



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITÁN

**Estado actual del conocimiento de los eventos intracelulares  
que controlan la replicación del virus de la inmunodeficiencia  
humana (VIH) en células del sistema inmune**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIATURA EN QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

**ISRAEL HERNÁNDEZ DE LUNA**

ASESORA: DRA. LEONOR HUERTA HERNÁNDEZ



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
**ASUNTO: VOTO APROBATORIO**



**DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO  
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE**

**ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ  
Jefa del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán**

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos la **Tesis**:  
Estado actual del conocimiento de los eventos intracelulares que controlan la replicación del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en células del sistema inmune.

Que presenta el pasante: Israel Hernández de Luna  
Con número de cuenta: 088068217 para obtener el Título de: Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

**ATENTAMENTE**  
**“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”**  
Cuautitlán Izcallí, Méx. a 6 de septiembre de 2011.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	<b>NOMBRE</b>	<b>FIRMA</b>
<b>PRESIDENTE</b>	Dra. Leonor Huerta Hernández	
<b>VOCAL</b>	QFB. Rosalba Bonilla Sánchez	
<b>SECRETARIO</b>	Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira	
<b>1er SUPLENTE</b>	Dra. Gabriela Bárcenas Morales	
<b>2do SUPLENTE</b>	QFB. Jonathan Pablo Paredes Juárez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).  
HHA/pm

## DEDICATORIA:

A MARÍA DEL PILAR DE LUNA, MI MADRE:

TANTOS SACRIFICIOS, TANTAS ENSEÑANZAS, TANTAS AVENTURAS,... TANTAS COSAS QUE AGRADECERTE. CUANDO EL MUNDO SE VOLVIÓ INDIFERENTE, CUANDO YO MISMO DUDE DE MIS CAPACIDADES, CUANDO LAS CIRCUNSTANCIAS SE VOLVIERON ADVERSAS, TÚ ESTUVISTE AHÍ RESPALDÁNDOME, APOYÁNDOME; TANTA PACIENCIA. ¿QUÉ VES QUE NO VEÍA?

¡TÚ CREES QUE PUEDO MÁS!

¿CÓMO PODRÍA DEFRAUDARTE? SOLO UNA VIDA PUEDE PAGAR EL AMOR, LA VIDA QUE **DIOS** ME PRESTE, LA VIDA QUE TENGO PARA AGRADECERTE.

AQUÍ ESTA "MÁ":  
EL LOGRO DE CUMPLIR CON ESTA META, EL LOGRO ES  
NUESTRO.

## DEDICATÓRIA:

A **ANA MARIA GUADALUPE HERNÁNDEZ**, MI HERMANITA:

PORQUE AL TRATAR DE SER UN BUEN EJEMPLO PARA TI ME IMPULSASTE A SUPERARME. PORQUE HAS SIDO CÓMPLICE, CONFIDENTE, COMPAÑERA DE TRAVESURAS Y DE SUEÑOS... PORQUE HEMOS CONSTRUIDO JUNTOS.

ME HAS DEMOSTRADO QUE PUEDO CONTAR CONTIGO.

GRACIAS POR COMPARTIR TU FAMILIA, MIS SOBRINOS: VALERIA AURORA V. HERNÁNDEZ Y LUÍS FRANCISCO V. HERNÁNDEZ.

GRACIAS POR TU APOYO.  
QUE VALIOSO ES PARA MI TENER UNA HERMANA COMO TU.

## AGRADECIMIENTOS:

PRIMERO QUE NADA AGRADEZCO A **DIOS**, PORQUE CUANDO LAS DIFICULTADES LLEGARON A PARECER INSUPERABLES FUE MI CONSUELO.

A MIS MAESTROS, DESDE PREESCOLAR HASTA EL PRESENTE.

UN ESPECIAL AGRADECIMIENTO A MI ASESORA, LA **DRA. LEONOR HUERTA H.**, POR HABERME ACEPTADO EN SU EQUIPO DE TRABAJO, POR SUS CONSEJOS Y POR SU GUÍA. ASÍ MISMO MI AGRADECIMIENTO AL **DR. CARLOS LARRALDE RANGEL**, POR HABERME ACEPTADO EN SU LABORATORIO Y EQUIPO DE TRABAJO, EN EL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS DE LA UNAM.

A MIS AMIGOS(AS) QUE COMPARTIMOS LA ESTANCIA EN LA UNAM, VARIOS DE ELLOS AHORA SON MAESTROS DE LA UNAM Y OTROS EN ALGÚN MOMENTO NOS REENCONTRÁREMOS.

A MIS COMPAÑEROS DE LABORATORIO, DURANTE LA REALIZACIÓN DE LA TESIS; TODOS ELLOS DE UNA GRAN CALIDAD HUMANA E INTELIGENCIA NOTABLE. AL **DR. R. GERARDO CONTRERAS PATIÑO**, DEL CINVESTAV, POR SUS AMISTOSOS Y VALIOSOS CONSEJOS.

DE LAS PERSONAS QUE DEBIERON ESTAR CERCANAS PERO QUE NO ESTUVIERON; DE LOS QUE RECIBÍ INDIFERENCIA, QUE PUDIENDO AYUDAR NO LO HICIERON; DE LOS QUE...; SIN EMBARGO, DE ELLOS TAMBIÉN APRENDÍ A TRATAR DE SER MEJOR PERSONA. ASÍ LO EXPRESO UN POETA Y PENSADOR: "*Del hablador he aprendido a callar; del intolerante, a ser indulgente, y del malévolo a tratar a los demás con amabilidad. Y por curioso que parezca, no siento ninguna gratitud hacia esos...*" -- *Khalil Gibrán*--

## **AGRADECIMIENTOS:**

POR ULTIMO Y NO MENOS IMPORTANTE COMENTARE QUE CUANDO ESTABA POR ENTRAR A LA UNIVERSIDAD MI PADRE ENFERMO GRAVEMENTE Y MURIÓ; POR LO CUAL CARECÍ DE SUS CONSEJOS Y APOYO; TUVE QUE TRABAJAR POR ALGUNOS AÑOS. CUANDO POR FIN PUDE INCORPORARME A LA UNIVERSIDAD EL VIRTUOSO SISTEMA DE LA UNAM ESTABA AHÍ. ES DICHO SISTEMA EL QUE FUE DETERMINANTE PARA QUE PUDIERA CONCLUIR ESTA LICENCIATURA.

