



Universidad Nacional Autónoma de México

Instituto de Neurobiología

LOS SISTEMAS DE EXPRESIÓN LENTIVIRALES: ORIGEN, TIPOS Y
APLICACIONES

Tesina que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias (Neurobiología)

presenta

el Biol. Joel Edgar Vergara Quintanar

Director de Tesina

Dr. Ataúlfo Martínez Torres

Campus Juriquilla, Querétaro enero 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Neurobiología

Los miembros del Comité Tutorial certificamos que la tesina elaborada por Joel Edgar Vergara Quintanar es: “Sistemas de Expresión Lentivirales” se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Firma

Presidente

Dr. Luis Vaca Dominguez

Secretario (Tutor)

Dr. Ataúlfo Martínez Torres

Vocal

Dr. Alejandro Manuel García Carranca

Vocal

Dra. Aurea Orozco Rivas

Vocal

Dr. Juan Riesgo Escovar

Vocal

Edith Garay Rojas

Vocal

Alfredo Varela Echavarría

Aprobado por el Comité Académico

Coordinador del Programa

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo representa no solo la culminación de una meta académica sino el desenlace de toda una etapa de mi vida de la cual muchas personas participaron de diversas maneras. Primero, dedico este trabajo a mi hija María Fernanda cuya llegada hubo cambiado mi existencia de una manera que jamás me imaginé pero es la más hermosa. Hija, siempre has estado en mis pensamientos y aunque al comenzar este esfuerzo tu no eras parte de mi, te ofrezco con toda mi alma y mi amor mi trabajo, éste y todos los que vienen. Eres y siempre serás el motor de mi vida y la inspiración de todo lo que hago. Siempre estaré para ti, haciendo hasta lo imposible para que estés tranquila, segura y seas feliz. Te amo con toda mi alma mi amor.

Agradezco a Lisa Andrea Cummins por su amor, apoyo y sobre todo por impulsarme para concluir este proyecto. Has hecho de mis proyectos, retos y sueños los tuyos y siempre has estado conmigo. Quiero siempre corresponderte de la misma manera, haciendo tus sueños, retos y proyectos los míos. Te amo. A mis padres por su apoyo, comprensión y apoyo durante este largo proceso. Siempre han estado para mí y eso lo valoro y agradezco infinitamente. Al Dr. Ataúlfo Martínez Torres por su tutoría, guía y asistencia pero sobre todo paciencia a lo largo del programa de estudios. A los miembros de mi comité: Dr. Luis Vaca Dominguez, Dr. Alejandro Manuel García Carranca, Dra. Aurea Orozco Rivas, Dr. Juan Riesgo Escovar. Dra. Edith Garay Rojas y Dr Alfredo Varela Echavarría por sus observaciones y críticas constructivas a este trabajo. A la Dra. Irma Alicia Martínez Dávila por su amistad, consejo y asistencia en la realización de cultivos celulares y otras técnicas de laboratorio. Al Dr. Lenin David Ochoa de la Paz por su ayuda en técnicas de inmunohistoquímica, disecciones, histología. Al Dr. Rogelio Arellano Ostoa y al Dr. Carlos Saldaña por proporcionarme el criostato y enseñarme a utilizarlo. A la Dra. Carmen Mejía por sus observaciones a mi trabajo a lo largo del proceso. Al Dr Ricardo Miledi y Dau por su apoyo durante mi estancia en la Universidad de California Irvine. A la Dra. Anaid Antaramian Salas apoyo en la unidad de secuenciación, la facilitación de bibliografía y sobre todo su apoyo moral e impulso para la culminación de este proyecto. A Efrén Ruiz Alcibar por su ayuda para tener el material listo cada vez que se requería y por su amistad. A mis compañeros de laboratorio Angélica Gustavo Martínez, Argel Estrada, Abraham

Rosas, Carlos Martínez y Fernando Rosas por su amistad, críticas y observaciones. A veces no nos llevamos siempre del todo bien pero al final todo son simples etapas que pasan. Tengo bonitos recuerdos de todos ustedes y agradezco a todos los que aportaron a mi vida.

Agradezco en especial manera a la Ing. Leonor Casanova Rico su apoyo y dedicación para realizar los trámites que tuve que realizar, desde mi inscripción por primera vez en el programa, la orientación, el envío de papeles, hasta los trámites y demás asuntos para los cuales ella siempre ha sido sensible tanto a mi situación como para el bien del programa y el cumplimiento de su normatividad. Muchas gracias Leo.

Agradecimientos a:

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
Becario No. 183347

A la Dirección General de Estudios de Posgrado
Becario No. 50 500 6301

Unidad de Proteogenómica.
Dra. Anaid Antaramian Salas

Bioterio.
MVZ. José Martín García Servín

Biblioteca.
Dr. Francisco J. Valles Valenzuela

Cómputo
Ing. Ramón Martínez Olvera

“If nothing matters, there is nothing to save”

(Anónimo)

para María Fernanda con todo mi amor.

INDICE

	pp
Resumen español.	1
Resumen inglés.	2
1. INTRODUCCION.	3
1.1 – Clasificación y origen del género <i>Lentivirus</i> .	3
1.2 – Organización del genoma lentiviral y estructura del virión.	10
1.3 – Replicación (Ciclo de Vida).	13
2. DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE LOS VECTORES LENTIVIRALES	16
2.1 – Desarrollo de los primeros vectores.	16
2.2 – Lentivirus Pseudotipados.	21
2.3 – Lentivirus Autoinactivantes.	23
2.4 – Lentivirus con defectos en la Integrasa.	24
2.5 – Sistemas lentivirales Inducibles y Regulables.	27
2.6 – Lentivirus con otras modificaciones.	29
3. APLICACIÓN DE LOS LENTIVIRUS EN LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA.	31
3.1 – Neurobiología y enfermedades neurodegenerativas.	31
3.2 – Organismos genéticamente modificados.	35
3.3 – ARN de interferencia (siARN) y terapia génica.	37
3.4 - Vectores bicistrónicos y con promotores duales	39
3.5 – Control de actividad celular	40
3.6 – Desarrollo de vacunas	41
4. CONCLUSIONES	44
5. REFERENCIAS	46

Resumen

Esta revisión presenta un panorama general de los aspectos taxonómicos, evolutivos y biológicos de los retrovirus del género *Lentivirus* así como detalles técnicos de los vectores de expresión derivados de éstos. Se tratan detalles del diseño y construcción de los tipos de vectores lentivirales más utilizados y se exponen sus características principales. Así mismo, se presentan ejemplos de aplicaciones de estos sistemas de expresión en investigación básica y aplicada y se discuten las perspectivas de estas tecnologías. Los lentivirus presentan características particulares que los hacen una herramienta muy eficiente, versátil, flexible y relativamente barata para la modificación génica de diversos tipos celulares en modelos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. La relativa facilidad de construcción y diseño, su baja tasa de citotoxicidad, su alta capacidad de carga de ADN exógeno, su alta tasa de expresión y estabilidad molecular, y sobre todo, la facilidad para su administración; los hacen una herramienta cada vez más utilizada en diversos contextos experimentales. Los próximos años revelarán avances importantes en los aspectos técnicos de construcción, eficacia, control y seguridad de los sistemas lentivirales. Su utilización será aún más generalizada principalmente en el campo médico ya que se publicarán los resultados de las primeras investigaciones clínicas que utilizan los vectores lentivirales en terapia génica contra enfermedades Neurodegenerativas y Cáncer; además de ser una de las herramientas en la búsqueda de vacunas para enfermedades como el SIDA y la medicina basada en células madre.

Abstract

This review presents a general overview of taxonomic, evolutionary and biological aspects of the genus *Lentivirus* of retroviruses, as well as technical features of the expression vectors derived from them. This work covers aspects relative to design, development and construction of the most commonly used lentiviral vectors and their main attributes are discussed. Basic and applied scientific examples are presented and perspectives of these technologies are provided. Lentiviral vectors possess a myriad of qualities that make them efficient, versatile, flexible and economically affordable tools to achieve genetic modification of diverse cell types, and *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* experimental models. The relative simplicity of their design and construction, low cytotoxicity, loading capacity of foreign DNA, tunable expression level, molecular stability and ease of administration, make lentiviral vectors a commonly used tool under diverse experimental conditions. In the next years lentiviral expression systems will present important improvements in terms of their construction, efficiency, safety and control technologies. Their use will be even more disseminated mainly in the medical field given the completion of the first clinical tests using lentiviral vectors in gene therapy against neurodegenerative diseases and cancer. Finally, these vectors are becoming today, one of the main tools not only in the search for vaccines against diseases such as AIDS and they are of main importance in modern stem cell-based therapy.

1.- Introducción

1.1.- Clasificación y origen del género *Lentivirus*

La familia Retroviridae agrupa a virus de ARN de cadena sencilla (ssRNA, del inglés single strand RNA) que son capaces de transcribir ARN genómico mediante la enzima Transcriptasa Reversa (RT) codificada en su genoma. De acuerdo a la similitud en secuencias genéticas y organización del genoma, los retrovirus se clasifican en 7 géneros los cuales son denominados mediante las letras $\alpha - \epsilon$ además de los *Spumavirus* y *Lentivirus* (Balvay et. al., 2007). A pesar de que los retrovirus presentan una amplia variedad de especies hospederas y tipos de vida, todos son similares en la estructura del virión, organización del genoma y forma de replicación. Además, comparten características biológicas como son: la capacidad de interactuar con sus hospederos provocando una amplia gama de reacciones que van desde infecciones benignas provocadas por virus endógenos, hasta infecciones fatales. Tienen la habilidad de adquirir y modificar las funciones de secuencias derivadas de los hospederos las cuales pueden detectarse como oncogenes; se pueden insertar en la línea germinal de los hospederos como provirus endógenos y pueden comportarse como elementos transposables lo cual ha sido importante en la evolución de los vertebrados. Pueden también causar daño al material genético al activar o desactivar genes cuando el provirus se inserta en el genoma hospedero. Son capaces de alterar su genoma de manera rápida mediante recombinación y mutación por lo que pueden adecuarse a condiciones ambientales cambiantes. Estas características permiten su utilización como vectores para insertar material genómico exógeno a diversas líneas celulares y organismos (Coffin, 1996).

En cuanto a su morfología, los viriones retrovirales presentan una morfología esférica de entre 80 – 100 nm de diámetro, poseen una envoltura que presenta proyecciones glicoprotéicas de alrededor de 8 nm de largo (van Regenmortel et al, 2000) que se ensamblan en dímeros y que son producto del gen *env* (Coffin, 1996). El núcleo interno se ensambla a partir de los productos del gen *gag* y encapsula la nucleocápside viral cuya

forma es por lo general esférica, aunque varía en los diferentes géneros (Coffin, 1996), por ejemplo, es excéntrica en *Betaretrovirus*, concéntrica en *Alpharetrovirus*, *Gammaretrovirus*, *Deltaretrovirus* y *Spumavirus* y en forma de bastón ó de cono truncado en *Lentivirus* (van Regenmortel et al, 2000) (Fig.1). La nucleocápside también incluye distintas proteínas que cumplen funciones catalíticas durante la replicación como son la proteasa codificada por el gen *pro* y dos productos del gen *pol*: la transcriptasa reversa, necesaria para convertir el ARN de cadena sencilla en ADN de cadena doble y una integrasa, necesaria para unir de manera covalente el ADN viral al de la célula hospedera para formar el provirus (Coffin, 1996).

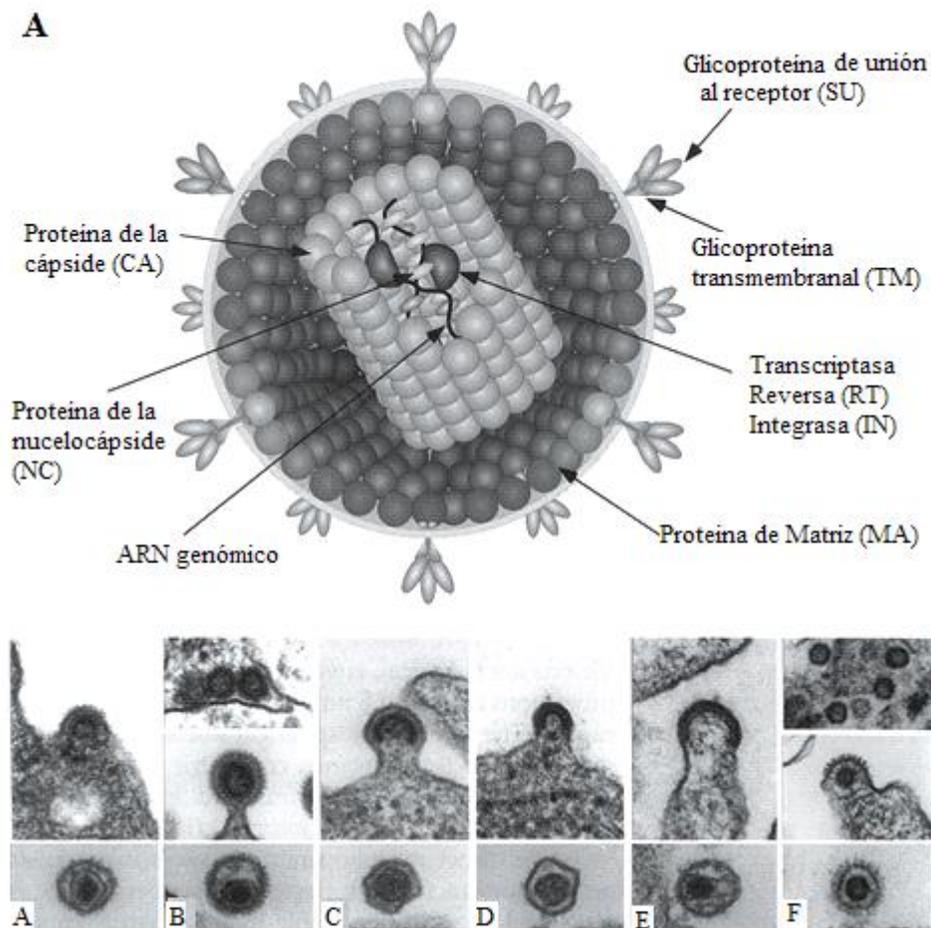


Fig. 1. Morfología de Retroviridae. Esquema que muestra las localizaciones de las estructuras del virión y proteínas. (Abajo) Imágenes de la apariencia de diversos géneros de Retroviridae (A) *Alpharetrovirus*: (virus de la leucosis aviar, ALV; type "C"); (B) *Betaretrovirus*: (virus del tumor de la mama murino, MMTV; tipo "B"); (C) *Gammaretrovirus*:(virus de leucemia murina, MLV);(D) *Deltaretrovirus*; (virus de leucemia bovina, BLV);(E) *Lentivirus*: (virus de inmunodeficiencia humana-1, HIV-1); (F) *Spumavirus*: (virus espumoso humano, HFV). Imagen modificada de (van Regenmortel et al, 2000).

El genoma viral consiste de un dímero de ssARN lineal con sentido positivo, cada monómero tiene un tamaño de 7 a 11 Kb y comprende alrededor del 2% del peso seco del virión. Los monómeros se encuentran unidos entre sí por medio de puentes de hidrógeno (van Regenmortel et al, 2000) y cada uno de ellos se encuentra modificado de manera similar al del ARN mensajero (mARN), esto es, poliadenilado en el extremo 3' y presentando el capuchón "cap" en el extremo 5' (Coffin, 1996). Así mismo, cada monómero se encuentra asociado a una molécula de ARN de transferencia (tARN) que proviene del hospedero y que se encuentra apareado a una región conocida como sitio de unión del cebador (PBS, del inglés primer binding site), que se encuentra hacia el extremo 5' y que comprende alrededor de 18 pares de bases en el extremo 3' del tARN. Se pueden encontrar algunos otros ARNs pequeños que son derivados del hospedero así como fragmentos de ADN los cuales se propone pueden ser inclusiones incidentales (van Regenmortel et al, 2000). Los retrovirus infecciosos tienen cuatro genes principales que codifican para las proteínas del virión en el orden: 5'-gag-pro-pol-env-3'. Algunos contienen genes que codifican para proteínas no estructurales que son importantes para la regulación de la expresión de genes y la replicación viral mientras otros contienen secuencias derivadas de las células hospederas que son importantes en la patogénesis (van Regenmortel et al 2000).

La clasificación taxonómica de Retroviridae se basa en el análisis de las secuencias nucleotídicas encontradas de manera endógena en los organismos hospederos conocidas como secuencias retrovirales endógenas (ERVs, del inglés endogenous retroviral sequences) (Jern, et al 2005), así como en secuencias aisladas de virus exógenos (XRV, del inglés exogenous retrovirus) (van Regenmortel et al, 2000). Sin embargo, debido a la alta tasa de mutación y evolución de estos virus, alrededor de 107 veces más rápido que la tasa de mutación de eucariotas (Sala y Wain-Hobson, 2000), es necesario recurrir al análisis a partir de secuencias aminoacídicas reconstruidas llamadas putéinas utilizando secuencias nucleotídicas como base para dicha clasificación, además de secuencias reales encontradas en bases de datos (Jern, et al, 2005). De esta manera, las relaciones taxonómicas y evolutivas propuestas en el pasado (Smith et al, 1988) basadas en la secuencia del gen *env*,

han sido reemplazadas por el uso del análisis de ERVs , XRVs y de puteínas a partir del gen *pol* con la finalidad de determinar de manera más precisa las relaciones filogenéticas dentro de esta familia (Jern, et al, 2005). El tamaño de la secuencia de Pol (800 – 1100 aa) así como su grado de conservación dentro de la familia, la hacen un buen marcador molecular a nivel de géneros y ha sido utilizado en trabajos recientes (Tristem, 2000., Jern, et al, 2004., Katzourakis, et al, 2009).

