en distintas situaciones e interactuando con varios plugins diferentes.