MI GRATITUD A SUS MAESTROS.

MIS DESEOS SON QUE NO PREVALEZCA LA VISIÓN DE UNA UNAM SUJETA A LAS PSEUDO-LEYES DEL MERCADO, QUE ESTA VISIÓN MEZQUINA NO CORROMPA SUS CIMIENTOS. QUE SU CALIDAD EN LA ENSEÑANZA NO SE DESCUIDE, QUE LO REZAGADO SE SUPERE, QUE SE ACTUALICE CONSTANTEMENTE; QUE LAS PERSONAL QUE EN ELLA LABORAN ESTEN ABIERTAS A RECONOCER SUS ERRORES Y A MEJORAR CONSTANTEMENTE; QUE NOSOTROS SUS EGRESADOS LA ENORGULLESCAMOS Y LA DEFENDAMOS. QUE NO PIERDA SU SENTIDO SOCIAL, QUE NO SIGA SIENDO SUBUTILIZADA, QUE SEA USADA PARA IMPULSAR EL DESARROLLO DEL PAÍS.

**EN FIN, QUE VIVA LA UNAM.**

## ÍNDICE

	pg.
I	Resumen-----1
II	Parte I: Generalidades del VIH/SIDA-----2
2.1	Introducción-----3
2.2	Etapas generales de la enfermedad-----5
2.3	Generalidades del SIDA-----6
2.4	Panorama mundial-----6
2.5	Características del VIH-----7
2.5.1	Genoma-----7
2.5.2	Heterogeneidad genética-----10
2.5.3	Estructura del VIH-----12
2.5.4	Ciclo de replicación-----14
III	Objetivos-----17
3.1	Objetivo general-----17
3.2	Objetivos particulares-----17
IV	Método de investigación-----18
V	Parte II: Factores celulares implicados en la replicación viral-----19
5.1	Unión del VIH a su célula blanco-----20
5.1.1	Glicoproteínas virales de la envoltura (complejo Env) -----21
5.1.1.1	Glicoproteína gp120-----23
5.1.1.2	Glicoproteína gp41-----28
5.2	Fusión virus-célula-----29
5.3	Eventos tempranos del ciclo de replicación viral-----32



5.3.1	Trancito hacia el núcleo-----	32
5.3.2	Retrotranscripción-----	33
5.3.3	Entrada del ADNc viral al núcleo celular-----	38
5.3.4	Integración del ADNc viral al genoma celular-----	39
5.4	Eventos tardíos en la replicación del VIH-----	43
5.4.1	Elementos del provirus que determinan su actividad transcripcional-- -----	43
5.4.1.1	Características estructurales y generales de la LTR-----	43
5.4.1.2	Factores de transcripción celulares que se unen a la LTR----	46
5.4.1.3	Factores virales que regulan los productos de la transcripción- -----	48
5.4.2	Actividad transcripcional del VIH -----	53
5.4.2.1	Proteínas accesorias y actividad transcripcional del VIH ---	54
5.4.3	Liberación del virus de la célula, gemación-----	57
VI	Discusión-----	60
6.1	Expresión de la interacción VIH-célula a nivel celular-----	60
6.2	Expresión de la interacción VIH-célula a nivel individuo-----	61
6.3	Influencia del estado fisiológico celular en la replicación viral-----	63
VII	Conclusión-----	68
VIII	Perspectivas-----	69
IX	Abreviaturas-----	71
X	Referencias-----	73

## I RESUMEN

El virus de inmunodeficiencia humana (VIH) es el agente causante del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Las complejas interacciones que establece este retrovirus en el humano (su hospedador) le permite replicarse persistentemente en células del sistema inmune; dañando a las células coordinadoras de la respuesta inmune, los linfocitos CD4<sup>+</sup>; pero también infecta a macrófagos y células dendríticas. Para que el VIH obtenga toda la gama de sus componentes requiere trasladar su genoma (de ARN) en una copia de ADN y debe integrarlo al genoma de la célula, actividades realizadas por la retrotranscriptasa (RT) y la integrasa (IN) viral, respectivamente. Al genoma de ADN viral integrado se llama provirus. En estos eventos tempranos del ciclo de replicación viral, al igual que en los posteriores eventos tardíos, requieren la interacción de los componentes que forman la partícula viral y de componentes celulares. En los eventos tardíos del ciclo de replicación el genoma proviral es transcrito, las proteínas virales son sintetizadas, el virus es ensamblado y finalmente geman de la célula. El provirus y las proteínas virales tienen características que le permiten “aprovechar o alterar” elementos de la maquinaria celular a su favor. Esta tesis describe la participación de los componentes celulares en los pasos del ciclo de replicación viral; compendiando lo que se ha reportado al respecto en algunas de las más importantes publicaciones científicas. Finalmente se discute como dichas interacciones influyen en variaciones de la capacidad infectiva del virus, grado de replicación, curso clínico de la enfermedad y en su epidemiología; así mismo se discute como el virus se beneficia de la activación del metabolismo celular. Se espera que esta tesis sirva como fuente de información actualizada para estudiantes y personal académico interesado en el conocimiento de la interacción entre factores virales y celulares en la infección por el VIH.

## **PARTE I**

### **II) GENERALIDADES DEL VIH/SIDA**

## 2.1 INTRODUCCIÓN

El síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) es el nombre dado a la etapa más avanzada de la enfermedad infecciosa causada por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Este virus causa el deterioro progresivo y colapso del sistema inmune de las personas infectadas. Así los portadores del VIH eventualmente desarrollan una inmunodeficiencia severa que los lleva a la muerte por la incapacidad para defenderse de los agentes infecciosos.