De esta manera, la clasificación y las relaciones filogenéticas propuestas por Jern, et al (2005) indican la existencia de dos grupos principales de retrovirus: uno formado por los γ -retrovirus junto con los ϵ -retrovirus, y otro en el que se encuentran los β -retrovirus junto con los α y δ retrovirus así como los lentivirus. Situados a la mitad de los dos grupos, se encuentran los spumavirus, los cuales se consideran un grupo más antiguo. Además, este arreglo de los géneros dentro del dendrograma (Fig.2) coincide con propiedades genómicas que distinguen a los dos principales grupos, como son la estrategia en la traducción, el número de motivos de unión de dedos de zinc dentro de la proteína Gag y la presencia de desoxiuracil trifosfatasa (dUTPasa) entre otras, por lo que parece estar bien sustentado (Jern, et al. 2005). Criterios como el uso de hospederos, para clasificar a los miembros de la familia han sido desechados debido a la evidencia que indica la ocurrencia de transmisiones horizontales entre especies (Herniou, et al, 1998) por lo que no son confiables (Jern, et al. 2005).

Como se mencionó, los lentivirus se encuentran agrupados filogenéticamente junto con los retrovirus β , α y δ y comparten con ellos características morfológicas (Fig.2). Sin embargo, Lentivirus comprende un género monofilético el cual se caracteriza junto con los retrovirus δ en que sus hospederos no presentan secuencias endógenas que sugieran una infección ancestral de estos virus (Jern, et al. 2005). Aunque lo anterior no indica que la historia evolutiva de *Lentivirus* no incluya ancestros que hayan dejado secuencias endógenas. Debido a la alta tasa de mutación que presentan estos virus, no sorprendería que una búsqueda de secuencias endógenas lentivirales dentro de secuencias genómicas de hospederos resulte en la ausencia de ellas. Lo anterior mantuvo la historia evolutiva temprana de *Lentivirus* incierta y basada en extrapolaciones de las distancias genéticas (relojes moleculares) entre los grupos de lentivirus contemporáneos (Holmes, 2003), lo que

hace a estas propuestas poco confiables para inferir distancias genéticas más distantes (Katzourakis et al, 2007). Sin embargo, recientemente se reportó la primera evidencia que indica la existencia de una secuencia lentiviral endógena dentro del genoma de conejo europeo y de cuyo análisis se propone una antigüedad del género *Lentivirus* mayor a 7 millones de años. Adicionalmente, este estudio expande el rango de hospederos a 5 órdenes de mamíferos y demuestra que los lentivirus pueden transmitirse de forma vertical y por medio de proliferación intergenómica además de la transmisión horizontal (Katzourakis et al, 2007).

Por lo que se propone que el género *Lentivirus* comprende en la actualidad por lo menos 5 serogrupos de virus que son clasificados dependiendo de los hospederos mamíferos a los cuales están asociados: bovinos, equinos, felinos ovinos/caprinos ó primates (Brown et al, 1994) (Tabla1). Todos los serogrupos están relacionados filogenéticamente y presentan una organización genómica similar ($5' - gag-pol-env-3'$), además de genes accesorios (trans activadores), sin embargo, existen diferencias sustanciales dentro del género. Así, los lentivirus no asociados a primates contienen una región del gen *pol* que codifica para una dUTPasa mientras que los lentivirus de primates carecen de ella.

Esta característica junto con las distancias genéticas entre los lentivirus de primates al ser comparadas con los demás grupos de mamíferos, sugiere que los lentivirus se originaron a partir de un mamífero no primate. Una transferencia horizontal entre un mamífero no primate y uno primate ocurrió y fue seguida por el esparcimiento del virus en muchas especies de primates. Si esto no hubiera ocurrido de esta manera, se esperaría tener una mayor diversidad en los virus asociados a primates que los que no lo estuvieran. Evidencia de lo anterior la representa el caso de los virus de inmunodeficiencia felina (VIF). La diversidad global de VIF es por lo menos el doble de la que existe para el grupo M del virus de inmunodeficiencia humana (VIH-1). Esto sugiere que si ambos grupos de virus mutan a la misma tasa, el VIF ha estado presente desde mucho tiempo antes que el VIH (Foley, 2000).

Sin duda, el virus mejor estudiado y que incluso se considera el tipo biológico de *Lentivirus* es el VIH. Además de la importancia médica que este grupo de virus posee, su estudio ha

aportado información relevante para entender aspectos biológicos y evolutivos de *Lentivirus* (Yusim, et al 2001). De esta forma, mediante la comparación de las secuencias de las LTRs de los genes *gag*, *pol*, *env* y *nef* y la inferencia de sus filogenias mediante diferentes modelos evolutivos se propone que la aparición de las dos formas VIH (VIH-1 y VIH-2, junto con sus subtipos) es de origen reciente y que estas formas son resultado de la transferencia horizontal desde especies de chimpancés y mangabies respectivamente hacia poblaciones humanas (Gojorobi et al., 1990).

El ancestro en común entre el grupo VIH-1 M (grupo más distribuido en la población humana) y el virus de inmunodeficiencia de simio – chimpancé (VIS-CPZ) se ha calculado apareció durante el final del siglo XVII (Salemi et al, 2001). Así mismo, la epidemia del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) concuerda con el origen durante el siglo XX del grupo VIH-1M en el cual, la existencia de esta enfermedad pasó desapercibida en el África subsahariana durante varias décadas (Yusim et al, 2001). De igual manera, tanto la epidemiología así como la filogenia molecular de los virus del grupo de VIH-1 O y VIH-2 son menos comprendidas que para aquella del VIH-1 M. Aunque la diversidad en la secuencia aminoacídica y nucleotídica de los virus VIH-2 es mayor que aquella encontrada para el grupo VIH-1, es equivalente a la que hay dentro del clado VIH-1M y VIS-CPZ (Foley, 2000). Por lo tanto, se considera que la diversidad de los linajes de VIH-2 apareció primero en simios mangabies y que de ahí se transfirió a los humanos en varias ocasiones, una por cada subtipo de virus VIH-2. De esta manera, los subtipos de VIH-2 son análogos a los grupos M,N y O de VIH-1 tanto en términos de diversidad de secuencias como de eventos de transferencia interespecífica a través de los cuales surgieron (Foley, 2000). Lo anterior manifiesta la alta tasa de mutación y recombinación de estos virus así como la gran capacidad de transferirse entre especies y formar nuevos linajes muy diversos en poco tiempo. Esto explica aspectos como la magnitud de la pandemia de SIDA dentro de las poblaciones humanas así como la dificultad de encontrar formas efectivas y perdurables de controlar tanto la enfermedad como la dispersión del virus.

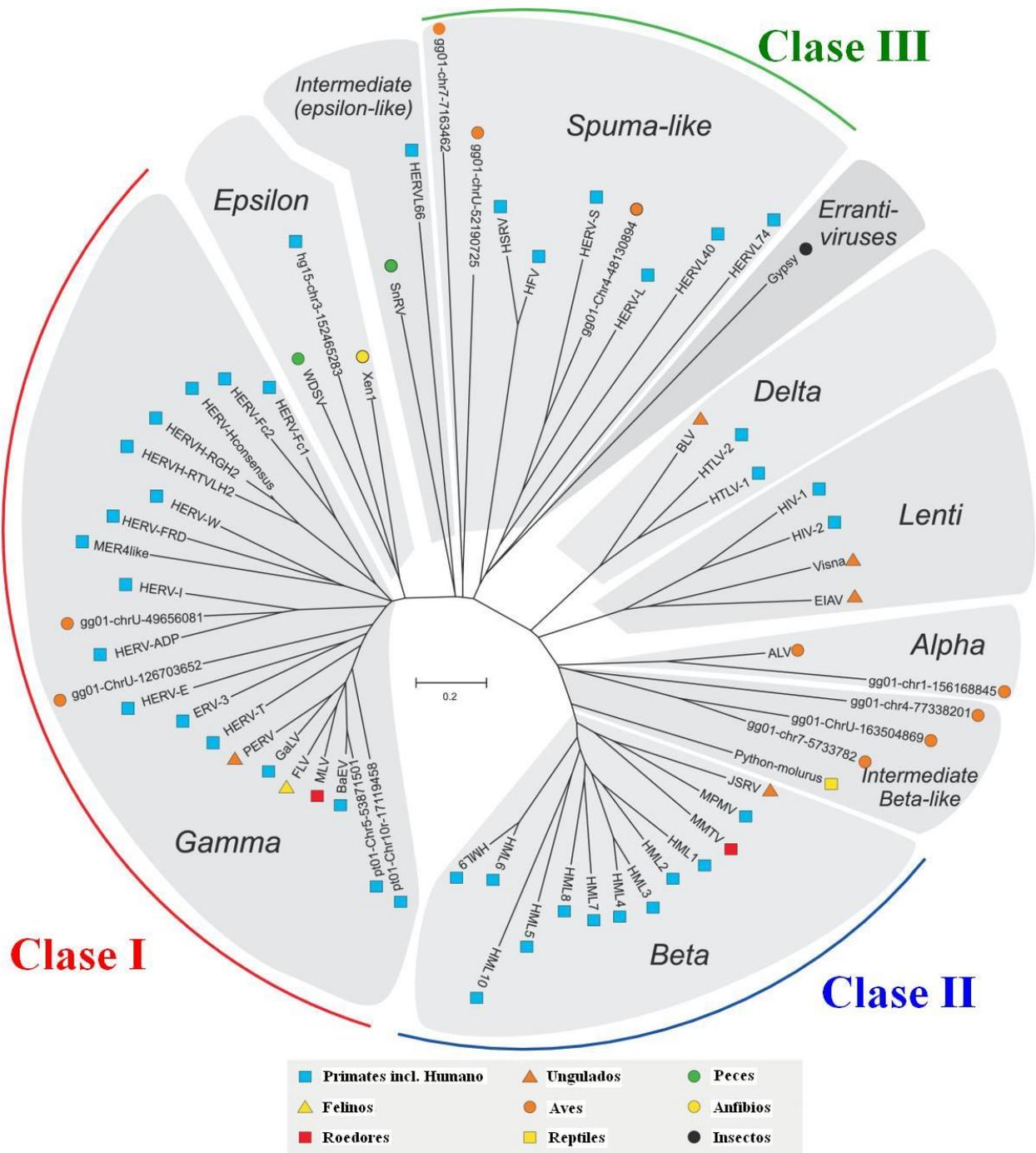


Fig.2. Relaciones filogenéticas de Retroviridae. El dendrograma muestra los 7 géneros aceptados dentro de la familia así como formas intermedias. Las distancias genéticas coinciden con características biológicas de los grupos como son la presencia de genes accesorios (*Lentivirus*). Los hospederos se indican con figuras geométricas. Modificado de (Jern, et al 2005).

Tabla 1. Clasificación de Lentivirus de acuerdo a sus hospederos y enfermedades que causan

Virus	Abreviatura	Hospedero	Enfermedad
Virus de inmunodeficiencia humana tipo I y II	VIH-1, VIH-2	Humano	SIDA (Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida)
Virus de inmunodeficiencia en simios	VIS	Primates no humanos	Enfermedades parecidas al SIDA en simios. Usualmente benigno
Virus de inmunodeficiencia en felinos	VIF	Felinos	Caquexia, neumonía, encefalitis
Virus de inmunodeficiencia bovina	VIB	Bovinos	Benigno
Virus VISNA/Maedi	VISNA	Cabras y ovejas	Encefalitis y neumonía crónica
Virus de la encefalitis-artritis caprina	VEAC	Cabras y ovejas	Encefalitis, artritis
Virus de anemia equina infecciosa	VAEI	Equinos	Anemia, caquexia

1.2 - Organización del Genoma Lentiviral y Estructura del Virión

Tal y como se ha mencionado, el genoma lentiviral es de aproximadamente 10Kb de largo por monómero y consta de 3 genes principales 5'-*gag-pol-env*-3' los cuales codifican polipéptidos precursores de diversas proteínas que posteriormente la traducción son procesadas para dar lugar a proteínas estructurales de virión, enzimas tales como la proteasa (PR), RT, RNasa H y la integrasa (IN) y glucoproteínas de la envoltura (Env gp). Además, el genoma lentiviral codifica para genes reguladores que se requieren, entre otras funciones, para coordinar la expresión génica en diferentes procesos como son la transcripción, exportación nuclear y regulación traduccional (Balvay et al. 2007). De esta forma, existen los llamados genes transactivadores transcripcionales como *tat* y el regulador de la expresión viral *rev*, cada uno codificado por dos exones traslapados y que producen proteínas no viriónicas que son esenciales para la replicación. Así mismo, también se codifican diversos genes que no son esenciales para la replicación en líneas celulares. Estos genes accesorios son *vif*, *vpr*, *vpu*, en HIV-1, y *vif*, *vpx* y/o *vpr* y *nef* en HIV-2 y VIS. Los productos de *vpr* y *vpx* se ensamblan dentro de los viriones mientras que los de *vif*, *vpu* y *nef* aparentemente no lo hacen (Luciw, 1996) pero están involucrados con la regulación y síntesis del ARN (van Regenmortel et al, 2000). Las LTR (repeticiones terminales largas) son de 600 nucleótidos de largo, de los cuales la región U3 comprende 450 nucleótidos, la

secuencia R 100 nucleótidos y la región U5 80 nucleótidos (van Regenmortel et al, 2000). Las LTRs son esenciales para funciones necesarias en el ciclo de vida del lentivirus como son la integración al ADN hospedero, la transcripción del genoma viral para producir mRNA y la síntesis de ADN viral. Adyacentes a las LTRs se localizan además secuencias involucradas en el empaquetamiento del ARN viral dentro de los viriones, así como elementos reguladores positivos de la actividad transcripcional. Estos elementos dependen de su posición relativa dentro del genoma para actuar, por lo que son elementos en *cis* que no pueden ser proporcionados por virus auxiliares o como factores solubles (Cline, 1985) (Fig. 3).

Los productos de los genes que codifican proteínas de los lentivirus comprenden el 60% de la masa total del virión (van Regenmortel et al, 2000). El producto del gen *gag* es una proteína precursora de 50 – 57 KDa que posteriormente es procesada y cortada en tres proteínas principales: la proteína de matriz (MA), la proteína de la cápside (CA) y la proteína de la nucleocápside (NC).

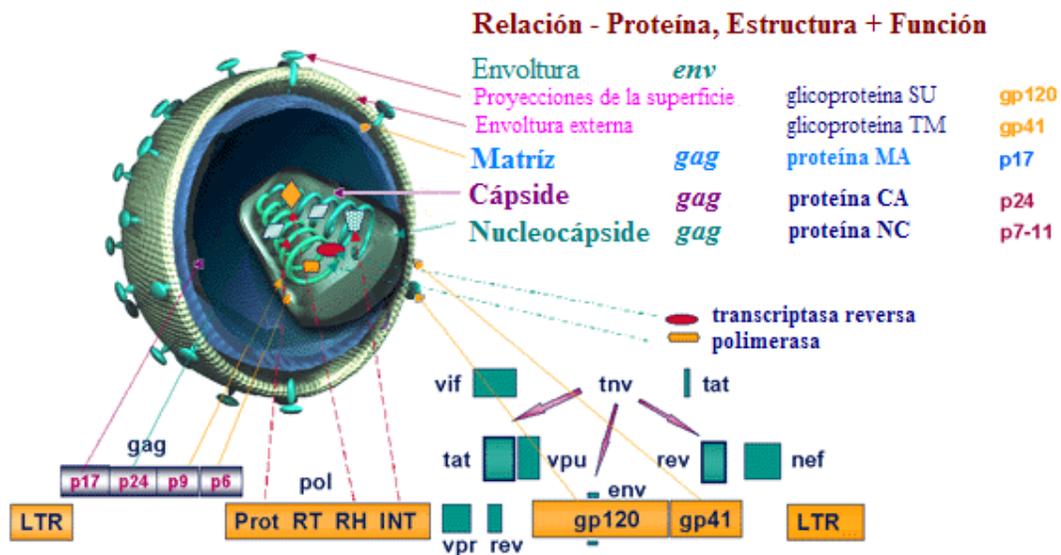


Fig. 3. Organización genómica típica de *Lentivirus*, sus proteínas y morfología. Morfología típica de un lentivirus (izq. arriba). Organización del genoma así como la localización de sus proteínas dentro del virión indicada con flechas (abajo). Localización de las proteínas codificadas en el genoma dentro del virión (der. arriba).

La proteína de la matriz es una proteína miristilada de 15 – 17 KDa y es responsable de la asociación del precursor gag con la membrana plasmática celular (Joag et al, 1996). La miristilación, es una modificación postraducciona que consiste en la incorporación de un grupo miristato / n-tetradecanoato (ácido graso saturado de 14 carbonos) a un residuo N-terminal de glicina de una proteína madura o a un residuo interno de lisina. Esta modificación es necesaria tanto para el ensamble como para la generación de viriones infecciosos (Bryant y Ratner, 1990., Rein et al, 1986). Dentro del virión, la proteína MA está localizada entre la membrana viral y la proteína de la cápside (Fig. 3) (Joag et al, 1996). La proteína de la cápside (CA) es una molécula de 24 – 27 KDa que forma el núcleo hidrofóbico del virión, es la más abundante y provoca una fuerte reacción inmune por medio de anticuerpos durante la infección, los cuales son utilizados para el diagnóstico. Dentro de la CA, la proteína de la nucleocápside (NC) envuelve el ARN genómico viral y aunque es esencial para el empaquetamiento del ARN viral, no es necesaria en la producción de viriones (Fig. C) (Joag et al, 1996).