La primera descripción histórica del SIDA como una nueva enfermedad de etiología inédita se debe a Gottlieb et al., en diciembre de 1981 <sup>1</sup>. Posteriormente en mayo de 1983, fue aislado por primera vez el agente causal; el ahora conocido como virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), aislado por el equipo de Montagnier <sup>2</sup>; posteriormente, en 1986 este mismo equipo aisló otro virus relacionado que difiere en alrededor de un 40% en su genética respecto al anterior <sup>3</sup>. Eventualmente se acordó denominarlos VIH-1 y VIH-2 <sup>4</sup>. Con el tiempo se encontró que estos virus en realidad consistían de una heterogeneidad de virus que comparten características estructurales y genéticas. Ésta diversidad influye en su biología, lo cual determina su infectividad, inmunogenicidad y patogenicidad.

Por su similitud estructural y genética con el llamado virus de la inmunodeficiencia de simios (VIS) se considera que el VIH 1 y 2 se originaron por el salto entre especies, de simios a humanos. La Figura 1 muestra fotos de microscopia electrónica del VIS y VIH.

En esta tesis se hace una revisión de la literatura actual que trata el tema de las interacciones entre proteínas celulares y eventos del ciclo de replicación viral, llevados dentro de la célula hospedadora. Si bien esta tesis es tan solo un bosquejo de los eventos más destacados de la interacción virus-célula, busca proporcionar un material de consulta general en español para estudiantes y profesionales del área de las ciencias biológicas y de

la salud; las referencias bibliográficas seleccionadas provean una base para quines, dependiendo de los intereses particulares, deseen profundizar en la búsqueda de temas más específicos. Se reúnen conceptos útiles para entender los eventos celulares que permiten y condicionan la replicación viral; por ejemplo, estos conceptos son necesarios para comprender el mecanismo de acción de los fármacos usados actualmente, la identificación de posibles blancos terapéuticos o de las dificultades terapéuticas que presentan en la lucha contra el VIH.

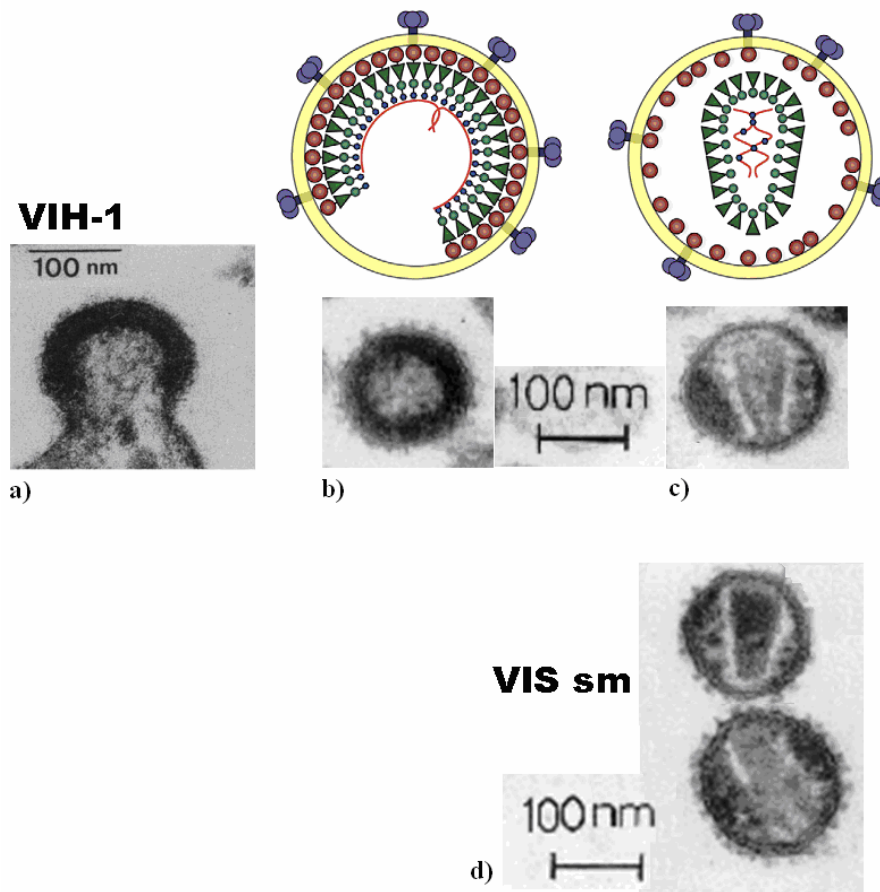


Figura. 1 **Micrografía electrónica del VIH y del virus de la inmunodeficiencia de simios (VIS)**. Se muestran los tres estados de maduración del VIH: a) gemación, b) virión inmaduro y c) virión maduro; en el virus maduro las proteínas han sido procesadas para adquirir su representación clásica con una parte central en forma de cono truncado en los extremos. En d) La micrografía de viriones maduro del virus de la inmunodeficiencia de simios (VIS) ejemplifica la alta similitud estructural entre ambos virus; sm significa que es un virus encontrado en los mono mangabey gris (*sooty mangabey*, en ingles) <sup>3, 5, 6</sup>.

## 2.2 ETAPAS GENERALES DE LA ENFERMEDAD.

La infección por el VIH es un grave problema de salud mundial que se ha diseminado amparado principalmente en tres tipos de transmisión: por la vía sexual, vía parenteral con sangre o productos sanguíneos y de la madre infectada a su hijo.

La infección por el VIH tiene las siguientes características, en base la definición de las etapas clínicas descritas por la Organización Mundial de la salud (OMS) <sup>7</sup>:

- **Infección primaria:** puede ser asintomática o manifestarse mediante el **síndrome retroviral agudo** (SRA) (fiebre, erupciones, dolor articular e inflamación de los ganglios linfáticos). Esta etapa de la infección es altamente contagiosa. De presentarse, el SRA comienza 1 a 4 semanas después de la infección; los síntomas duran entre unos pocos días a 4 semanas.
- **Etapa clínica I:** asintomática o inflamación general de los ganglios linfáticos; dado esta ausencia de síntomas se le conoce como “**latencia clínica**”. Sin embargo, la replicación viral es persistente en las células hospedadoras del tejido linfoide, lo que va minando el sistema inmune. El periodo de la latencia viral varía en duración, va de 5 a 15 años; la terapia antirretroviral aumenta el tiempo de duración en esta etapa, eventualmente se sale de ella.
- **Etapa clínica II:** manifestaciones mucocutáneas leves e infecciones recurrentes de las vías respiratorias altas.
- **Etapa clínica III:** Los síntomas de esta etapa consisten en pérdida severa de peso, diarrea crónica sin causa aparente, fiebre persistente, candidiasis o leucoplaquia oral, infecciones bacterianas graves, tuberculosis pulmonar e inflamación necrotizante aguda en la boca. Algunas personas tienen SIDA en esta etapa (ver adelante).

- **Etapa clínica IV:** Todas las personas que se encuentran en esta etapa tienen SIDA; incluye 22 infecciones oportunistas o neoplasias malignas relacionados con el VIH.

### 2.3 GENERALIDADES DEL SIDA

SIDA son las siglas del término de vigilancia definidos por los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC) y por el Centro Europeo para la Vigilancia Epidemiológica del SIDA (EuroHIV). El CDC define como SIDA a la etapa en la que el nivel de células T CD4<sup>+</sup> presente en la sangre es menor de 200 células por mm<sup>3</sup>. Alrededor de este momento las personas son susceptibles a enfermedades irrelevantes para personas sanas (inmunocompetentes). Algunas de estas enfermedades oportunistas incluyen la neumonía por *Pneumocystis jiroveci (carinii)*, el sarcoma de Kaposi, candidiasis, isosporidiosis, criptosporidiosis, tuberculosis por complejo mycobacterium avium y reactivación de enfermedades latentes causadas por citomegalovirus, herpes simple, herpes zoster, *Mycobacterium tuberculosis* y *toxoplasma gondii*<sup>8</sup>.

### 2.4 PANORAMA MUNDIAL

El programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA (ONUSIDA) publica cada dos años el informe sobre la situación mundial del VIH/SIDA. En la publicación del 2008 se hacen las siguientes estimaciones: desde su aparición han muerto más de 25 millones de personas en el mundo. Al 2007 vivían infectadas un promedio de 33 millones de personas; el estimado anual es de 2.7 millones de nuevos contagios y 2 millones de decesos. El continente africano es el más afectado, participa con el 72% de los

fallecimientos mundiales a causa del SIDA; África subsahariana concentra al 67% (22 millones) de personas infectadas, aún vivas.

Entre Europa y Asia suman 5.7 millones de infectados; en América se contabilizan 2.9 millones de infectados. En México se estima que 1 a 5 de cada mil habitantes presenta la infección, es decir, una prevalencia de 0.1-0.5 %<sup>9</sup>.

## 2.5 CARACTERÍSTICAS DEL VIH

### 2.5.1 GENOMA

El VIH es un virus envuelto que pertenece a la familia *retroviridae* del género de los lentivirus<sup>10</sup>. Su genoma consiste de ARN de cadena simple, de polaridad positiva. La longitud de su genoma oscila entre 9.181 y 10.359, para el VIH-1 y el VIH-2 respectivamente<sup>11</sup>. En una clasificación funcional, sus genes se agrupan en estructurales (*gag*, *pol* y *env*), reguladores (*tat* y *rev*) y accesorios [*nef*, *vif*, *vpr*, y *vpu* (*vpx* en el VIH-2)]<sup>12</sup>. Como parte de su ciclo de replicación (ver adelante) su genoma requiere ser copiado en una doble cadena de ADN, que es llamado ADN proviral, complementario (ADNc) al ARN del genoma viral; al integrarse al genoma del hospedador genera al provirus. El provirus está delimitado en ambos extremos por las secuencias de nucleótidos denominada regiones repetida largas terminales o LTR (del inglés *Long Terminal Repeat*); esta región es clave para su integración y la actividad transcripcional (ver adelante). La Figura 2 muestra la posición relativa de sus genes; en la Tabla 1 se da un panorama general de las funciones de sus productos proteicos (que serán descritas a lo largo de la tesis).





Tabla 1 **Gen, producto proteico y funciones importantes del genoma del VIH.** El nombre de las proteínas se da en base a su peso molecular relativo y en su abreviación basado en alguna de sus propiedades <sup>14, 15</sup>.

<b>Gen</b>	<b>Producto proteico</b>	<b>Función</b>
<i>gag</i>	p24, Cápside (CA) p17, Matriz (MA) p7, Nucleocapside (NC)	Centro cónico viral. Asociación a la membrana y a componentes virales. Unión al ARN genómico viral.
<i>pol</i>	p66/51, Retrotranscriptasa (RT) p32, Integrasa (IN) p10, Proteasa (PR)	Copia en DNA (ADNc) el ARN genómico viral. Integración del ADNc viral en el genoma hospedador. Corte de precursores polipeptídicos virales.
<i>env</i>	gp120, Superficial (SU) gp41, Trasmembranal (TM)	Subunidad de la espícula, reconoce a los receptores celulares. Subunidad de la espícula, fusión entre membranas. En el VIH-2 el tallo citoplasmático de gp41 facilita la gemación, supliendo la función de Vpu.
<i>tat</i>	p14, Tat	Efecto transactivador de la transcripción.
<i>rev</i>	P19, Rev	Regula la expresión del ARNm viral.
<i>nef</i>	p27, Nef	Existen distintos alelos con efectos pleitrópicos: disminuye el umbral de activación de linfocitos CD4 <sup>+</sup> , disminuye la expresión de CD4 y del MHC-I; efecto supresor de la inmunidad celular.
<i>vif</i>	p23, Vif	Aumenta la fidelidad en el ADNc viral.
<i>vpr</i>	p15, Vpr	Transporte del ADNc viral al núcleo, efecto transactivador, arresto del ciclo celular en G2.
<i>vpu</i>	P16, Vpu	Disminuye la expresión de CD4, aumenta la gemación viral. No se encuentra en el VIH-2
<i>vpx</i>	p17	Solo presente en el VIH-2. Participa en el transporte del ADNc viral al núcleo