Los productos del gen *pol* son todas las enzimas que se producen por el corte de la poliproteína Gag – Pol en la posición Pr160gag-pol durante la morfogénesis del virión (Luciw, 1996). Las proteínas derivadas son: la proteinasa viral (PR), la transcriptasa reversa (RT) y proteínas de integración/endonucleasas (IN) (Balvay et al 2007). Además, en lentivirus no asociados a primates se ha demostrado que *pol* codifica para una dUTPasa (Tabla 1) (Elder et al, 1992). La proteinasa viral madura (PR) consiste en un homodímero de unos 20KDa y su acción principal consiste en hidrolizar las poliproteínas virales en productos protéicos funcionales que son esenciales para el ensamblaje del virión así como para sus actividades subsecuentes. Este proceso se lleva a cabo mientras la partícula viral emerge de la célula hospedera (Mana y Marcy, 2001). La transcriptasa reversa (RT) y la RNasa H se encuentran codificadas también en el gen *pol*. La RT funcional es un heterodímero que contiene una subunidad de 66 KDa (p66) y una de 51 KDa (p51), p66 contiene dominios que son responsables de las dos actividades catalíticas de la RT, el dominio polimerasa N-terminal y el dominio RNasa H C- terminal. La subunidad p51 es procesada por corte proteolítico de p66 y corresponde al dominio polimerasa de la subunidad p66 (Marcy, 2006). Finalmente, la última enzima codificada por *pol* es la

integrasa (IN). Esta enzima tiene unos 32 kDa y lleva a cabo la integración del ADN viral en el genoma del hospedero en un proceso de dos pasos. En el primero conocido como procesamiento 3', dos nucleótidos son removidos del extremo 3' de cada una de las cadenas de ADN sintetizadas durante la transcripción reversa. En el siguiente paso llamado transferencia de la cadena de ADN, un par de reacciones de transesterificación integran los extremos del ADN viral dentro del genoma hospedero. La integrasa consta de tres dominios diferentes desde el punto de vista estructural y funcional los cuales son necesarios para cada una de las reacciones de integración (Goldgur et al, 1999, He et al, 2010).

Finalmente, el gen *env* codifica las glucoproteínas del virión. Al igual que en otros retrovirus, las glucoproteínas son sintetizadas como precursores ricos en manosa y después son procesados dentro del retículo endoplásmico, aparato de Golgi y proteasas del hospedero para dar como resultado dos subunidades: la glucoproteína de superficie (SU; gp120 en HIV) y la glucoproteína transmembranal (TM; gp41 en HIV). Estas proteínas son de gran importancia biológica ya que son las que median la unión del virión con los receptores CD4 en el caso de SU; gp120, mientras que TM; gp41 es responsable de la fusión de la membrana celular con el virus así como del anclaje del complejo glucoprotéico dentro de la envoltura viral. Estas glucoproteínas producen una fuerte respuesta inmune, sin embargo, también son las proteínas que más mutan principalmente por errores de la RT, por lo que algunas de estas glucoproteínas escapan a la acción del sistema inmune dando como resultado una selección *in vivo* (Joag, 1996) que explica la aparición de serotipos nuevos en tiempos relativamente cortos como la agresividad de los viriones (Hutchinson, 2001).

1.3- Replicación (Ciclo de Vida)

La replicación de los lentivirus se puede dividir en dos fases, una temprana y otra tardía. Cada una de ellas implica diversos pasos secuenciales que involucran la interacción de las proteínas y ácidos nucleicos virales con factores celulares del hospedero (Luciw, 1996). La etapa temprana comienza con el reconocimiento de los receptores de membrana de la célula hospedera por parte del virión a través de las glucoproteínas de la envoltura (D'Souza y Summers, 2005). En el caso de los lentivirus de primates, las glucoproteínas reconocen a

los receptores CD4 y de quimiocina, lo que desencadena la fusión de membranas y la liberación de la nucleocápside dentro del citoplasma celular (Balvay, 2007). Mientras se internaliza, el virión es descubierto y el ARN genómico es retrotranscrito a ADN proviral de cadena doble (dsDNA, del inglés double strand DNA) por medio de la acción de la RT que retrotranscribe, y de la RNasa H, que remueve el molde de ARN. El dsADN, es después importado al núcleo en forma de complejo de preintegración por acción de IN en donde se integra al genoma hospedero. A diferencia de los demás retrovirus, los lentivirus no requieren para este paso que la célula se encuentre en mitosis ya que poseen factores como Vpr, que actúan en *cis* y en *trans* y permiten un transporte activo hacia el núcleo del hospedero en células que no estén en división (Robbins y Ghivizzani, 1998). La capacidad de los retrovirus para incorporarse al genoma de los hospederos permite una modificación genética estable por todo el tiempo de vida de la célula hospedera, al contrario de otros virus que permanecen episomales (Robbins y Ghivizzani, 1998).

Una vez que el dsADN se encuentra incorporado, comienza la fase tardía del ciclo de vida (D'Souza y Summers, 2005). Las LTR virales que flanquean el provirus promueven la transcripción del ADN proviral. El dominio U3 del LTR presenta elementos promotores basales de la transcripción incluyendo una caja TATA y sitios de unión para el factor de transcripción SP1. Además, la tasa de transcripción y de elongación del ARN puede ser aumentada por medio del transactivador Tat, el cual se une al elemento de respuesta del transactivador (Tar) presente en el LTR (Karn, 2000). Así mismo, la maquinaria de traducción del hospedero regula la proporción de los ARNs provirales y aquellos que son traducidos como productos de *gag*, *pol* y *env* y que permiten el empaquetamiento del ARN genómico dentro de los viriones nuevos (Balvay et al, 2007). El transactivador Rev reconoce elementos en *cis* (Elemento de respuesta a Rev, RRE) en los transcritos primarios y controla la proporción de los mensajeros que serán modificados por *splicing* y aquellos que permanecerán enteros (Luciw, 1996, Balvay et al 2007). Después de la síntesis, los transcritos virales, cortados o no, son exportados del núcleo una vez más por la acción de Rev y dirigidos hacia el citoplasma donde son traducidos (ARNs cortados) o sólo empaquetados (ARNs provirales). Finalmente las proteínas estructurales y el ARN proviral son dirigidos hacia la membrana plasmática donde ocurre el ensamblaje. Este proceso está

regulado por al menos una proteína Gag que favorece la asociación y reconocimiento de los ARNs genómicos y su dimerización. En el caso del VIH, el ensamblaje de los viriones requiere de colesterol por lo que se lleva a cabo en las balsas lipídicas membranales (D'Souza y Summers, 2005). Así mismo, se requiere de una señal de empaquetamiento conocida como sitio ψ , el cual marca aquellos transcritos que deben ser incluidos en viriones. Esto se debe a que los transcritos que fueron modificados no la presentan. Este sitio se encuentra aproximadamente 120 nucleótidos río arriba del sitio del codón de iniciación del gen *gag* (D'Souza y Summers, 2005).

Finalmente, una vez que se ensambla el virión, éste es liberado de la célula al gemar desde la membrana celular cubierta de los productos del gen *env*. Una característica importante del ciclo de vida de los lentivirus es que la célula infectada produce de manera estable viriones, sin cambiar de manera dramática su desarrollo, esto permite el establecimiento de líneas celulares productoras de virus (Robbins y Ghivizzani, 1998). La figura 4 esquematiza el ciclo de vida de un lentivirus típico.

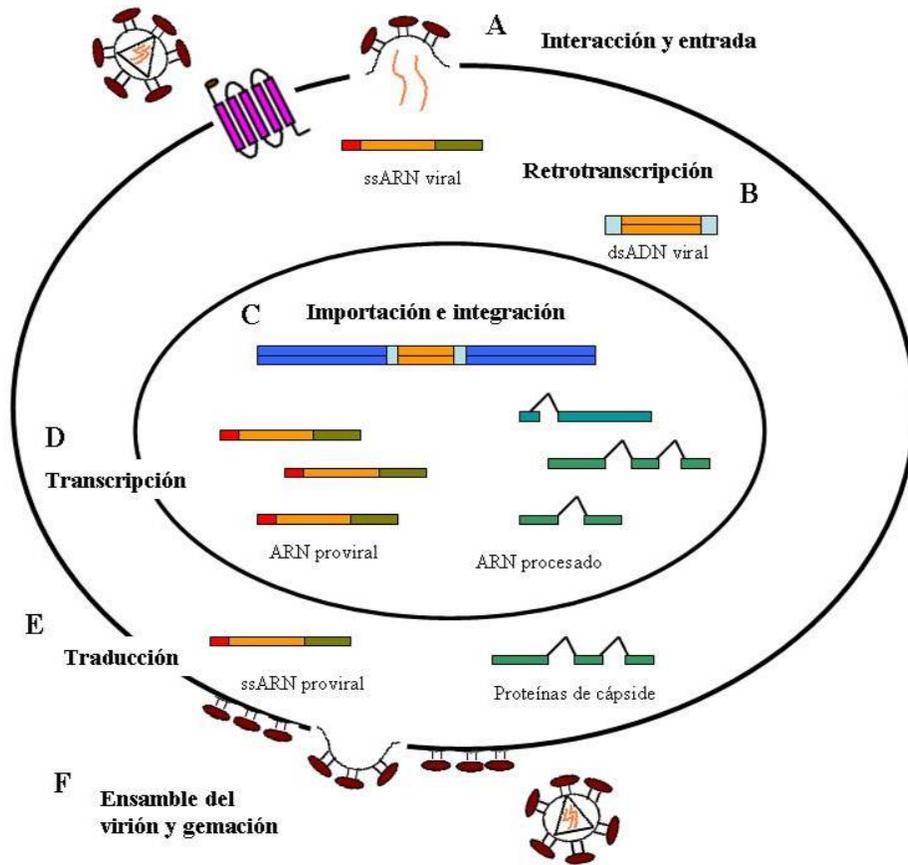


Fig.4. Ciclo de vida de *Lentivirus*. A) Interacción, adsorción y entrada a la célula. B) síntesis del dsDNA. C) Integración. D) Transcripción, corte y empalme y exportación desde el núcleo. E) Traducción y encapsidación. f) Ensamble del virión y gemación

2- Diseño y construcción de los Vectores Lentivirales

2.1- Desarrollo de los primeros vectores

La oportunidad de utilizar lentivirus como vehículos para la expresión de genes exógenos a células ha sido reconocida y explorada desde 1979 (Cline, 1985). La idea general de una aproximación de este tipo radica en las características ventajosas que éstos proveen como son: su integración estable al genoma de las células hospederas; una amplia variedad de hospederos; la capacidad de “carga” de material genético foráneo; su baja toxicidad en algunos casos y la necesidad de un bajo número de copias para lograr la transducción. Sin embargo, también presentan diversas desventajas como pueden ser, citotoxicidad, la aparición de recombinaciones no deseadas que producen retrovirus competentes para la replicación (RCRs, del inglés replication competent retrovirus); y la disrupción, activación o mutación de genes del hospedero en los sitios donde se pudieran insertar (Cline, 1985. Ramezani y Hawey, 2002). Por lo anterior, se han desarrollado diversas soluciones y alternativas para superar dichas desventajas así como para mejorar aspectos en la expresión de los transgenes, aumentar su tropismo etc. Incluso, se han diseñado y desarrollado vectores que incorporan a más de uno de estas soluciones para que superar sus limitaciones iniciales.

La generación de vectores lentivirales requiere en principio de la segregación en diferentes plásmidos de las secuencias que actúan en *cis* que son necesarias para la transferencia del genoma viral funcional hacia las células blanco de aquellas secuencias que codifican proteínas estructurales y enzimáticas. De esta manera, la segregación de las secuencias se hace por medio de la construcción de por lo menos 3 diferentes vectores. El vector de transferencia consiste de las secuencias que actúan en *cis*, LTRs, el sitio de unión del cebador (PBS), señal de empaquetamiento, PPTs y el RRE, unidos a un transgen de interés en contexto con una unidad transcripcional. En adición al anterior, se requieren plásmidos de expresión que codifican para el empaquetamiento y proteínas de envoltura y que a su vez carecen de la mayoría o de todos los elementos en *cis*. Estos tres plásmidos se

cotransfectan en una línea celular apropiada para la generación de viriones funcionales que se ensamblen y emerjan de las células huéspedes (Ramezani y Hawley, 2002).

En 1996, el grupo de Trono reportó por primera vez el desarrollo de vectores a partir del VIH, (Naldini et al, 1996). El objetivo principal de este trabajo fue proporcionar evidencia de la factibilidad de utilizar un vector generado a partir de VIH para incorporar de manera estable ADN foráneo a células que no se dividen, esta última habilidad está dada por Vpr, IN así como por MA que interactúan con la maquinaria de importación nuclear para transportar de manera activa el complejo de preintegración a través del nucleoporo (Ramezani y Hawley, 2002).

El desarrollo del vector requirió del diseño de un sistema de expresión de tres plásmidos, a los cuales se les conoce como sistema de primera generación (Ramezani y Hawley, 2002). Constan de un primer plásmido que contiene toda la información relevante para el empaquetamiento así como de todos los genes que codifican para las proteínas necesarias en trans (*gag* y *pol*), bajo el control del promotor temprano de citomegalovirus (CMV) en éste, la señal de empaquetamiento φ fue eliminada, pero el sitio donador de corte y empalme (SD) fue conservado. Este plásmido no codifica para las proteínas de la envoltura ni para Vpn. Finalmente, la LTR del extremo 3' fue sustituido por la señal de poliadenilación del gen de la insulina justo después del marco de lectura de *nef*. Esto con el fin de eliminar los elementos en *cis* de esta región involucrados en el empaquetamiento, transcripción, e integración de los transcritos generados a partir de este plásmido. El segundo plásmido fue elaborado con el fin de aumentar el tropismo del virión. Se utilizó el gen que codifica la glicoproteína G del virus de estomatitis vesicular (VSV) para pseudotipar, esto es proporcionar una envoltura heteróloga a los productos codificados por el primer plásmido. Además, esta proteína es más resistente al daño mecánico por lo que se puede separar por ultracentrifugación sin dañarla. La pseudotipación proporciona a los vectores un tropismo mayor lo que le permite infectar a un mayor rango de tipos celulares debido a la capacidad de la proteína VSV-G de unirse al componente fosfatidil serina de la bicapa lipídica presente en la membrana celular de la mayoría de células eucariotas (Schlegel et al., 1983). El tercer plásmido codifica para todos los elementos en *cis*

requeridos para el empaquetamiento, transcripción reversa e integración, así como sitios de restricción para la clonación de ADNs heterólogos complementarios. En este vector se incluyó el elemento RRE, con el propósito de aumentar la eficiencia del empaquetamiento, asegurar que se diera una transcripción eficiente y favorecer la exportación hacia el citoplasma únicamente de transcritos no cortados en la presencia de Rev y Tat, ambas proteínas codificadas por el plásmido de empaquetamiento. En ausencia de ellas, la única actividad detectable sería la actividad basal del promotor del vector. Finalmente se incorporó el gen de β -galactosidasa al plásmido justo río abajo del promotor temprano CMV como gen reportero (Fig.5).

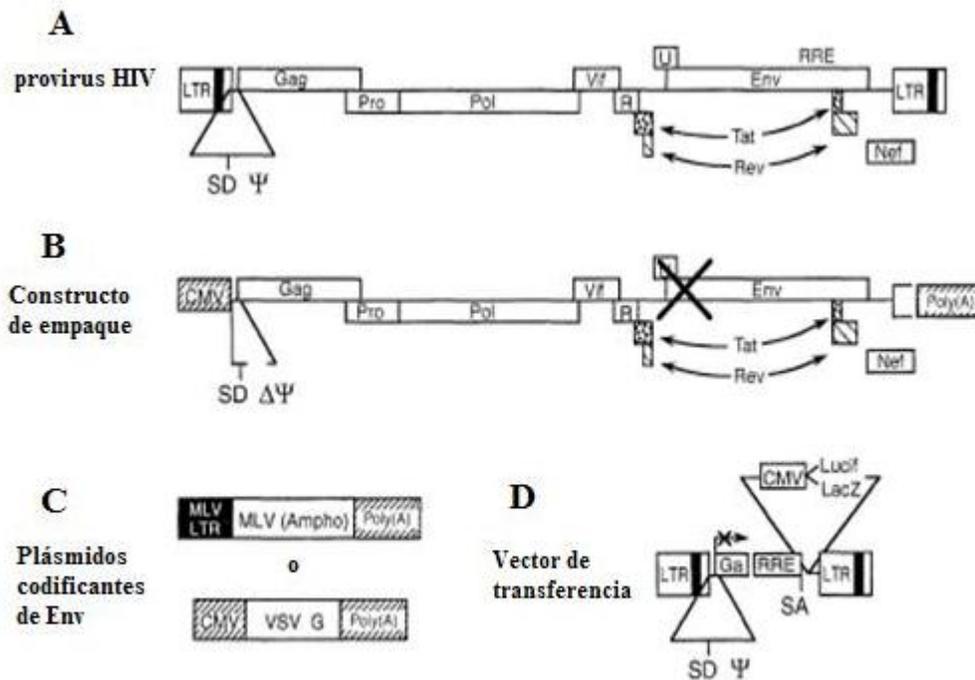


Fig.5. Representación esquemática del provirus VIH así como del sistema de expresión de tres plásmidos utilizado por Naldini et al (1996). A) Para el provirus VIH se muestra la región codificante para las proteínas virales. El sitio donador del splicing (SD) así como la señal de empaquetamiento ψ se indican. B) En el plásmido de empaquetamiento el marco de lectura de *env* y *vpu* están bloqueados. C) En el plásmido de la envoltura se muestran el LTR de VLM y el promotor CMV para flanquear el gen *mlv* y *vsv g* respectivamente así como los sitios poli (A). D) En el vector de transferencia *gag* está truncado y fuera del marco de lectura y el promotor interno CMV se utiliza para controlar la expresión de los reporteros β -galactosidasa o luciferasa. Se muestran el elemento de respuesta a Rev (RRE) así como el sitio aceptor del splicing (SA). (Naldini et al. 1996).