### 2.5.2 HETEROGENEIDAD GENÉTICA

El VIH tiene una alta variabilidad genética por lo que se le ha clasificado en dos tipos (VIH-1 y VIH-2). A su vez el VIH-1 se ha subdividido en distintos grupos (M, O y N –de principal, extremo y No M-No O, respectivamente-), subtipos (o clados), sub-subtipos e incluso en los productos de recombinación entre los miembros del VIH-1 (formas recombinantes únicas o circulantes –UFR y CFR, respectivamente-) <sup>16</sup>. El VIH-2 solo está subdividido en grupos (A-H) y no cuenta con clados. Figura 3.

La notoria heterogeneidad genética del VIH se explica, en parte, por la alta propensión de mutaciones introducidos por la retrotranscriptasa viral (principalmente al momento de completar la doble hebra de ADNc viral) <sup>17</sup>; los errores introducidos se estiman en 1/1700 nucleótidos <sup>18</sup>, sin embargo, hay que tomar en cuenta que el cálculo de esta tasa de mutaciones depende de la técnica usada <sup>19</sup>. Otros factores que explican esta variabilidad son la recombinación genética, la presión selectiva y desde el punto de vista evolutivo es un reflejo de los diferentes momentos en el que los ancestros retrovirales del VIH brincaron del chimpancé (origen del VIH-1) o del mono mangabeyo gris (origen del VIH-2) hacia el humano <sup>20</sup>. Esta diversidad genética, a su vez, explica las variaciones en las propiedades biológicas del virus que influyen sobre la transmisibilidad entre los diferentes grupos, el curso de la enfermedad, la inmunogenicidad y la patogenicidad.

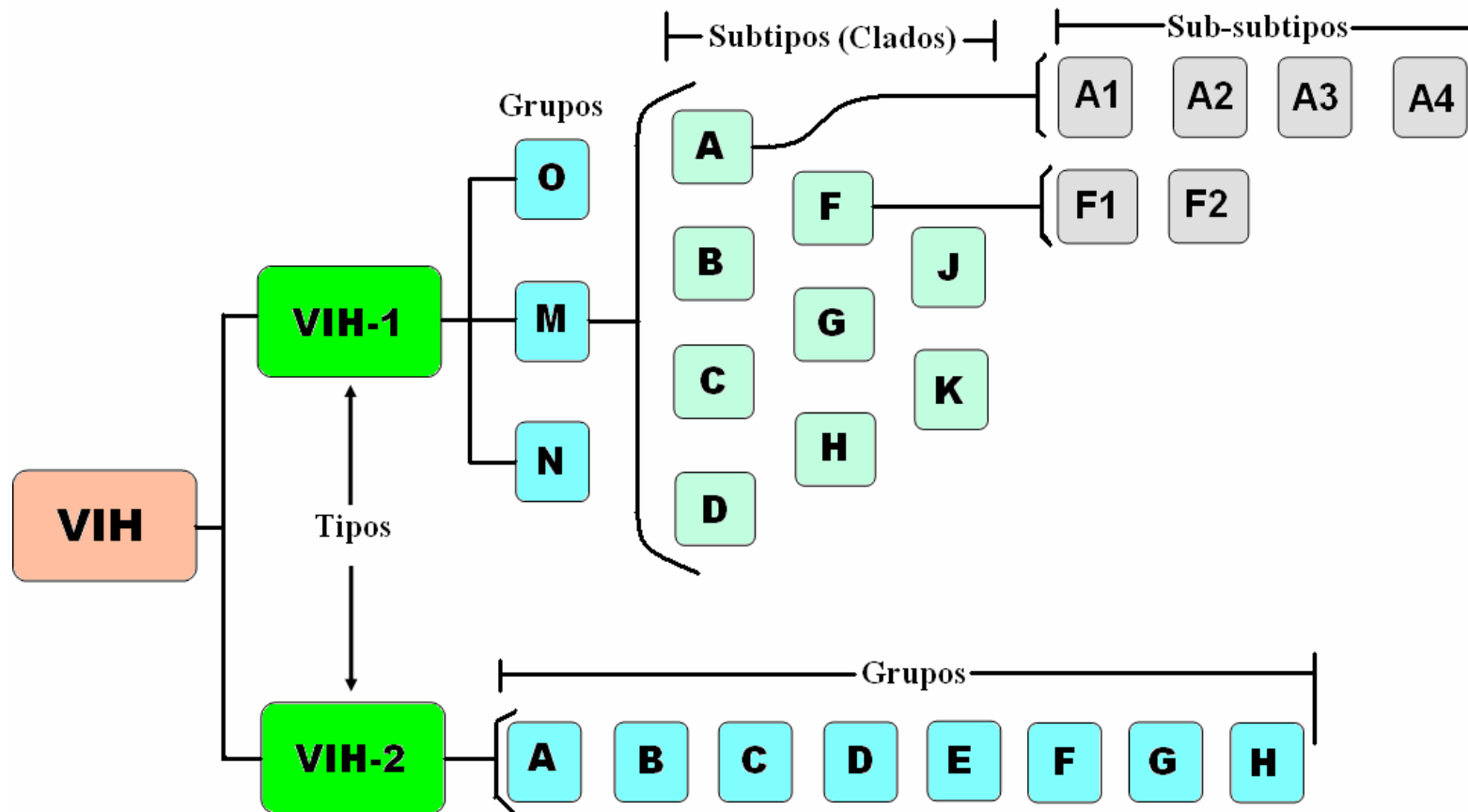


Figura. 3 **Clasificación del VIH.** En base a su interrelación filogenética el VIH ha sido clasificado en dos tipos, cada uno con sus grupos; El grupo M del VIH-1, que es el responsable de la pandemia mundial, también tiene subtipos (o clados), así como sub subtipos para los clados A y F. Además, existe recombinación genética entre los clados denominados formas recombinantes circulantes o únicas (UFR y CFR, respectivamente); por ejemplo, hoy se sabe que los anteriormente llamados clados E e I no eran tales, eran formas recombinantes de otros clados.

### 2.5.3 ESTRUCTURA DEL VIH

El virión maduro es de forma esférica con un diámetro de aproximadamente 120 nm<sup>21, 22</sup>; tiene una membrana o bicapa lipídica, denominada envoltura (de ahí su pertenencia al grupo de los virus envueltos), que sustrae de la célula al gemar de ella. Embebida en la envoltura se encuentran las glicoproteínas (gp) de 41 000 y 120 000 kDa, respectivamente abreviadas como gp41 y gp120. Ambas glicoproteínas se unen no covalentemente en una asociación llamada complejo Env, haciendo referencia a que se encuentra en la envoltura viral. En el lado interno de la bicapa lipídica de la envoltura se encuentran las proteínas de la matriz (MA, p17), que le dan un soporte y forma esférica a la envoltura; por debajo de este “soporte o cascarón” se encuentran las proteínas de la capsida (CA, p24) formando un cono truncado; a su vez, dentro de esta estructura hay dos copias del genoma viral asociados con la nucleocapsida (NC, p7), la retrotranscriptasa (RT, un dímero p66/p51), la integrasa (IN, p32) y la proteasa (PR, p10); otras proteínas virales acompañantes son Nef, Vif y Vpr<sup>23, 24, 25</sup>; en el VIH-2 la proteína Vpx también forma parte del virión<sup>26</sup>. Cuando el virus sale de la célula además acarrea diversos elementos celulares que facilitan su infección, tales como ARNt-Lys, ciclofilina<sup>27, 28</sup>, emerina, MHC<sup>29, 30</sup>, y LFA-I<sup>31, 32</sup>. La Figura 4 muestra la estructura del VIH.

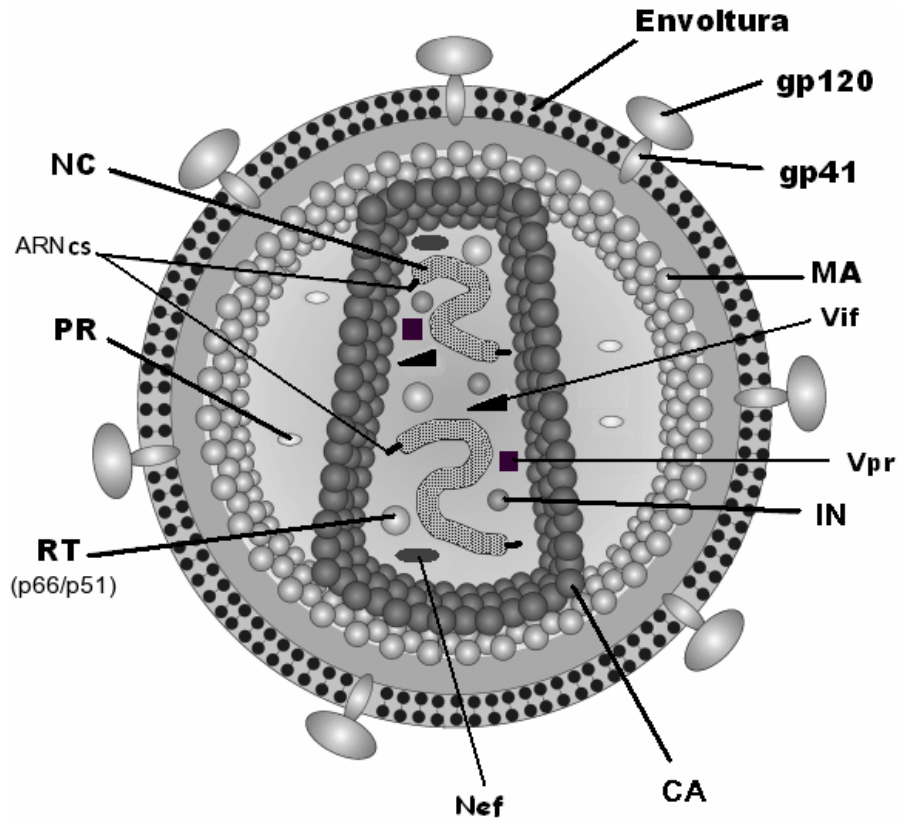


Figura. 4 **Estructura de un virión maduro de VIH.** En la parte más externa del virión se encuentra la envoltura, la cual expone espículas compuestas por las proteínas gp120/gp41 o complejo Env; por debajo las proteínas de la matriz (MA) que, además de interaccionar entre ellas, interacciona con la parte interna de gp41 y con la membrana. Debajo de la estructura esferoide anterior se encuentra el core (también llamado nucleoide) con sus diversos elementos; su forma de cono truncado se debe a las proteínas de la capsida (CA) después de que han polimerizado; dentro de la capsida se encuentran dos copias del ARN genómico viral, la retrotranscriptasa (RT), la integrasa (IN) y la proteasa (PR); otros componentes del virión son Nef, Vif y Vpr.