Estos plásmidos fueron cotransfectados en células de riñón humano 293T, en donde las partículas virales fueron ensambladas. Posteriormente, los viriones obtenidos fueron

utilizados para transducir fibroblastos murinos 208F. Se demostró la alta eficiencia en la transducción por el lentivirus cuando se comparó con un vector derivado de VLM por medio de títulos virales (Naldini et al, 1996). Así mismo, estos vectores mostraron una alta capacidad de transducir células que no se dividen *in vivo* de una manera eficiente; integrarse de manera estable, y de presentar expresión del transgen (β -galactosidasa) por un periodo largo de tiempo, 30 días postransducción.

Sin embargo, posteriormente se demostró que ninguno de los cuatro genes accesorios *vif*, *vpr*, *vpu* o *nef* son requeridos para la replicación del VIH en líneas celulares inmortalizadas o para la generación eficiente de viriones pseudotipados con VSV-G (Miller and Sarver, 1997 y Zufferey et.al., 1997) Esto dio lugar a los sistemas lentivirales de segunda generación (Ramezani y Hawley, 2002). Estos sistemas utilizan un constructo de empaquetamiento atenuado que contiene únicamente los genes *gag*, *pol*, *rev* y *tat*. Aunque la eliminación de los genes accesorios no tuvo ningún efecto en los títulos virales pseudotipados en células 293T, la eficiencia de transducción en los macrófagos disminuyó un 50%. Esto tal vez se debió a la falta de la proteína Vpr (Zufferey et.al. 1997). Por lo que es muy probable que algunos de estos genes accesorios sean necesarios para una transducción efectiva de macrófagos (Ramezani y Hawley, 2002) (Fig.6). Lo anterior limita el tipo celular que puede ser infectado por un vector determinado de acuerdo a su diseño, por lo que se debe tomar esta característica en cuenta (Amado y Chen, 1999).

Tal y como Cohen menciona en su comentario en Science (1996) al respecto de la publicación del trabajo de Trono (Naldini et al, 1996), una de las principales preocupaciones del uso de VIH como vector es la posibilidad de que éste recombine, se convierta a una forma virulenta y cause una enfermedad similar al SIDA. En la actualidad, el diseño de vectores lentivirales debe ser realizado de manera muy meticulosa ya sea con fines comerciales o para investigación y se encuentra regulado por agencias gubernamentales como la Agencia Europea de Medicinas (EMEA, 2005, Manilla, et al, 2005). Esto ha resultado en el desarrollo de los llamados sistemas lentivirales de tercera generación (Dull, et.al., 1998) (Fig. 6). Estos contienen una delección de 400pb en las 5' LTRs en la región del promotor lo que impide la transcripción de los genes del vector y

dejan esta región virtualmente inactiva. Esto produce un vector autoinactivante (SIN, del inglés self-inactivating). El gen reportero o terapéutico se expresa a partir de un promotor exógeno que está insertado en la región 5'LTR en el vector lentiviral. Estas modificaciones minimizan la posibilidad de la creación de formas recombinantes del vector, así como la probabilidad de mutagénesis causada por la inserción (Miyoshi, et al, 1998) sin afectar los títulos virales aun con la ausencia del gen *tat* (Ramezani y Hawley, 2002). De esta manera, los genes *gag*, *pol* y *rev* pueden ser expresados a partir de dos plásmidos por separado (Dull, et.al., 1998). Así mismo, una región de 99pb conocida como “DNA flap”, involucrada en la importación del complejo de integración hacia el núcleo es conservada en los sistemas de tercera generación mientras que en los anteriores éste era eliminado. Esta característica facilita la eficiencia de transducción tanto en células en división, así como en células en reposo de varios tipos (Ramezani y Hawley, 2002) (Fig.6).

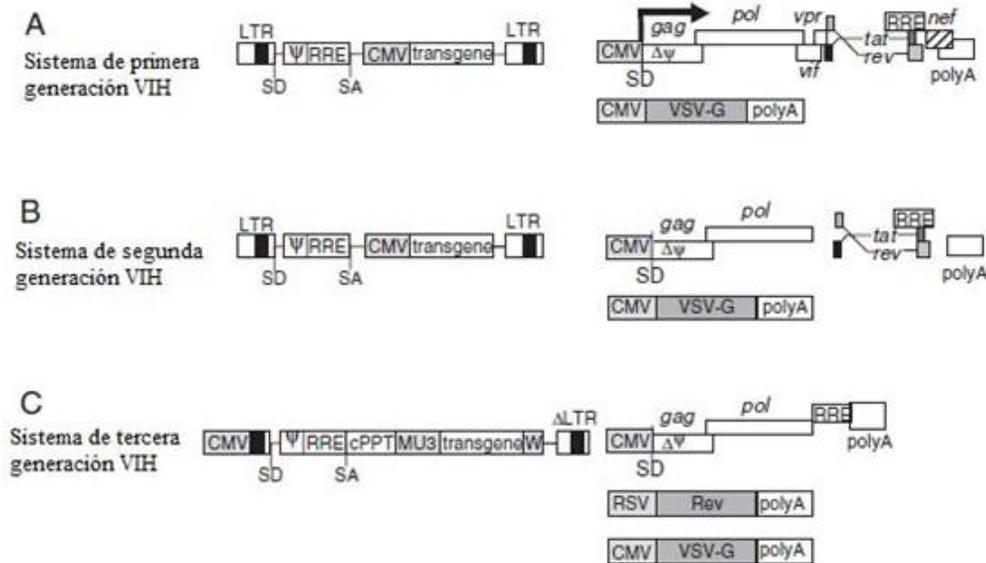


Fig.6. Representación esquemática de varios sistemas de vectores basados en el VIH-1. (A) Vector de primera generación que expresa todas las proteínas del VIH-1 excepto por Vpu y Env. Las partículas del vector están pseudotipadas con la glicoproteína VSV-G expresada de un plásmido separado. (B) Vector de segunda generación con todos los genes accesorios removidos. (C) Vector de tercera generación independiente de Tat. El vector de transferencia SIN contiene un cPPT para una importación eficiente al núcleo y utiliza un promotor interno MSCV LTR (MU3) y el WPRE (W) para un nivel alto de expresión del transgen. Los plásmidos de empaque codifican únicamente para las proteínas Gag, Pol y Rev. (Ramezani y Hawley, 2002).

Además de la incorporación exitosa de diversos promotores exógenos, se han identificado otros elementos que estimulan la expresión postranscripcional de los transgenes. Tal es el

caso del elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de marmota (WPRE). Este elemento se sugiere aumenta la poliadenilación y el procesamiento del extremo 3'. La incorporación de WPRE ha demostrado aumentar los niveles de expresión por lo que se incluye de manera rutinaria en los sistemas lentivirales de tercera generación (Ramezani et al., 2000) (Fig. 8). Finalmente, una estrategia adicional para desarrollar lentivirus seguros en humanos es la utilización de lentivirus no humanos tales como aquellos derivados del EIAV, VIF, y BIV (Olsen, 1998; Curran, 2000; Matukonis et al, 2002). A continuación se describen los diseños de los vectores lentivirales usados de manera más común en la actualidad.

2.2- Lentivirus Pseudotipados

A pesar de la relativa dificultad en el rediseño extensivo del genoma lentiviral requerido para desarrollar vectores seguros y que puedan ampliar su tropismo a más tipos celulares de aquellos "naturales", esto se ha logrado en repetidas ocasiones (Walther y Stein, 2000, Ramezani y Hawey, 2002, Han et al, 2009). La mayoría de los virus con envoltura interactúan con sus células blanco por medio de receptores extracelulares y son internalizados por endocitosis. De esta manera el virus se fusiona con la membrana del endosoma y libera su genoma a la célula blanco para después hacer uso del citoesqueleto para transportarse a las regiones perinucleares (Joo y Wang, 2008). Este proceso es por lo tanto altamente específico. Es frecuente sin embargo que la aplicación de los lentivirus en terapias o en la investigación requiera de la transducción de un determinado tipo celular el cual no es normalmente blanco del vector lentiviral utilizado. A pesar de que ciertas glucoproteínas de la envoltura son lo suficientemente plásticas como para aceptar la inserción de nuevas moléculas de reconocimiento relevantes para su debido tropismo (péptidos, anticuerpos, factores de crecimiento, etc), esta manipulación puede afectar de manera adversa las interacciones de los dominios de acoplamiento y fusión de dichas glicoproteínas, lo cual resulta en vectores con baja eficiencia de infectividad en sus células blanco (Joo y Wang, 2008., Lei et al, 2009.).

Una solución para aumentar el espectro de transducción de los virus consiste entonces en cambiar las proteínas de la membrana viral por otras que proporcionen el tropismo de interés, proceso conocido como pseudotipación (Yee et al, 1994), el cual que se puede realizar mediante la segregación del genoma viral en diferentes vectores. De esta manera, la pseudotipación utilizando la glicoproteína del virus de estomatitis vesicular (VSV-G del inglés vesicular stomatitis virus) ha probado aumentar el tropismo a un amplio rango de células blanco al grado de ser normalmente utilizado en diversas aplicaciones como lo son la infección de células de Müller de retinas, células granulares de hipocampo, células gliales en espina dorsal y células troncales neuronales (Greenberg et al, 2007; van Hooijdonk et al, 2009; Meunier y Pohl, 2009; Jandial et al, 2008). Aún cuando la pseudotipación con VSV-G ha dado muy buenos resultados, esta modificación puede realizarse con otras glicoproteínas. Tal es el caso de la glicoproteína del virus de la rabia (RV-G) que además de ampliar el espectro de infección del lentivirus (Rahim et al, 2009), facilita ésta última al presentar transporte retrógrado tanto en cerebros murinos como primates (Kato et al, 2007).

Además de la pseudotipación en el sentido hasta ahora referido, se han logrado avances para llevar este aumento de tropismo en conjunto con especificidad hacia nuevos tipos celulares por medio del diseño de vectores lentivirales que expresen dominios de fusión determinados principalmente enfocados a reducir el efecto “off target” en la terapia génica (Joo y Wang, 2008; Lei et al, 2009). De esta manera el grupo de Lei en el 2009 logró aumentar significativamente la especificidad y la eficiencia en la transducción de células CD-20 positivas hasta 17 veces más en relación al fenotipo silvestre mediante la incorporación de mutaciones dirigidas al dominio de fusión de la molécula fusiogénica (FM) de la glicoproteína del virus sinbis en conjunción con un anticuerpo α CD-20 en un vector lentiviral derivado del mismo virus (Lei et al, 2009). Del mismo modo, Joo y Wang (2008) lograron estudiar los procesos de anclaje, endocitosis y posterior tráfico intracelular de un vector lentiviral en asociación con células CD-20 positivas.

Este tipo de aproximación permite diferenciar y eficientar de manera independiente los procesos de reconocimiento de la célula blanco por parte del lentivirus, que están dados por

la interacción del anticuerpo α CD-20 y su receptor; de los procesos de fusión y endocitosis, los cuales dependen de la interacción de la molécula fusión con el endosoma. Sin embargo, en términos de la velocidad de transducción, este procedimiento resulta más lento que el pseudotipaje convencional con VSV-G por lo que representa un desafío que debe ser superado para mejorar la eficacia de transducción con lentivirus (Joo y Wang, 2008).

2.3- Lentivirus Autoinactivantes

Durante el ciclo de vida de un retrovirus, la región U3 del LTR 3' es duplicada para formar la región correspondiente del LTR 5' durante el proceso de transcripción reversa y síntesis de ADN viral en células infectadas. Como se ha mencionado anteriormente, en el caso del VIH-1, esta región LTR 5' regula el proceso de transcripción del virus. El elemento central de la región U3 que es esencial para la replicación viral y la actividad del promotor contiene una caja TATA y tres sitios de unión para el factor de transcripción Sp1. En la zona río arriba de los sitios de unión para Sp1 se encuentran en tandem sitios de unión para el factor NF- κ B que constituyen un elemento potenciador; por lo que la eliminación de estos elementos de las LTR resulta en la inactivación completa del proceso de movilización de vectores que pudieran ser competentes para la replicación en la célula; al tiempo que la mutación en el U3 reduce a su vez la posibilidad del surgimiento de viriones competentes para la replicación al no estar completo el sistema de replicación viral. Sin embargo, esta mutación permite una expresión controlada de los genes exógenos incorporados al vector por medio de la incorporación de un promotor independiente (Miyoshi et al, 1998). Si se introducen mutaciones o deleciones sitio- dirigidas a esta zona del genoma viral como puede ser la remoción completa de la región U3 excepto por unas cuantas bases en los extremos 3' y 5' del LTR , se obtiene un provirus capaz de integrarse al genoma de la célula huésped incapaz de moverse por lo menos en títulos detectables y que reduce hasta en 200 veces la concentración de transcritos virales, mientras genera títulos virales comparables a los de vectores sin esta modificación (Miyoshi et al, 1998; Schnell et al, 2000).

Esta modificación que es muy común en investigaciones que tienen por objeto desarrollar vectores más seguros logra disminuir la probabilidad de aparición de vectores capaces de replicarse hasta en dos órdenes de magnitud con respecto a los vectores sin ella (Schnell et al, 2000). Así mismo, no interviene con la capacidad de generar títulos virales ya que la señal de empaquetamiento ψ es suministrada en un plásmido independiente (vector de transferencia) en el momento de la transfección (Naldini, 1996).

Este tipo de vectores ha sido utilizado en la generación de modelos experimentales de ciertas enfermedades como la enfermedad de Huntington. Pereira de Almeida et al (2002) lograron desarrollar un modelo de esta enfermedad por medio de lentivirus autoinactivantes. Esta aproximación resulta más rápida, menos complicada y costosa que la generación de organismos transgénicos por métodos convencionales, mientras reduce el riesgo de mutagénesis insercional y replicación permitiendo modelos más estables (Pereira de Almeida et al, 2002). Así mismo, debido a esta última característica, Wang et al (2008) realizaron estudios de manipulación genética en células madre de primates. Esa manipulación consistió en transducir células madre de monos cynomolgus con un vector lentiviral autoinactivante que expresa eGFP, para posteriormente determinar si esta manipulación resultó en una pérdida de potencial de diferenciación por parte de las células tratadas. Los resultados sugieren que no hay efecto de la manipulación por parte del lentivirus. Sin embargo, es evidente que esta evidencia descansa en el hecho de que el vector utilizado es un vector autoinactivante.

2.4- Lentivirus con Defectos en la Integrasa

El proceso de integración del genoma retroviral al ADN del hospedero depende de la acción directa de la enzima integrasa. Ésta corta el extremo romo del ADN lineal del virus en una reacción endonucleolítica temprana, lo que resulta en la eliminación de 2 nucleótidos de los extremos 3' de los dupletes de ADN viral. Este evento activa a su vez los recién formados extremos terminales 3' del ADN viral permitiendo una reacción de transferencia en la que éstos se enlazan de manera covalente con los extremos 5' del ADN

del hospedero que fueron formados previamente a partir del corte realizado por la integrasa viral. Este último paso que comprende la reparación del ADN para eliminar espacios, es realizado probablemente por enzimas del hospedero (Wiskerchen y Muesing, 1995).

El estudio de este aspecto del ciclo de vida retroviral ha sido utilizado de manera cotidiana durante los últimos años ya que mediante análisis de los sitios de integración predominantes para los lentivirus derivados del VIH-1 muestran que éstos tienden a integrarse en *loci* activos transcripcionalmente en frecuencias de entre el 70 – 80% en un amplio rango de tipos celulares (Staunstrup et al, 2009). De acuerdo con Staunstrup et al. (2009) la integrasa es el factor determinante de la especificidad en la integración del genoma viral dentro del genoma del hospedero además de ser necesaria para el transporte del complejo de integración a través de la membrana nuclear por medio de interacciones con factores de unión al ADN hospedero. Tal es el caso del factor de crecimiento coactivador de la transcripción derivado del epitelio del cristalino p75 (LEDGF/p75). En células en las cuales LEDGF/75 se encuentra depletado, se pierde la tendencia de la integración en *loci* altamente activos.

La integración sesgada hacia los sitios transcripcionalmente activos causa un alto riesgo de mutagénesis relacionada con la integración lo que puede inutilizar genes basales en las células infectadas. Por lo anterior, se han desarrollado vectores lentivirales que superan esta desventaja por medio de la interrupción de la integración mediante la mutación sitio dirigida de la integrasa lentiviral o bien, mediante el desarrollo de sistemas híbridos que conjunten actividades de elementos como los transposones por ejemplo *Sleeping Beauty* (SB) con los del lentivirus (Staunstrup et al, 2009).