## 2.5.4 CICLO DE REPLICACIÓN

El ciclo de replicación del VIH inicia cuando reconoce a sus células blanco mediante el complejo Env del virus que interacciona específicamente con el receptor celulares CD4 y alguno de los receptores de quimiocinas CCR5 o CXCR4<sup>33</sup>. Los principales blancos celulares que infecta el virus son linfocitos T CD4<sup>+</sup>, monocitos-macrófagos y células dendríticas (abreviados respectivamente como: L $\phi$  CD4<sup>+</sup>, M $\phi$ -M $\phi$  y CD) <sup>34, 35, 36, 37</sup>; la preferencia por estas células se debe a que tienen los receptores adecuados.

Una vez que el virus reconoce los receptores de la superficie celular los cambios conformacionales del complejo Env fusionan la envoltura lipídica del virión con la membrana plasmática de la célula <sup>38, 39</sup>. Lo anterior libera el genoma viral hacia el citoplasma de la célula; cada uno de los dos ARN geonómicos virales que entran van acompañados por la transcriptasa inversa, la integrasa y otras proteínas (ver estructura del VIH). La retrotranscriptasa viral copia el ARN genómico viral en ADN de doble cadena (ADNc). La integrasa viral es la encargada de insertar el genoma viral de ADN en el genoma de la célula blanco (hospedadora), generando al provirus. Es por medio del provirus que se pueden expresar eficientemente toda la gama de proteínas virales, utilizando la maquinaria celular.

A partir del provirus se generan los ARN mensajeros (ARNm) que se traducen en todas las proteínas y nuevos ARN's geonómicos virales. Las primeras proteínas expresadas, llamadas proteínas tempranas, son: Tat, Rev y Nef. Al resto de las proteínas virales (gp120, gp41, CA, MA, NC, IN, RT, PT, Vif, Vpr, Vpu) se les conoce como proteínas tardías, pues requieren de las proteínas Tat y Rev para ser expresadas. Varias de las proteínas virales no

son directamente funcionales y se sintetizan como poliproteínas precursoras (Gag, Pol y Env, ver tabla 1).

El complejo Env es sintetizado y procesado en el retículo endoplásmico rugoso (REr) y el complejo de Golgi; de este último es transportado hacia las regiones de la membrana celular llamadas balsas lipídicas (regiones ricas en esfingolípidos y colesterol)<sup>40</sup>. En las balsas lipídicas el complejo Env, Gag, Pol, ARN genómico viral y otros componentes virales son ensamblados, por la afinidad entre ellos. El virus gema de la membrana celular y madura. La maduración consiste en que la proteasa viral corta a las poliproteínas Gag y Pol para obtener a las proteínas virales MA, CA, NC, IN, RT y PR, para su ensamble final (ver antes, estructura del VIH).

Se suele agrupar a los eventos que suceden en el ciclo de replicación viral en dos fases: temprana y tardía. La **fase temprana** va de la unión del virus a su blanco celular hasta la integración del ADN proviral en el genoma de la célula (ver adelante). La **fase tardía** abarca desde la producción de proteínas virales a la formación de viriones maduros. La Figura 5 ilustra el ciclo de replicación del VIH.