Las integrasas retrovirales están compuestas por tres dominios funcionales distintos, los cuales son necesarios para una reacción completa de integración (Petit et al, 2000). Aunque se han realizado trabajos para determinar la relevancia de cada uno de éstos por medio de ensayos funcionales con mutaciones sitio dirigidas (Wiskerchen y Muesing, 1995., Engelman et al, 1995., Petit et al, 2000., Nakajima et al, 2001), sólo aquellas que alteran la secuencia del segundo dominio tienen la capacidad de mantener la actividad transcripcional

mientras se interrumpe la acción de integración (Stevenson et al, 1990., Wiskerchen et al, 1995). Como se ha mencionado, la integrasa se encuentra codificada hacia la región 3' del gen *pol*, por lo que si se incorporan mutaciones que resulten en la delección los últimos 146 amino ácidos de la proteína, se obtienen viriones que son incapaces de integrarse al genoma de las células hospederas pero que mantienen la capacidad de expresión del resto de los genes (Stevenson et al, 1990, Wiskerchen et al, 1995). Sin embargo, otras mutaciones dentro de este gen producen los mismos resultados (Nakajima et al, 2001; Okada et al., 2009).

En la actualidad, las mutaciones clase I dentro de la región codificante de la integrasa son las más utilizadas para desarrollar vectores lentivirales defectuosos de la integrasa que sea mas seguros y que potencialmente tengan aplicaciones en terapia génica. De esta manera se han podido desarrollar vectores que aunque se mantienen episomales, mantienen la capacidad de transcripción de sus demás genes incluyendo reporteros además de la capacidad de infectar células en división o en interfase de manera sostenida en modelos *in vivo* e *in vitro* (Philippe et al, 2006). Se han logrado niveles de eficiencia comparables a los de los lentivirus integracionales en la transducción y expresión génica en neuronas nigroestriatales de cerebros de murinos adultos e *in utero* así como en neuronas de los tractos rubroespinales y corticospinales en adultos sin mostrar niveles significativos de respuesta de microglía (Rahim et al, 2009).

Finalmente, la utilización de vectores lentivirales defectuosos en la integrasa se ha extendido en investigaciones que tienen como objetivo hacer modificaciones genéticas en células troncales de murinos (Jandial et al, 2008., Okada et al, 2009). De esta manera se pretende establecer las bases para la corrección de mutaciones genéticas hereditarias (Okada et al, 2009) o bien para expandir los alcances de diversos aspectos de la investigación de células troncales como son la diferenciación selectiva de las células troncales, su perpetuación/inmortalización y estudios de mapeo (Jandial et al, 2007). Los resultados de estos estudios demuestran que la infección lentiviral es capaz de producir la expresión de los genes reporteros utilizados sin afectar la pluripotencialidad de las células manipuladas (Okada et al, 2009). Además, no disminuye la expresión ya que la naturaleza

episomal del vector permite que éste se amplifique asegurando altos niveles de expresión y que ésta última sea sostenida ya que el episoma se transfiere de manera muy eficiente durante la división celular (Jandial et al, 2008). Adicionalmente, se demostró que las características adquiridas mediante la transducción se transmiten a través de la línea germinal de manera exitosa. Esto sin duda genera un potencial para su utilización en la generación de animales genéticamente modificados cuya aplicación puede ser muy variada tanto en ciencia básica como en aplicada (Okada et al, 2009).

2.5- Sistemas Lentivirales Inducibles y Regulables

Se han propuesto sistemas inducibles que sean capaces de activarse e inactivarse mediante la administración de moléculas externas como la tetraciclina (Régulier et al, 2003) ó con sistemas de reversión de la inserción como los casetes Cre-Lox los cuales pueden escindirse mediante la recombinasa Cre (Ventura et al, 2004) Se han desarrollado también otros vectores que incorporan elementos aisladores de la cromatina que protegen al vector de efectos de posición dentro del genoma, y a la expresión génica del huésped de los potenciales efectos del vector (Lowen y Poeschela, 2005) (Fig.7).

Finalmente, la enzima de edición del genoma APOBEC3G también puede ser utilizada para el desarrollo de vectores seguros (Lowen y Poeschela, 2005). APOBEC3G funciona asociándose al genoma viral en las células donde el virión es ensamblado y no en la célula blanco; edita la cadena rezagada de ADN durante la transcripción reversa, lo cual resulta en una deaminación de citidinas lo que causa mutaciones en la cadena líder de G→A las cuales son altamente deletérias y letales para el virión (Mangeat et al., 2003., Zhang et al., 2003). La acción de APOBEC3G es normalmente contrarrestada por la acción de la proteína viral Vif (Sheey et al., 2002). De esta manera, la propagación de virus en líneas celulares que carezcan de la expresión de APOBEC3G es posible y así la eliminación de *vif* dentro del vector es viable. De esta manera, los viriones producidos mediante los vectores quedarían siempre expuestos a la acción de APOBEC3G (Loewen y Poeschela, 2005).

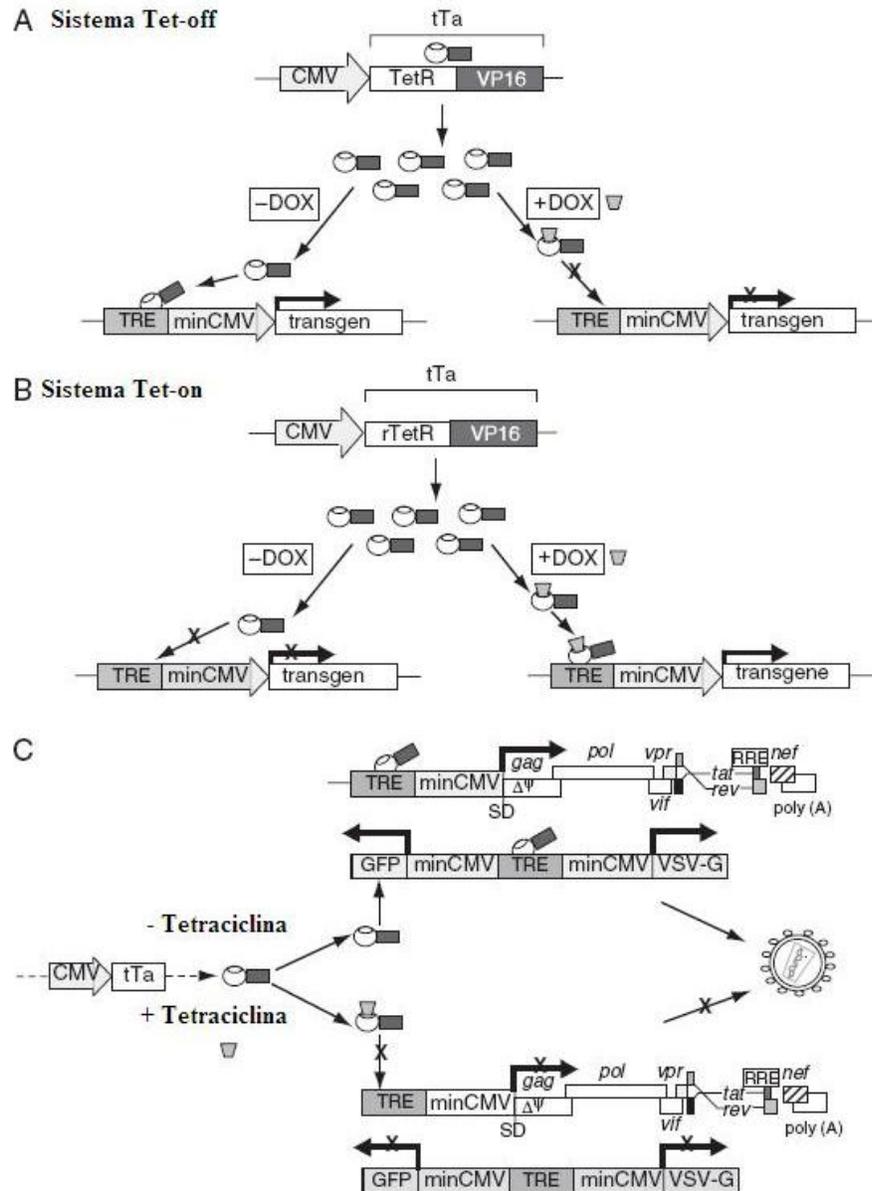


Fig.7. Representación esquemática del sistema de empaquetamiento regulado por tetraciclina. (A) Principio del sistema de expresión “tet-off”. El transactivador controlado por tetraciclina (tTA) se genera mediante la fusión de la proteína represor de tetraciclina (TetR) al dominio de activación de la proteína VP16 del virus de herpes simplex. En ausencia de tetraciclina o doxiciclina, tTA se une al elemento responsive a tetraciclina del promotor (TRE) y estimula la transcripción del transgen. (B) Principio del sistema de expresión “tet – on”. Un mutante TetR (rTetR) se crea mediante cuatro cambios aminoácidos en TetR para posteriormente fusionarlo al dominio de activación de la proteína VP16 del virus de herpes simplex para generar un transactivador reverso controlado por tetraciclina (rtTA). rtTA se une al TRE en la presencia de doxiciclina y estimula la transcripción. (C) Ejemplo de un sistema de empaquetamiento VIH-1 regulado por tetraciclina. Las células de empaquetamiento expresan tTA de manera constitutiva lo que permite la expresión del constructo de empaquetamiento de VIH-1 y el gen de la envoltura glicoprotéica VSV-G en la ausencia de tetraciclina. Con el fin de monitorear el proceso de inducción, el gen reportero GFP es coexpresado con el gen VSV-G desde un promotor bidireccional responsive a tetraciclina (Ramezani y Hawley, 2002).

2.6- Lentivirus con otras modificaciones

Como se ha visto, la flexibilidad en el diseño, permite una amplia gama de aproximaciones para generar un gran número de vectores lentivirales mediante la combinación de varias características de las tratadas hasta ahora. Sin embargo, existen modificaciones adicionales que consisten en la adición de elementos específicos dentro de la estructura del vector con el fin principal de aumentar los niveles de expresión génica, regularla a conveniencia e incluso dirigirla.

Una de las modificaciones más comunes consiste en la adición del elemento bloqueador de la transcripción (TB, del inglés, *transcription blocker*) para evitar la expresión aberrante de un gen por parte de un promotor diferente al que debe regularlo (Geller et al, 2007). Típicamente el TB está compuesto por sitios de poliadenilación y sitios para la pausa de la transcripción (Clontech, 2000). Esto permite la identificación de elementos clonados dentro del vector que afectan negativamente la expresión del transgen así como establecer niveles basales de expresión génica que ayudan a los procesos de normalización de datos en los experimentos de citometría de flujo (Geller et al, 2008).

Así mismo, las regiones asociadas a la matriz (MARs del inglés matrix associated region) son típicamente utilizadas en la construcción de vectores así como el elemento aislante del gen de la β -globina de pollo HS4 (Semple-Rowland et al, 2007). Estos elementos forman unidades transcripcionales independientes al establecer límites entre ellas y disminuir el efecto de posición (Mlynárova et al, 1995). En el caso particular de los MARs se ha propuesto que estos elementos fijan porciones de los cromosomas a la matriz intranuclear mediante la interacción de su secuencia rica en A/T con proteínas nucleares, aislándolas del resto del material genético (Carey y Smale, 1999).

Como se ha mencionado anteriormente, otro elemento muy común en las construcciones lentivirales es el elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de marmota (WPRE). Está compuesto por tres elementos independientes que actúan de manera cooperativa mediante la interacción de sus ARNs con proteínas de unión al elemento

regulador postranscripcional (Donello et al, 1998). Por lo que WPRE, actúa aumentando la expresión génica viral mediante la modificación de la poliadenilación, exportación y / o traducción del ARN transcrito (Donello, et al, 1998., Xu et al, 2003).

Finalmente, todos los elementos hasta ahora mencionados se pueden incluir simultáneamente en un vector para obtener características determinadas específicas así como flexibilidad funcional. De esta manera, la construcción de vectores con dos transgenes regulados independientemente se ha reportado con el fin de desarrollar vectores de uso terapéutico (Semple-Rowland et al, 2007, Tian y Andreadis, 2009). En general, estos vectores presentan elementos MAR y otros aisladores como el HS4. El tener dos unidades transcripcionales independientes permite entregar dos genes distintos a dos poblaciones celulares distintas de manera simultánea. Así, se puede comparar de manera confiable la expresión de cada uno de los genes en cada uno de los tipos celulares, ya que las copias del gen son exactamente las mismas para los dos transgenes; se puede obtener expresión específica de uno de los transgenes en un tipo celular, mientras que el otro se expresa de manera generalizada (Semple – Rowland et al, 2007, Tian y Andreadis, 2009). Sin embargo, es importante notar que en el diseño de los vectores y la adición de elementos a éstos, la actividad de un mismo promotor en dos líneas celulares puede presentar variaciones debido al contexto en el que éste se encuentra inmerso. Mao et al (2008) demostraron que el promotor CMV, normalmente considerado como la mejor opción para sobre expresar transgenes en líneas celulares, puede ser superado por otros promotores como el EF1 α incluso si el primero cuenta con elementos potenciadores como el WPRE por lo que se deben determinar los niveles de expresión de diferentes promotores y sus combinaciones con los elementos antes mencionados para construir vectores que satisfagan los requerimientos experimentales (Mao, et al, 2008).

3- Aplicación de los lentivirus en la Investigación Científica

Los lentivirus han sido el foco de un gran interés en la investigación en un principio, debido a su potencial patológico. Sin embargo, la investigación de los lentivirus ha contribuido a muchas otras disciplinas particularmente la Inmunología, Biología Molecular y Celular así como a la Virología. El ejemplo clásico de las aportaciones del estudio de los lentivirus es el descubrimiento de la necesidad de los receptores de quimiocina para la fusión de las membranas de VIH/VIS con sus células blanco. Así mismo, los estudios del mecanismo de la función de Rev han descubierto nuevas vías para el transporte celular desde y hacia el núcleo. La aplicación más directa sin embargo, es la de transducir una gran variedad de tipos celulares como son los neuronales, hepáticos y hematopoiéticos (Naldini et al, 1996., Ren et al, 2007., Zhang et al, 2008).

3.1- Neurobiología y enfermedades neurodegenerativas

En el campo de la Neurobiología, el uso de los lentivirus ha mostrado ser muy útil tanto en ensayos *in vivo* como *in vitro*. Por ejemplo, se utilizaron vectores lentivirales basados en aquel desarrollado por Naldini en 1996 para transducir explantes células de ratón y humano provenientes del ganglio de la raíz dorsal. De acuerdo a Fleming et al (2001), esta fue la primera vez que se utilizaron estos vectores para transducir tipos celulares nerviosos que no corresponden al sistema nervioso central. Los resultados de estos experimentos muestran que los lentivirus pueden transducir eficientemente estas células y pueden mantener niveles de expresión por alrededor de 21 días (Fleming et al, 2001). Así mismo, los sistemas lentivirales se han ocupado para explorar su capacidad de transducción en diferentes tipos neuronales en tejidos como la retina (Lotery et al, 2002). Este estudio es de importancia ya que se utilizaron vectores de origen VIF para transducir β -galactosidasa a retinas primates. Se observó que además de transducir fotorreceptores y células epiteliales pigmentadas de la retina, el vector utilizado fue capaz de transducir células de Müller. Esto es relevante ya que desde el punto de vista funcional, este tipo celular tiene contacto con todos los demás tipos celulares del tejido retiniano además de que en todos los padecimientos que implican degeneración retinal, se observa gliosis de las células de Müller. Lo anterior sugiere que la transducción estable de las células de Müller podría tener

diversas aplicaciones clínicas como la terapia génica para desórdenes hereditarios que se presentan en este tipo celular (ej. retinoschisis ligada al cromosoma X).

La formación de cicatrices gliales o gliosis es una característica morfológica de importancia en el sistema nervioso lesionado que impide la sobrevivencia de las células nerviosas y que tiene como resultado la limitación de la plasticidad neuronal e impide la regeneración axonal (Desclaux et al, 2009). Esta reacción por parte de astrocitos reactivos, microglia, precursores de oligodendrocitos, células de Schwann y fibroblastos, es de carácter bioquímico y físico ya que éstos producen una serie de moléculas inhibitorias del crecimiento como proteoglicanos sulfatados de condroitina y tenascina C. La proteína fibrilar ácida glial (GFAP) y la vimentina, ambas componentes principales del citoesqueleto de astrocitos, son dos moléculas asociadas al desarrollo de la gliosis. La investigación de Desclaux et al (2009) se enfocó en analizar la regulación negativa de estas dos moléculas por medio de la transducción de astrocitos murinos en cultivos primarios con dos vectores lentivirales codificantes para ARNs de interferencia pequeños (“*short hairpin*”) contra cada uno de los transcritos (Lv-shGFAP y Lv-shVIM). Esto con la idea de sentar las bases para desarrollar una estrategia novedosa para lograr regeneración axonal en el sistema nervioso central después de una lesión. Los resultados de este estudio demostraron un silenciamiento efectivo de ambos genes que resulta en una formación menor de cicatrización glial así como de neuronas con un área de arborización axonal mayor en comparación con los controles. De esta manera los autores concluyen que la utilización de Lv-shGFAP y Lv-shVIM ya sea solos o en combinación, constituyen una herramienta poderosa para limitar la reactividad de los astrocitos y promover la plasticidad axonal con el potencial de ser utilizado como recurso terapéutico en modelos animales de lesiones del SNC con un énfasis principal en la enfermedad de Parkinson, en la cual, la reactividad astrocítica es un impedimento para la plasticidad axonal espontánea (Desclaux et al, 2009). En el mismo sentido, Wu et al (2009) obtuvieron resultados muy alentadores sobre el crecimiento axonal y la parcial recuperación funcional en ratas con lesiones inducidas en el tracto espinal. A diferencia de Desclaux et al (2009), este estudio tuvo como principal objetivo el inhibir la ruta de señalización de la molécula RhoA-Rho cinasa (ROCK). Muchas moléculas inhibitorias del crecimiento axonal actúan vía la activación de RhoA y su efector ROCK.

Ambas moléculas están implicadas en la regulación del colapso de los conos de crecimiento neuronales, que retraen las neuritas, evitando la regeneración. Esto ocurre ya que ROCK activa a la proteína mediadora de la respuesta de la colapsina 2 (CRMP2). Por lo que al transducir *in vivo* células ganglionares de la raíz dorsal con un lentivirus codificante para un mutante negativo dominante de ROCK (DNROCK) en ratas con una funiculotomía dorsolateral izquierda a nivel de C4 en la médula espinal, se observó la inhibición de la fosforilación de CRMP2. DNROCK presenta mutaciones que evitan su actividad de unión con RhoA pero que se une al dominio catalítico de ROCK y que inhibe su actividad. Además de que se obtuvo una expresión específica eficiente de DNROCK en neuronas ganglionares, se observó un número significativamente mayor de axones creciendo hacia el extremo rostral de la lesión en aquellos individuos tratados con DNROCK que en los controles. Finalmente, las ratas tratadas fueron evaluadas en su movilidad de las patas delanteras en la prueba de exploración vertical espontánea dentro de un cilindro. A partir de la segunda semana posterior a la lesión, se observó que las ratas tratadas con DNROCK movían su extremidad anterior izquierda más que los individuos control y que esta función se mantuvo hasta la semana 10, cuando se dio por concluida la prueba. La evidencia entonces sugiere que se puede promover la regeneración axonal y recuperación funcional de axones lesionados por medio de la supresión de la vía de señalización de RhoA-ROCK usando la transducción de DNROCK con vectores lentivirales. Aunque según los autores, se requiere estudiar otros modelos de lesión así como el conocimiento más profundo de otras vías de señalización para confirmar la efectividad de esta estrategia (Wu et al, 2009).

Los lentivirus también son utilizados comunmente para estudiar aspectos específicos en organismos modelos de diversas enfermedades neurodegenerativas como el Huntington, Alzheimer ó como modelos para estudiar aspectos como el aprendizaje vocal (Perrin et al, 2007, Kanninen et al, 2009 y Agate et al, 2009). En la enfermedad de Alzheimer (AD), se postula que la deposición de la proteína β -amiloide dentro y fuera de las células promueve la neurotoxicidad responsable de la pérdida de neuronas y sinapsis y la gliosis asociada a la enfermedad. Esta neurotoxicidad está asociada a un estrés oxidativo establecido por un ciclo autopromovido en el que la deposición de proteína β -amiloide ($A\beta$) promueve la aparición de prooxidantes que a su vez incrementan la producción de la primera. Sin

embargo, la vía de señalización Nrf2-ARE funciona como un sistema endógeno de protección ante el estrés oxidativo mediante la activación de enzimas protectoras. El factor de transcripción nuclear relacionado a E2 (Nrf2) se une a la secuencia del potenciador de la respuesta antioxidante (ARE) activando así genes citoprotectores. En pacientes con AD se observa que los niveles de Nrf2 en el hipocampo están reducidos por lo que esta proteína es un buen candidato para el tratamiento de esta enfermedad ya que la sobreexpresión de Nrf2 se ha observado protege contra la neurotoxicidad de A β al aumentar la expresión de los genes blanco de Nrf2 que reducen el estrés oxidativo (Kanninen et al, 2009). Al inyectarse un lentivirus codificante para Nrf2 de manera directa en el hipocampo de ratones AD mutantes para la proteína precursora amiloide humana (APP) y presenilina1 (PS1) se logró la transducción de las neuronas del giro dentado, granulares, de canasta y piramidales en CA3 sin evidencia de citotoxicidad causada por la transducción ni por la expresión del transgen. Además, los animales tratados mostraron niveles más bajos de A β soluble, la forma tóxica del los péptido, mientras que los niveles de expresión del gen blanco de Nrf2, la hemoxygenasa-1 (HO-1) fueron mayores con relación a los animales controles. Estos resultados se reflejan a nivel conductual ya que 6 meses después del tratamiento con el lentivirus se sometió a los ratones a la prueba de laberinto de agua de Morris. Los ratones (APP/PS1) se desempeñaron significativamente mejor en la fase de adquisición tardía (3-5 días) con respecto a la temprana (1-2 días), incluso de manera comparable a los sujetos control (Kanninen et al, 2009).

De acuerdo con los autores, este trabajo tiene potencial terapéutico para pacientes humanos de AD con la finalidad de disminuir los daños provocados por la enfermedad. También plantean la posibilidad de la utilización de promotores inducibles que pudieran permitir un control espacio- temporal en las estrategias de tratamiento (Kanninen et al, 2009).

Al igual que en el caso de AD, la enfermedad de Huntington (HD) está vinculada a aspectos de la regulación protéica. En HD la expansión de repeticiones de glutamina en la proteína huntingtina, está asociada a la degeneración selectiva de neuronas GABAérgicas espinosas de proyección del estriado. Lo anterior se manifiesta a mediana edad como movimientos coreicos así como desajustes cognitivos y psiquiátricos. La proteína HTT

mutante se acumula de manera intercelular aunque no se conocen de manera clara los efectos específicos que dichas acumulaciones tienen en las células. Sin embargo estos acúmulos son inmunorreactivos a chaperoninas (HSP's) cuya expresión está asociada a estrés y que tienen una función de protección ante proteínas plegadas de manera incorrecta (Perrin et al, 2007).

Perrin et al (2007) probaron tanto la actividad de replegamiento de la proteína Hsp104 así como la actividad antioxidante de Hsp27 en modelos murinos *in vitro* e *in vivo* mediante la administración con un lentivirus. Es notable sin embargo que en este trabajo los vectores fueron utilizados con el doble propósito de desarrollar el modelo experimental de HD mediante la transducción del estriado de un lentivirus codificante para fragmentos de Htt así como para sobreexpresar Hsp104 y Hsp27. Los modelos fueron establecidos de manera exitosa y los resultados experimentales sugieren que la sobreexpresión de estas chaperoninas redujo la toxicidad asociada a las repeticiones y que se previno la pérdida de expresión de marcadores neuronales y de DARP32, un marcador específico de células GABAérgicas de proyección. Finalmente, se detectó una disminución en el tamaño de los agregados htt en los núcleos celulares en comparación a los organismos control. Este estudio además de confirmar la importancia de las chaperoninas como sistemas de control de calidad de las proteínas en el SNC y que la sobreexpresión de Hsp104 y Hsp27 protege de los daños a las células afectadas por la HD, también muestra la versatilidad que tienen los lentivirus (Perrin et al, 2007).

3.2- Organismos genéticamente modificados

El uso de los lentivirus también ha aportado al desarrollo de técnicas alternativas para la generación de organismos transgénicos y para rescatar ciertos fenotipos. Mediante la inyección de concentrados virales al espacio perivitelino de embriones de ratón, se logró obtener organismos transgénicos que acarreaban el gen reportero GFP bajo la regulación del promotor del gen de ubiquitina humana-C. La transgénesis alcanzada mediante esta técnica fue mayor al 80%. Además, las características adquiridas mediante la transducción fueron heredadas a la F1, por lo que se comprobó que las funciones como la gametogénesis

no impiden la expresión del reportero. Así mismo, cuando el promotor empleado para controlar la expresión de GFP se sustituyó por el de myogenina, fue posible dirigir la expresión de manera sitio específica. Esto prueba que los vectores lentivirales realmente pueden ser útiles y ventajosos para la obtención de animales transgénicos en conjunto con otros métodos como la inyección pronuclear (Lois et al, 2002; Pfeifer et al, 2002).

Las células dendríticas (DCs) están especializadas en la captura y procesamiento de antígenos como células muertas, bacterias y virus para posteriormente presentar y activar células T CD4+ y CD8+. La proteína α intergina X (HgaX/ CD11c) es una molécula de superficie de las DC que es exclusiva de este tipo celular y cuyo promotor se puede utilizar para dirigir la expresión de transgenes de interés en este tipo celular (Zhang et al., 2009 y referencias incluidas). En el estudio de Zhang et al (2009) se utilizó un fragmento de 1.2 Kb del promotor del gen Cd11c para dirigir la expresión de GFP y de iARN miR30-shRNA, que codifica siRNA contra la luciferasa, éste último como control, en células dendríticas. Estos vectores se inyectaron en embriones unicelulares de ratas para generar organismos transgénicos. Los resultados muestran que la expresión de GFP se dirigió únicamente en las células DC de la médula espinal en animales vivos. Mediante el estudio de los cultivos celulares establecidos a partir de estos animales transgénicos se determinó que no hubo ningún efecto de esta manipulación en las funciones de las células tratadas, como son la fagocitosis, la maduración y la presentación de antígenos. Así mismo, no se observaron ningún tipo de alteraciones en las células provenientes de otros órganos como bazo, corazón, riñón o pulmones. Este estudio por lo tanto demuestra además de la conveniencia de la utilización de los lentivirus para generar organismos transgénicos, la posibilidad de utilizar estos sistemas para dirigir la expresión de ciertos genes de interés de manera sitio específica, de manera rápida y económica. Además de tener, como en otros casos, un potencial uso terapéutico (Zhang et al., 2009).

Aunque el método de desarrollo de animales transgénicos por medio de inyección de los lentivirus directamente en los embriones ha sido utilizado con éxito en diversos modelos animales como hemos visto, la generación de aves transgénicas como los pinzones cebrá ha resultado complicada (Agate et al, 2009). Aunque estas aves son muy utilizadas en estudios

de aprendizaje, dimorfismo sexual, lateralización de la función cerebral, sueño, aprendizaje vocal, sensorimotor y de plasticidad neuronal y de que existe una gran cantidad de recursos genéticos disponibles para su estudio, no se habían podido desarrollar organismos transgénicos. Agate et al (2009) lograron generar pinzones transgénicos que expresan GFP bajo el control de promotor CMV por medio de la modificación del protocolo utilizado para codornices. Esta modificación consiste básicamente en utilizar múltiples inyecciones del vector lentiviral directamente al embrión en lugar de una única inyección en la cavidad subembrionaria como se hace en las codornices. De esta manera se pudieron generar 13% de organismos transgénicos de los cuales hasta un 12% han producido progenie transgénica. Aunque estos resultados demuestran que las células embrionarias de los pinzones cebra no son tan accesibles para los lentivirus como lo son otros animales modelos, determinar la causa de esto abre la posibilidad de incrementar la eficiencia del procedimiento de generación de estos animales (Agate et al, 2009).

Así mismo, el uso de un vector lentiviral para rescatar fenotipos azoospermicos en ratones infértiles fue comprobado (Ikawa et al, 2002). La azoospermia en estos animales se debe a la mutación del locus *steel* S1 que codifica al ligando c-kit (KL) que es importante para la proliferación celular en el espermatogonio en las células de Sertoli. De manera que un vector rescatando la mutación en *steel*, fue inyectado en los testículos obteniendo resultados muy alentadores: 1) La espermatogénesis normal fue recuperada en el 100% de los casos tratados. 2) No se presentó transducción en la línea germinal por lo que la progenie de los individuos tratados fue normal y 3) La progenie de los organismos tratados fue completamente normal. Este es el primer caso en el que se recobra una función completamente perdida por medio de la transducción de un gen (Ikawa, et al 2002).

3.3- ARN de interferencia (siARN) y terapia génica

Una de las aplicaciones más novedosas de los lentivirus es la de ser los vectores para la entrega de ARN de interferencia (siARN). El uso de ARNs de interferencias de tamaño pequeño es una herramienta muy importante para conocer la función de muchos genes.

Mediante la utilización de lentivirus que codificaba un siARN, se redujo considerablemente la expresión de CD8 *in vitro*, además de que ese mismo siARN fue capaz de inhibir la expresión del transgen *in vivo* en un modelo transgénico de ratón (Rubinson et al, 2003). Esta capacidad para introducir información para codificar siARN para silenciar genes en las células transducidas, ha revolucionado la manera de obtener células madre pluripotenciales (Meissner y Jaenisch, 2006). En este trabajo el objetivo fue obtener células madre pluripotenciales a partir de un método alternativo que no implicara la destrucción de un embrión como lo es la transferencia nuclear. El primer paso del proyecto involucró el silenciamiento del gen *cdx2* en fibroblastos de ratón que serían utilizados como donadores del núcleo, Cdx2 es un factor transcripcional clave en la implantación del trofoblasto en el útero y sin el cual, los blastocistos no pueden pasar de esta etapa por lo que sólo generan células madre. Esto se logró mediante la transducción de un siARN cuya expresión bloquea aquella de *cdx2* en las células donantes de núcleo. Una vez silenciado, los núcleos de estos donantes fueron microinyectados a ovocitos de ratón. La tasa de transducción fue alta y aproximadamente un 20% de los fibroblastos transducidos avanzaron y se mantuvieron en estado de blastocisto (Meissner y Jaenisch, 2006). Finalmente, en noviembre y diciembre de 2007, dos grupos reportaron de manera independiente la “desprogramación” de células diferenciadas a un estado pluripotencial mediante la inserción de genes codificantes para factores transcripcionales como OCT3/4, c-MYC, KLF4, SOX2, NANOG y LIN28. La inserción de dichos genes se realizó mediante la utilización de lentivirus y otros retrovirus (Takahashi et al, 2007; Junying et al, 2007).

Sin embargo, la utilización de vectores lentivirales codificantes para siARNs también tiene aplicación potencial en el campo de la terapia génica, particularmente en la retina. El epitelio pigmentado retinal (RPE) es el sitio de expresión de diversos genes que cuando presentan mutaciones producen diversas enfermedades y condiciones como la distrofia macular viteliforme de Best y la distrofia pseudoinflamatoria de Sorsby, además de tener un papel central en la Degeneración macular relacionada a la edad (Paskowitz, et al. 2007).

La posibilidad de transducir el RPE con lentivirus que porten iARNs y producir organismos “*knockdown*” para un gen endógeno como el del Factor básico de crecimiento de

fibroblastos (bFGF) tanto *in vitro* como *in vivo* de una manera estable por un periodo de hasta 60 días fue explorada por Paskowitz et al. (2007). La expresión del ARN de interferencia (sHRNA) regulando de manera negativa la del bFGF fue evidente, resultando hasta de un 90% con respecto a la expresión basal dependiendo de la concentración de vector lentiviral administrada en las microinyecciones. Así mismo, la relativa facilidad con la que se pueden ensamblar las construcciones de los vectores, permitió la modificación y ajuste del tamaño del iARN para sobreponer algunas dificultades en el silenciamiento de bFGF debido a impedimentos estéricos.

Según Paskowitz, et. al. (2007) esta aproximación para obtener modelos animales de enfermedades humanas en el RPE presenta ventajas tales como un costo menor, es más rápida que la utilización de modelos *knock out*, se puede administrar a animales que han completado su desarrollo embrionario y se puede aplicar a otros modelos animales que no sean murinos además de que se pudieran producir modelos de enfermedades para los cuales no existen mutantes que presenten fenotipos de pérdida de función.

3.4- Vectores bicistrónicos y con promotores duales

Aunque la transducción y subsecuente expresión de un gen exógeno de manera estable resulta alentador, el poder entregar un solo gen terapéutico a la retina neuronal es en ocasiones insuficiente para poder tratar ciertas enfermedades. Para resolver esta dificultad, se han desarrollado vectores bicistrónicos, en los cuales los dos genes terapéuticos (uno correctivo y el otro codificante para algún factor neurotrófico o antiapoptótico) son incluidos en el esqueleto lentiviral separados únicamente por un sitio interno de entrada de ribosoma (IRES). Sin embargo, se ha observado que la expresión del gen colocado río abajo en la construcción resulta en ocasiones inadecuada (Mizuguchi et al, 2000). Para obtener una adecuada tasa de expresión de ambos genes, es necesario construir vectores en los cuales su expresión esté dirigida por promotores independientes. Semple – Rowland, et al. (2007) logró por primera vez no sólo desarrollar un vector lentiviral que acarreaba dos genes reporteros (GFP y tdTomato) controlados por dos promotores independientes, sino que también, la expresión de manera específica para diferentes tipos de células

fotorreceptoras de pollo. Sin embargo, se observó que los niveles relativos de expresión de las proteínas reporteras variaban en diferentes poblaciones celulares. Mientras en algunas poblaciones los niveles de expresión eran prácticamente los mismos, en otras una proteína se expresaba en niveles mucho más altos con respecto a la otra. Este fenómeno, de acuerdo a los autores, puede estar definido por diversos factores tales como factores intrínsecos de los promotores, interacción entre ellos y con promotores localizados por fuera del ADN proviral a pesar de la inclusión de un elemento aislante como el HS4, interferencia transcripcional por parte de la cromatina celular adyacente, el orden de los promotores dentro del vector, la estabilidad de los transcritos e incluso, diferencias intrínsecas a la heterogeneidad de las poblaciones celulares. Sin embargo, los vectores con promotores duales representan una posibilidad para el tratamiento de enfermedades autosómicas dominantes que requieran de la expresión de genes que codifiquen moléculas de silenciamiento de genes defectuosos por un lado, mientras aportan copias normales del gen por el otro. Así como para aquellas en las que se requiera de la entrega simultánea de diversos genes terapéuticos en un tejido enfermo.

3.5- Control de Actividad Celular

El control remoto sobre la tasa de disparo de las neuronas en el contexto de un circuito es de gran interés ya que permite, en primera instancia, conocer la dinámica de las funciones de los diversos tipos neuronales que conforman una red (Boyden et al., 2005). Este control se logra por medio de la expresión de canales iónicos exógenos que son activados mediante la aplicación de estímulos luminosos de longitudes de onda determinados (Boyden et al., 2005., Zhang et al., 2007., Han et al., 2009). Los lentivirus son herramientas indispensables para desarrollar estos modelos ya que es necesaria la modificación génica de las neuronas por medio de transducciones. Al igual que en los casos antes mencionados, los lentivirus muestran en estos estudios una alta tasa de transducción, una nula citotoxicidad, expresión de los transgenes de manera sostenida y eficiente a lo largo del tiempo así como la conservación de las características fisiológicas y funcionales de las membranas neuronales (Zhang et al., 2007). De esta manera los lentivirus han permitido el desarrollo de sistemas de

control óptico que utilizan canales iónicos provenientes de Archeas y Chlorophytas (Boyden et al., 2005., Zhang et al., 2007).

Estos sistemas lentivirales constan de vectores de empaquetamiento pseudotipados con VSV-G; transgenes con codones optimizados para su expresión en mamíferos los cuales se encuentran fusionados a genes reporteros tales como la proteína verde fluorescente mejorada (EGFP), proteína amarilla fluorescente mejorada (EYFP) y proteína roja fluorescente (mCherry); bajo el control de promotores ubicuos o específicos como el promotor del factor de elongación 1 α (EF1 α), el promotor de la proteína cinasa II α dependiente de calcio/calmodulina (CaMKII α) y el promotor específico de myosina (Pmyos3) (Zhang et al., 2007., Tonnesen et al., 2009). Los cuales son administrados por medio de inyecciones intracraneanas en el caso de estudios *in vivo*, o con transducciones directas en cultivos o rebanadas (Han et al., 2009., Tonnesen et al., 2009).

Los resultados muestran un gran potencial en la utilización de estos sistemas en diferentes escenarios. Por un lado, se han desarrollado sistemas de control que incorporan no sólo canales iónicos, sino bombas de protones que resultan más eficientes y efectivas en el silenciamiento de los disparos (Chow et al., 2010); sistemas de control bidireccional de los disparos mediante la coexpresión de dos canales antagónicos en una misma neurona (Zhang et al., 2007) e incluso se ha logrado suprimir la actividad epileptiforme de neuronas glutamatérgicas de CA3 en modelos *ex vivo* de epilepsia refractaria a fármacos (Tonnesen et al., 2009). Estos modelos representan la posibilidad de estudio y manipulación no invasiva de los circuitos neuronales en un estado intacto para conocer su dinámica e la implicación de ésta en comportamientos complejos y funciones de órdenes superiores tales como la sincronización (Han et al., 2009), así como de un potencial uso terapéutico en enfermedades como Parkinson y epilepsia (Tonnesen et al., 2009).

3.5- Desarrollo de vacunas

El estudio de los lentivirus se ha enfocado también en el campo del desarrollo de vacunas antivirales que puedan combatir enfermedades como el SIDA (Craig et al., 2007). Debido a la alta tasa de mutación de los lentivirus, en particular el VIH, resulta difícil el desarrollo de vacunas efectivas. De manera histórica, los esfuerzos siempre se han centrado en la respuesta inmune de la proteína Gag, y se ha pasado por alto el efecto de Env. Usando como modelo de lentivirus al de la anemia equina infecciosa (EIAV del inglés, equine infectious anemia virus), se desarrollaron virus con 0%, 6% y 13% de variación en la secuencia aminoacídica de Env con respecto a una cepa de virus ancestral para la cual existe una vacuna efectiva y se probó la protección inmunológica otorgada por la vacuna frente a estos nuevos virus generados. Los resultados muestran que el grado de protección otorgada por la vacuna es inversamente proporcional a la divergencia de la secuencia. Se concluyó por lo tanto que Env es determinante en la eficacia de la vacuna. Se observó hasta el 50% de reducción en la eficacia cuando existe un 13% de divergencia en la secuencia aminoacídica en Env de EIAV. Los autores entonces proponen una extrapolación de este modelo al HIV y sugieren que si la diferencia en la secuencia aminoacídica en los clados de VIH-1 es de alrededor del 25%, una vacuna para una forma ancestral de VIH no otorga ningún tipo de protección inmunológica, por lo que se debe tomar en consideración la alta tasa de mutación de *env* para el diseño de vacunas en adición a lo que se ha trabajado con el gen *gag* (Craig et al, 2007). Así mismo, se han realizado esfuerzos por inhibir la replicación del VIH-1 mediante el bloqueo selectivo de la proteína REV con el uso de lentivirus para transducir células progenitoras hematopoiéticas CD34+ (Bahner et al, 2007). La proteína Rev permite el transporte hacia el citoplasma de los transcritos no procesados por completo que codifican para las proteínas Gag, Pol y Env. Por lo que si se remueve el gen *rev* se detiene la replicación (Bahner et al, 2007 y referencias incluidas). El mutante RevM10 es un alelo dominante capaz de suprimir la replicación viral ya que carece de la habilidad de interactuar con el factor nuclear de exportación Crm-1, aunque lo hace con el elemento de respuesta a Rev (RRE) y otras proteínas REV, la mutación impide la exportación de transcritos inmaduros al citoplasma. Por lo que en este estudio se diseñó un vector lentiviral autoinactivante capaz de transportar e integrar el alelo mutante RevM10 en células

progenitoras hematopoiéticas humanas con el fin de desarrollar una aplicación clínica. Los resultados de esta investigación muestran que las células provenientes de cordón umbilical y médula transducidas por medio de este vector no mostraron signos de citotoxicidad ni de una disminución en su potencialidad de diferenciación *ex vivo*. Así mismo, cuando los cultivos celulares fueron infectados con las cepas HIV-1 JR-FL y HIV-1 silvestre, se detectó una supresión de la replicación viral de entre 91 y 99.2%. Adicionalmente, se comprobó la seguridad de este vector al cotransducir las células con una cepa silvestre de HIV-1, para observar la posible movilización del vector lentiviral por medio de pseudotipación y compararla con la movilización producida por un vector que no fuera autoinactivante. En los vectores autoinactivantes acarreadores de RevM10 no se detectó evidencia de movilización por ninguno de los métodos de detección utilizados, aunque en aquellas células transducidas con vectores no autoinactivantes, se observó movilización, se detectó una reducción de hasta 10 órdenes de magnitud en aquellos que incluían RevM10 en su construcción. A pesar de que la aplicación de este método para tratar las células hematopoiéticas una vez infectadas es poco factible por la cantidad de células que pueden ser transducidas, pudiera ser efectivo en la protección de las células contra la citopaticidad producida por el HIV y promover la persistencia de las células funcionales mientras que otras son eliminadas por el virus, para permitir el uso de otras estrategias antivirales por lo que se está trabajando en el diseño de una plataforma experimental clínica para probar esta hipótesis (Bahner et al, 2007).

4- Conclusiones

Con la aparición de la pandemia de SIDA a nivel mundial y la subsecuente identificación del VIH, el estudio para conocer a este patógeno cobró una gran importancia. Los nuevos conocimientos como el descubrimiento de vías de transporte, elementos moleculares y proteínas exclusivas de su grupo taxonómico es por sí mismo una gran aportación en el campo del estudio de los lentivirus de manera general y del VIH en lo particular. Sin embargo, las características biológicas tan particulares que presentan estos virus, ha permitido el uso de éstos para el desarrollo de vectores para la incorporación de material genético en diversos tipos de células. Esto último ha mostrado ser una herramienta muy valiosa en diseños experimentales que tienen como objetivo desde desarrollar y optimizar sistemas de entrega de genes, desarrollo de organismos transgénicos, hasta el desarrollo de procedimientos tan complicados como la generación de células madre.

Así mismo, el diseño y manipulación del material genético de los diversos lentivirus para desarrollar vectores seguros y cada vez más especializados y eficaces en la transducción de determinados tipos celulares se ha ido expandiendo y refinando al grado de obtener control no sólo en el número de transgenes que se pueden expresar a partir de un único vector, pero también en el momento y lugar en el que se requiera dicha expresión. La capacidad de incorporar elementos reguladores, aumentadores e incluso inhibidores de las actividades transcripcionales e insercionales de los vectores ha hecho posible la flexibilización en la utilización de éstos al grado de tener ahora una herramienta con grandes capacidades de adaptación a los requerimientos específicos del campo en el que sean utilizados.

El campo de aplicación de los lentivirus sin duda se irá ampliando y su uso generalizando a medida que se desarrollen sistemas más eficientes, más sencillos y más seguros para su aplicación. Si bien el avance ha sido considerable en los últimos 15 años, aún queda oportunidad en el desarrollo de vectores seguros para aplicación terapéutica, en el campo de optimización de la actividad transcripcional de vectores multicistronicos, de su regulación y su inserción sitio dirigida. En los próximos años se verán avances en estas áreas y se tendrán resultados de diversas pruebas clínicas que en este momento se están realizando

particularmente en el área de tratamiento de condiciones degenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer y Parkinson. Los lentivirus representan un sistema flexible, relativamente barato y sencillo que tiene un gran potencial de aplicación para la investigación básica y aplicada en diversas áreas científicas.

5. Referencias

Agate, R.J., Scott, B.B., Haripal, B., Lois, C. y Nottebohm, F. 2009. Transgenic songbirds offer an opportunity to develop a genetic model for vocal learning. *Proc. Natl. Acad. Sci.***106**: 17963 - 17967

Amado, R., y Chen, I. 1999. Lentiviral Vectors: The Promise of Gene Therapy Within Reach? *Science*. **285**: 674-676

Bahner, I., Sumiyoshi, T., Kagoda, M., Swartout, R., Petereson, D., Pepper, K., Dorey, F., Reiser, J. y Kohn, D. Lentiviral vector transduction of a dominant-negative *Rev* gene into human CD34+ hematopoietic progenitor cells potently inhibits human immunodeficiency virus – 1 replication. *Mol. Ther.* **15**: 76 – 85.

Balvay, L., Lopez, M., Sargueil, B., Darlix, J. y Ohlmann, T. 2007. Translational control of retroviruses. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**: 128 – 140.

Boyden, E., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G., Deisseroth, K. 2005. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat. Neurosc.* **3**: 1263 - 1268

Bryant, ML. y Ratner, L. 1990. Myristylation dependent replication and assembly of HIV-1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**: 523 – 527

Brown, E., Yuhki, N., Packer, C., O'Brien, S.J. 1994. A Lion Lentivirus Related to Feline Immunodeficiency Virus: Epidemiologic and Phylogenetic Aspects. *J. of Virol.* **68**:5953 – 5968

Carey, M. y Smale, S. 1999. Transcriptional Regulation in Eukaryotes. Concepts, Strategies and Techniques. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. 627 pp.

Centers of Disease Control and Prevention. 2008. Basic Information .Department of Health and Human Services. En Línea (<http://www.cdc.gov/hiv/topics/basic/index.htm#aids>)

Chow, B., Han, X., Dobry, A., Qian, X., Chuong, A., Li, M., Henninger, M., Belfort, G., Lin, Y., Monahan, P., Boyden, E. 2010. High performance genetically targetable optical neural silencing by light driven proton pumps. *Nature*. **463**: 98 - 102

Cline, M. 1985. Perspectives for gene therapy: Inserting New Genetic Information into Mammalian Cells by Physical Techniques and Viral Vectors. *Pharmac. Ther.* **29**: 69 – 92

Clontech. 2006. pRb-TA-Luc Vector Information. Protocol No. PT3512-5W. Clontech Laboratories, Inc

Coffin, J. 1995. HIV Population Dynamics In vivo: Implications for Genetic Variation, Pathogenesis and Therapy. *Science*. **267**: 483 - 489

Coffin, J. 1996. Retroviridae: The viruses and their replication. *En Fields Virology*. Fields, B. et al (ed.) Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. pp 1767 – 1847.

Cohen, J. 1996. New Role of HIV: A Vehicle For Moving Genes Into Cells. *Science*. **272**: 195

Craig, J., Zhang, B., Barnes, S., Tagmyer, T., Cook, S., Issel, C. y Montelaro, R. 2007. Envelope variation as a primary determinant of lentiviral vaccine efficacy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**: 15105 - 15110

D' Souza, V. y Summers, MF. 2005. How retroviruses select their genomes. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**: 643 – 655

Desclaux, M., Teigell, M., Amar, L., Vogel, R., Gimenez, M., Privat, A. y Mallet, J. 2009. A novel and efficient gene transfer strategy reduces glial reactivity and improves neuronal survival and axonal growth *in vitro*. *PlosOne*: **4**.

Dewhurst, S. 2008. Patogénesis, Lentivirus /HIV. En línea (<http://www.medynet.com/usuarios/nnuneza/virologia/lentiviruspatogenesis.html>)

Donello, J., Loeb, J. y Hope, T. 1998. Woodchuck hepatitis virus contains a tripartite posttranscriptional regulatory element. *J. of Virol.* **72**: 5085-5092

Dull, T. Zufferey, R., Kelly, M., Mandel, R.J., Nguyen, M., Trono, D. y Naldini, L. 1998. A third generation lentivirus vector with a conditioned packaging system. *J. of Virol.* **72**: 8463 - 8471.

Elder, JH., Lerner, DH. Hasselkuss, CS., 1992. Distinct subsets of retroviruses encode dUTPase. *J. of Virol.* **66**: 1791 – 1794

Engelman, A., England, G., Orenstein, J., Martin, M. y Craigie, R. 1995. Multiple effects of mutations in Human Immunodeficiency Virus Type I integrase on viral replication. *J. of Virol.* **69**: 2729 - 2736

European Medicine Agency. 2005. Guideline on development and manufacture of lentiviral vectors.

Fleming, J., Ginn, S., Weinberger, R., Trahair, T., Smythe, J. y Alexander, I. 2001. Adeno-Associated Virus and lentivirus Vectors Mediate Efficient and Sustained Transduction of Cultured Mouse and Human Dorsal Root Ganglia Sensory Neurons. *Hum. Gen. Ther.* **12**: 77 - 86

Foley, B. T. 2000. An overview of the molecular phylogeny of lentiviruses, p. 35-43. *En C.* Kuiken, B. Foley, E. Freed, B. Hahn, B. Korber, P. A. Marx, F. McCutchan, J. W. Goldgur, Y., Craigie, R., Cohen, G., Fujiwara, T., Yoshinaga, T., Fujishita, T., Sugimoto, H., Endo, T., Murai, H., Davies, D. 1999. Structure of the HIV-1 integrase catalytic domain complexed with an inhibitor: A platform for antiviral drug design. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**: 13040 – 13043

Geller, S., Ge, S., Visel, M., Greenberg, K. y Flannery, J. 2007. Functional promoter testing using a modified lentiviral transfer vector. *Mol. Vis.* **13**: 730- 739

Geller, S., Phillip, S., Visel, M. y Flannery, J. 2008. In vitro analysis of promoter activity in Müller cells. *Mol. Vis.* **14**: 691 - 705

Gojorobi, T., Moriyama, E., Ina, Y., Ikeo, K., Miura, T., Tsujimoto, H., Hayami, M. y Yokoyama, S. 1990. Evolutionary origin of human and simian immunodeficiency viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**: 4108 – 4111

Greenberg, K., Geller, S.F., Schaffer, D., y Flannery, J.G. 2007. Targeted transgene expression in Muller Glia of normal and diseased retinas using lentiviral vectors. *Invest Ophthalmol Vis Science*. **48**: 1844 – 1852

Han, X., Qian, X., Bernstein, J., Zhou, H., Franzesi, G., Stern, P., Bronson, R., Graybiel, A., Desimone, R. Boyden, E. 2009. Millisecond-Timescale Optical Control of Neural Dynamics in the Nonhuman Primate Brain. *Neuron*. **62**: 191 – 198

He, H., Liu, B., Zhang, X., Chen, W., Wang, C. 2010. Development of a high-throughput assay for the HIV-1 integrase disintegration reaction. *Sci. Chi*. **53**: 241-247

Herniou E, Martin J, Miller K, Cook J, Wilkinson M, Tristem M. 1998. Retroviral diversity and distribution in vertebrates. *J. of Virol*. **72**:5955-5966.

Hirsch, M. y Curran, J. 1996. Human Immunodeficiency Virus. *En Fields Virology*. Fields, B. et al (ed.) Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. pp 1953 – 1975

Holmes, E. 2003. Molecular Clocks and the Puzzle of RNA Virus Origins. *J. of Virol*. **77**: 3893 – 3897

Hutchinson, J. 2001. The Biology and Evolution of HIV. *Ann. Rev. Anthropol*. **30**: 85 -108-

Ikawa, M., Tergaonkar, V., Ogura, A., Ogonuki, N., Inoue, K., Verma, I. 2002. Restoration of Spermatogenesis by Lentiviral Gene Transfer: Offspring from infertile mice. *Proc. Natl. Acad. Sci*. **99**: 7524 – 7529

Jandial, R., Singec, I., Ames, C. y Snyder, E. 2007. Genetic modification of neural stem cells. *Mol. Ther.* **16**: 450 - 457

Jern, P., Sperber, G., Blomberg, J. 2005. Use of Endogenous Retroviral Sequences (ERVs) and structural markers for retroviral phylogenetic inference and taxonomy. *Retrovirol.* **2**: 50

Jern, P., Sperber, G.O., Blomberg, J. 2004. Definition and variation of human endogenous retrovirus H. *Virology*. **327**:93-110

Joag, S., Stephens, E., Narayan, O. 1996. Lentiviruses. *En Fields Virology*. Fields, B. et al (ed.) Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. pp 1977 – 1995.

Joo, K-I., y Wang, P. 2008. Visualization of targeted transduction by engineered lentiviral vectors. *Gen. Ther.* **15**: 1384 - 1396

Junying, Y., Vodyanik, M., Smuga-Otto, K., Antosiewicz, J., Frane, J., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, I. y Thomson, J. 2007. Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. *Science*. 318: 1917

Kanninen, K., Heikkinen, R., Malm, T., Rolova, T., Kuhmonen, S., Leinonen, H., Ylä-Herttuala, S., Tanila, H., Levonen, A., Koistinaho, M. y Koistinaho, J. 2009. Intrahippocampal injection of a lentiviral vector expressing Nrf2 improves spatial learning in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**: 16505 – 16510

Karn, J. 2000. Tat, a novel regulator of HIV transcription and latency. En. Mellors, J. I. Mullins, J. Sodroski, and S. Wolinsky (ed.), HIV sequence compendium 2000. Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, N. Mex.

Kato, S., Inoue, K., Kobayashi, K., Yasoshima, Y., Miyachi, S., Inoue, S., Hanawa, H., Shimada, Y., Takada, M., y Kobayashi, K. 2007. Efficient gene transfer via retrograde transport in rodent and primate brains using a Human Immunodeficiency Virus Type I-based vector pseudotyped with Rabies Virus Glycoprotein. *Hum. Gen. Ther.* **18**: 1141 - 1151

Katzourakis, A., Gifford, R., Tristem, M., Thomas, M., Gilbert, P., Pybus, O. 2009. Macroevolution of complex retroviruses. *Science*. **325**: 1512

Katzourakis, A., Tristem, M., Pybus, O., Gifford, R. 2007. Discovery and analysis of the first endogenous lentivirus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**: 6261 – 6265.

Lei, Y., Joo, K., y Wang, P. 2009. Engineering fusogenic molecules to achieve targeted transduction of enveloped lentiviral vectors. *J. Biol. Eng.* **3**:

Loewen, N. y Poeschla, E. 2005. Lentiviral Vectors. *Adv. Biochem. Eng / Biotechnol.* **99**: 169 - 191

Lois, C., Hong, E., Pease, S., Brown, E., y Baltimore, D. 2002. Germline Transmission and Tissue Specific Expression of Transgenes Delivered by Lentiviral Vectors. *Science*. **295**: 868 – 872

Lotery, A., Derksen, T., Russel, S., Mullins, R., Sauter, S., Affatigato, L., Stone, E. y Davidson, B. 2002. Gene Transfer to the Nonhuman Primate Retina with Recombinant Feline Immunodeficiency Virus Vectors. *Hum. Gen. Ther.* **13**: 689 – 696.

Lowen, N. y Poeschla, E. 2005. Lentiviral Vectors. *Adv Biochem Eng / Biotechnol.* **99**: 169 – 191.

Luciw, P. 1996. Human Immunodeficiency Viruses and their Replication. *En Fields Virology*. Fields, B. et al (ed.) Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. pp 1881 – 1975.

Mana, M. y Marcy, D. 2001. HIV-1 Protease. En línea enero 2008. (http://www.callutheran.edu/Academic_Programs/Departments/BioDev/omm/hiv_protease/molmast.htm)

Mangeat, B., Turelli, P., Caron, G., Fredli, M., Perrin, L., Trono, D. 2003. Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature.* **424**: 99 - 103

Manilla, P., Rebello, T., Afable, C., Lu, X., Slepushkin, V., Humeau, L., Schonely, K., Ni, Y., Binder, G., Levine, B., MacGregor, R., June, C. y Dropulic, B. 2005. Regulatory Considerations for Novel Gene Therapy Products: A Review of the Process Leading to the First Clinical Lentiviral Vector. *Hum. Gen. Ther.* **16**: 17 – 25

Mao, G., Marotta, F., Yu, J., Zhou, L., Yu, Y., Wang, L., Chui, D. 2008. Dna context and promoter activity affect gene expression in lentiviral vectors. *Acta Biomed.* **79**: 192 - 196

Marcy, D. 2006. HIV Reverse Transcriptase. En línea enero 2008.
http://www.callutheran.edu/Academic_Programs/Departments/BioDev/omm/jmol/hivrt/hivrt.html

Matukonis, M., Li, M., Molina, R., Paszkiet, B., Kaleko, M. y Luo, T. 2002. Development of Second and Third Generation Bovine Immunodeficiency Virus- Based Gene Transfer Systems. *Hum. Gen. Ther.* **13**: 1293 – 1303

Meissner, A. y Jaenisch, R. 2006. Generation of nuclear transfer-derived pluripotent ES cells from clones Cdx2-deficient blastocysts. *Nature*. **439**: 212- 215

Miller, R.H. y Sarver, N. 1997. HIV-1 accessory proteins as therapeutic targets. *Nat. Med.* **3**: 389 - 394

Mitrophanous, K., Yoon, S., Rohll, J., Patil, D., Wilkes, F., Kim, V., Kingsman, S., Kingsman, A. y Mazarakis, N. 1999. Stable gene transfer to the nervous system using a non primate lentiviral vector. *Gene. Ther.* **6**: 1808 - 1818

Miyoshi, H., Blomer, U., Takahashi, M., Gage, F. y Verma, I. 1998. Development of a Self-Inactivating Lentivirus Vector. *J.of Virol.* **72**: 8150 – 8157

Mizuguchi, H., Xu, Z., Ischii-Watabe, A., Uchida E., Hayakawa, T. 2000. IRES-dependent second gene expression is significantly lower than cap dependent first gene expression in a bicistronic vector. *Mol. Ther.* **1**: 376 – 382

Mlynárová, L., Jansen, R., Conner, A. y Stiekema, W. 1995. The MAR-Mediated reduction in position effect can be uncoupled from copy number-dependent expression in transgenic plants. *The Plant Cell*. **7**: 599 – 609

Naldini, L., Blömer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F., Verma, I., Trono, D. 1996. In Vivo Gene Delivery and Stable Transduction of Nondividing Cells by a Lentiviral Vector. *Science*. **272**: 263-267.

Nakajima, N., Lu, R. y Engelman, A. 2001. Human Immunodeficiency Virus Type I replication in absence of integrase- mediated DNA recombination: Definition of permissive and nonpermissive T-Cell Lines. *J. of Virol.* **75**: 7944 - 7955

Novitsky, V., Smith, U., Gilbert, P., McLane, M., Chigwedere, P., Williamson, C., Ndungu, T., Klein, I., Chang, Y., Peter, T., Thior, I., Foley, T., Gaolekwe, S., Rybak, N., Gaseitsiwe, S., Vannberg, F., Marlink, R., Lee, T. y Essex, M. 2002. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtype C Molecular Phylogeny: Consensus Sequence for an AIDS Vaccine Design? *J. of Virol.* **76**: 5435 – 5451

Okada, Y., Ueshin, Y., Hasuwa, H., Takumi, K., Okabe, M., y Ikawa, M. 2009. Targeted gene modification in mouse ES cells using integrase-defective lentiviral vectors. *Genesis*. **47**: 217- 223

Olsen, J. 1998. Gene transfer vectors derived from equine infectious anemia virus. *Gene Ther.* **5**: 1481- 1487

Pantaleo, G., Graziosi, C. y Fauci, A. 1993. The Immunopathogenesis of Human Immunodeficiency Virus Infection. *N. Eng. J. Med.* **328**: 327 – 335

Paskowitz, D., Greenberg, K., Yasumura, D., Grimm, D., Yang, H., Duncan, J., Kay, M., Lavail, M., Flannery, J. y Vollrath, D. 2007. Rapid and Stable Knockdown of an Endogenous Gene in Retinal Pigment Epithelium. *Hum. Gen. Ther.* **18**: 871 - 880

Pereira de Almeida, L., Ross, C., Zala, D., Aebischer, P. y Déglon, N. 2002. Lentiviral-mediated delivery of mutant huntingtin in the striatum of rats induces a selective neuropathology modulated by polyglutamine repeat size, huntingtin expression levels, and protein length. *J. Neurosci.* **9**: 3473 - 3483

Perelson, A., Neumann, A., Markowitz, M., Leonard, J. y Ho, D. HIV-1 Dynamics in Vivo: Virion Clearance Rate, Infected Cell Life Span, and Viral Generation Time. *Science.* **271**: 1582- 1586

Perrin, V., Régulier, E., Abbas-Terki, T., Hassig, R., Brouillet, E., Aebischer, P., Luthi-Carter, R., Déglon, N. 2007. Neuroprotection by Hsp104 and Hsp27 in Lentiviral-based Rat Models of Huntington's Disease. *Mol. Ther.* **5**: 903 - 911

Petit, C., Schwartz, O. y Mammano, F. 2000. The karyophilic properties of Human Immunodeficiency Virus Type I Integrase are not required for nuclear import of proviral DNA. *J. of Virol.* **74**: 7119-7126

Pfeifer, A., Ikawa, M., Dayn, Y., Verma, I. 2002. Transgenesis by lentiviral vectors: Lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**: 2140 – 2145

Philippe, S., Sarkis, C., Barkats, M., Mammeri, H., Ladroue, C., Petit, C., Mallet, J. y Serguera, C. 2006. Lentiviral vectors with a defective integrase allow efficient and sustained transgene expression *in vitro* and *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**: 17684 - 17689

Rahim, A.A., Wong, A.M.S., Howe, S.J., Buckley, S.M.K., Acosta-Santos, A.D., Elston, K.E., Ward, N.J., Philpott, N.J., Cooper, J.D., Anderson, P.N., Waddington, S.N., Thrasher, A.J., y Raivich, G. 2009. Efficient gene delivery to the adult and fetal CNS using pseudotyped non-integrating lentiviral vectors. *Gene Ther.* **16**: 509 - 520

Ramezani, A., Hawley, T.S. y Hawley, R.G. 2000. Lentiviral vectors for enhanced expression in human hematopoietic cells. *Mol. Ther.* **2**: 458 - 469

Ramezani, A., Hawley, R. 2002. Overview of the HIV-1 Lentiviral Vector System. *Curr. Prot. Mol. Biol.* Supplement 60 16.21

Régulier, E., Trottier, Y., Perrin, V., Aebischer, P., y Déglon, N. 2003. Early and reversible neuropathology induced by tetracycline-regulated lentiviral overexpression of mutant huntingtin in rat striatum. *Hum. Mol. Gen.* **12**: 2827 - 2836

Rein, A., McClure, MR., Rice, NR., Luftig, RB., Schultz, AM. 1986. Myristylation site in site in Pr65gag is essential for particle formation by Moloney murine leukemia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83**: 7246 - 7250

Ren, B., O'Brien, A., Swan, M., Koina, M., Nassif, N., Wei, M., Simpson, A. 2007. Long term correction of diabetes in rats after lentiviral hepatic insulin gene therapy. *Diabetologia.* **50**: 1910 - 1920

Robbins, P. y Ghivizzani, S. 1998. Viral Vectors for Gene Therapy. *Pharmacol. Ther.* **80**: 35 – 47

Rubinson, D. et al. 2003. A lentivirus based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat. Genet.* **33**: 401 - 406

Sala, M., Wain-Hobson, S. 2000. Are RNA viruses adapting or merely changing? *J. of Mol. Evol.* **51**(1):12–20.

Salemi, M., et al. 2001. Dating the common ancestor of SIVcpz and HIV-1 group M and the origin of HIV-1 subtypes using a new method to uncover clock-like molecular evolution. *FASEB J.* **15**:276–278.

Schlegel, R., Tralka, T.S., Willingham, M.C., y Pastan, I. 1983. Inhibition of VSV binding and infectivity by phosphatidylserine: Is phosphatidylserine a VSV-binding site? *Cell.* **32**: 639 - 646

Schnell, T., Foley, P., Wirth, M., Münch, J. y Überla, K. 2000. Development of a Self Inactivating, Minimal Lentivirus Vector Based on Simian Immunodeficiency Virus. *Hum. Gen. Ther.* **11**: 439 - 447

Semple-Rowland, S., Eccles, K. y Humberstone, E. 2007. Targeted expression of two proteins in neural retina using self-inactivating, insulated lentiviral vectors carrying two internal independent promoters. *Mol. Vis.* **13**: 2001 – 2011.

Sheey, A., Gaddis, N., Choi, J., Malim, M. 2002. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature*. **418**: 646 - 650

Smith, T.F., Srinivasan, A., Schochetman, G., Marcus, M., Myers, G. 1988. The phylogenetic history of immunodeficiency viruses. *Nature*. **333**: 573 – 575.

Staunstrup, N., Moldt, B., Mátés, L., Villesen, P., Jakobsen, M., Ivics, Z., Izsvak, Z. y Mikkelsen, J. 2009. Hybrid Lentivirus- transposon vectors with a random integration profile in human cells. *Mol. Ther.* 1-10.

Stevenson, M., Haggerty, S., Lamonica, C., Meier, C., Welch, S. y Wasiak, A. 1990. Integration is not necessary for expression of Human Immunodeficiency Virus Type I protein products. *J. of Virol.* **64**: 2421-2425.

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K. y Yamanaka, S. 2007. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*. **131**: 861 – 872.

Tian, J, y Andreadis, ST. 2009. Independent and high-level dual gene expression in adult stem-progenitor cells from a single lentiviral vector. *Gene Ther.* **16**: 874 - 884.

Tristem, M. 2000. Identification and characterization of novel human endogenous retrovirus families by phylogenetic screening of the human genome mapping project database. *J. of Virol.* **74**:3715-3730.

Tonnesen, J., Sorensen, A., Deisseroth, K., Lundberg, C. Kokaia, M. 2009. Optogenetic control of epileptiform activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**: 12162 - 12167

Trono, D. 2000. Lentiviral vectors: turning a deadly foe into a therapeutic agent. *Gen Ther.* **7**: 20 – 23.

Van Hooijdonk, L. W.A., Ichwan, M., Dijkmans, T., Schouten, T., de Backer, M.W.A., Adan, R.A.H., Verbeek, F.J., Vreugdenhil, E., y Fitzsimons, C.P. 2009. Lentivirus – mediated transgene delivery to the hippocampus reveals sub-field specific differences in expression. *BMC Neurosci.* **10**:

van Regenmortel, MHV, Fauquet, CM, Bishop, DHL, Cartens, EB, Estes, MK, Lemon, SM, Maniloff, J, Mayo, MA, McGeoch, DJ, Pringle CR, Wickner RB. 2000, Seventh ICTV report. San Diego, CA, USA, Academia Press. pp 1024.

Ventura, A., Meissner, A. Dillon, C., McManus, M., Sharp, P., Van Parijs, L., Jaenisch, R. y Jacks, T. Cre – lox regulated conditional RNA interference from transgenes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**: 10380 – 10385.

Walther, W., Stein, U. 2000. Viral Vectors for Gene Transfer. A Review of Their Use in the Treatment of Human Diseases. *Drugs.* **60**:249 – 271

Wang, P., Liu, X., Liu, X-M., Ma, B., Jia, L., Wang, D., Zhang, X., Yu, X., Lahn, B. y Xiang, A. 2008. Isolation, characterization and gene modification of fetal neural stem/progenitor cells from cynomolgus monkey. *Dev. Neurosci.* **19**: 419 – 424

Wiskerchen, M. y Muesing, M. 1995. Human Immunodeficiency Virus Type1 Integrase: Effects of mutations on viral ability to integrate, direct viral gene expression from

unintegrated viral DNA templates, and sustain viral propagation in primary cells. *J. of Virol.* **69**: 376-386

Wu, D., Yang, P., Zhang, X., Luo, J., Haque, M., Yeh, J. Richardson, P., Zhang, Y. y Bo, X. 2009. Targeting a dominant negative rho kinase to neurons promotes axonal outgrowth and partial functional recovery after rat rubrospinal tract lesion. *Mol. Ther.* **17**: 2020 - 2030

Xu, Z., Mizuguchi, H., Mayumi, T. y Hayakawa, T. 2003. Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulation element enhance transgene expression from adeno virus vectors. *Biochem et BiophysActa.* **1621**: 266-271

Yee, J.K., Friedman, T., Burns, J.C. 1994. Generation of high-titer pseudotyped retroviral vectors with very broad host range. *Methods Cell Biol.* **43**: 99-112

Yusim, K., Peeters, M., Pybus, O., Bhattacharya, T., Delaporte, E., Mulanga, C., Muldoon, M., Theiler, J., Korber, B. 2001. Using human immunodeficiency virus type1 sequences to infer historical features of the acquired immune deficiency syndrome epidemic and human immunodeficiency virus evolution. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **356**:855 – 866.

Zhang, F., Wang, L., Brauner, M., Liewald, J., Kay, K., Watzke, N., Wood, P., Bamberg, E., Nagel, G., Gottschalk, A., Deisseroth, K. 2007. Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry. *Nature.* **446**: 633- 641

Zhang, H., Yang, B., Pomerantz, R., Zhang, C. Arunachalam, S., Gao, L. 2003. The cytidinedeaminase CEMIS induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA. *Nature.* **424**: 94 – 98

Zhang, J., Zou, L., Liu, Q., Li, J., Zhou, J., Wang, Y., Li, N., Liu, T., Wei, H., Wu, M., Wan, Y. y Wu, Y. 2009. Rapid generation of dendritic cell specific transgenic mice by lentiviral vectors. *Transgenic Res.* **18**: 921 - 931

Zhang, X., Zhao, P., Kennedy, C., Chen, K., Wiegand, J., Washington, G., Marrero, L. y Cui, Y. 2008. Treatment of pulmonary metastatic tumors in mice using lentiviral vector – engineered stem cells. *Cancer Gene Ther.* **15**: 73-84.

Zufferey, R., Nagy, D., Mandel, R.T., Naldini, L. y Trono, D. 1997. Multiple attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat. Biotech.* **15**: 871-875