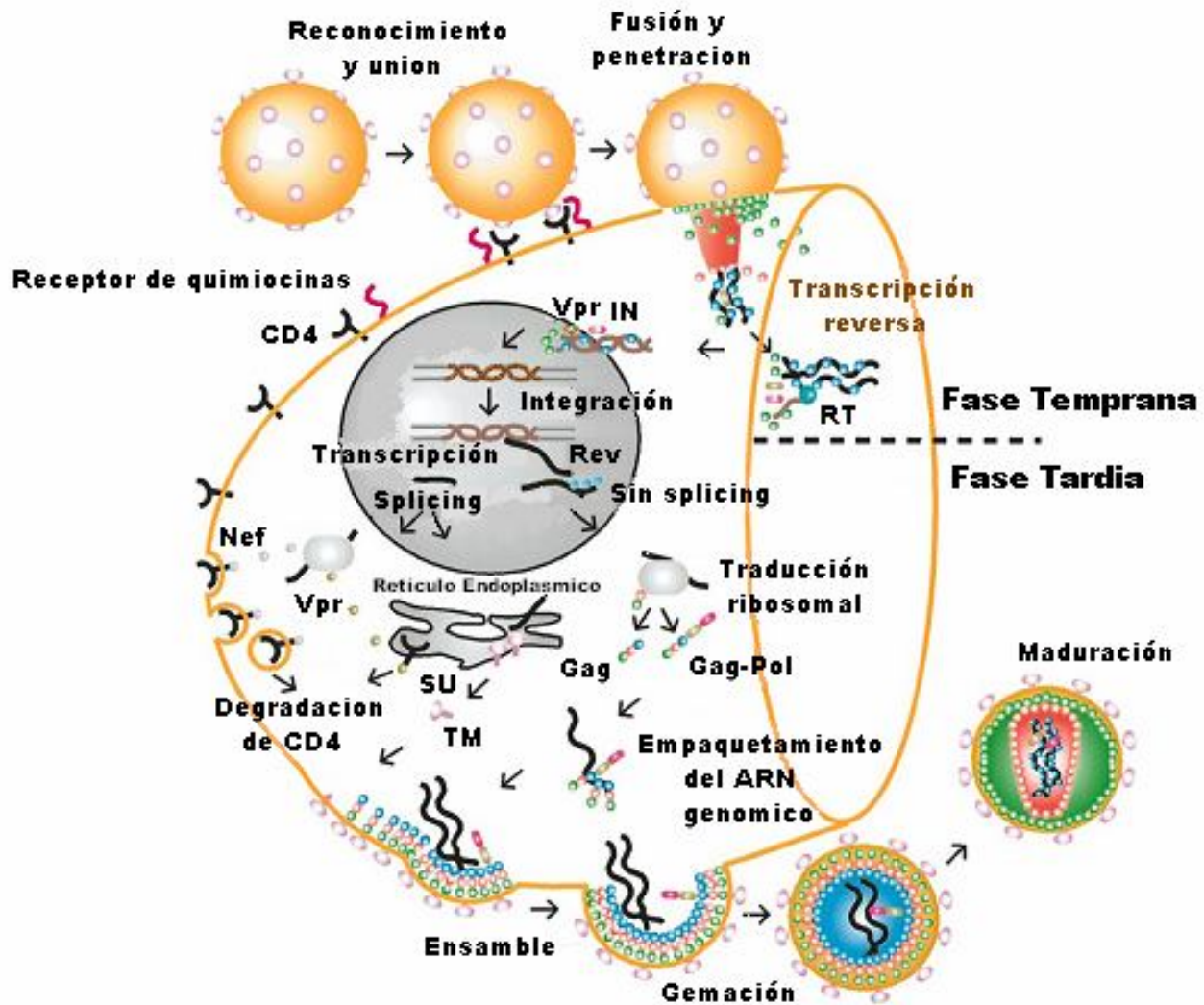


Figura. 5  
**Ciclo de replicación del VIH.**  
 La fase temprana del ciclo de replicación abarca de la unión del virus a la célula hasta la integración de una copia en ADN del genoma viral. La fase tardía inicia con la producción de las proteínas virales y culmina con la maduración del virus. *Splicing*, es un anglicismo que se refiere al procesamiento del ARN por corte y empalme. Se ejemplifican funciones de dos proteínas accesorias virales (*Vpr* y *Nef*). La figura muestra pasos representativos de la replicación viral; para que estos eventos tengan éxito se requiere la participación de componentes celulares. Las complejas interacciones entre los elementos virales y celulares se revisan en esta tesis.

### **III OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GENERAL**

Integrar información actual de los factores celulares que afectan la replicación del VIH, con énfasis en el papel de los elementos celulares en la replicación del virus, en células del sistema inmune.

#### **3.2 OBJETIVOS PARTICULARES**

1) Efectuar una revisión de artículos de investigación originales sobre el estado actual del conocimiento de los eventos que controlan la replicación del VIH en células del sistema inmune.

2) Proporcionar un material de consulta en español en el tema de la interacción virus-célula en la replicación del VIH, que contenga información y hemerografía básicas para estudiantes y profesionales del área de las ciencias biológicas y de la salud.

3) Suministrar información que permita entender que interacciones entre el VIH y la célula causan que este virus se replique persistentemente en su hospedero humano.

#### IV MÉTODO DE INVESTIGACIÓN

La información bibliográfica se recopiló utilizando el buscador “**Pubmed.gov**” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>). Este buscador es un proyecto desarrollado por el Centro Nacional Para La Información Biotecnológica (NCBI), en la Biblioteca Nacional De Medicina (NLM) de Estados Unidos”<sup>41</sup>.

Pubmed nos permite tener el acceso a la base de datos del NLM que recopila citas hemerográficas y resúmenes de artículos científicos (tanto de investigación como de revisión) de las principales revistas científicas de Estados Unidos y otros países. Además una herramienta de este buscador, útil para este trabajo, es que al encontrar una cita de interés se puede “rastrear” las citas de artículos que hayan hecho referencia de él o de artículos que aborden temas relacionados.

Para tener acceso a las revistas científicas que no son de libre acceso en Internet (por medio de PubMed) se hizo uso del servidor de la UNAM y de las hemerotecas de la UNAM.

## **PARTE II**

### **V) FACTORES CELULARES IMPLICADOS EN LA REPLICACIÓN VIRAL**

La descripción del ciclo de replicación, antes esbozado, es solo una forma didáctica de resaltar los eventos más destacados de la actividad de las proteínas virales. El éxito del VIH para replicarse en la célula y persistir dentro de los individuos infectados es indicativo de las funciones complejas que ejerce el virus sobre la célula. Se puede considerar al genoma y a las proteínas virales como versiones alteradas (o corruptas) de componentes propios de las células, los cuales, al infectar a una célula toman su posición en una red altamente regulada de interacciones proteicas celulares preexistente. En el resto de la revisión se describirá como las proteínas y el genoma viral interactúan o manipulan su contexto celular para producir una nueva progenie de virus.

### **5.1 UNIÓN DEL VIH A SU CÉLULA BLANCO**

El VIH-1 reconoce e infecta a las células del sistema inmune mediante sus glicoproteínas gp120 y gp41, ambas forman el complejo Env. En el VIH-2 el complejo Env consiste de las glicoproteínas gp130 y gp38, con una organización y tropismo análogos al del VIH-1. Las proyecciones de las glicoproteínas virales sobre la envoltura son nombradas genéricamente como espículas. En el VIH estas glicoproteínas superficiales de la envoltura le permiten anclarse a los receptores también superficiales de las células con las que tiene tropismo (L $\phi$  CD4<sup>+</sup>, M $\phi$ -M $\phi$  y CD, antes mencionadas).

CD4 y CCR5 o CXCR4 son las moléculas transmembranales que deben portar las células susceptibles a la infección por el VIH, como se menciono anteriormente. El virus primero reconoce a CD4, por lo que también se le conoce como “receptor primario”, solo hasta después puede reconocer a los receptores de quimiocinas CCR5 o CXCR4, que suelen llamárseles correceptores. El descubrimiento histórico de uno u otro receptor se realizó con años de diferencia entre ellos, en 1984 para CD4 y en 1996 para los correceptores<sup>42, 43, 44, 45</sup>.

Se ha observado que entre los aislados primarios del VIH (obtenidos recientemente de pacientes) o entre los VIH's "adaptados" a crecer en el laboratorio (en líneas celulares establecidas) se presentan distintas afinidades por los correceptores. Esto ha sido usado para clasificarlos como cepas R5 o X4<sup>46</sup>, cuando respectivamente solo reconocen a CCR5 o a CXCR4; aunque existen cepas que pueden reconocer ambos correceptores, a las que se llama R5/X4. Anteriormente a estas cepas virales se les identificaba como M-trópicas o T-trópicas, en relación a su habilidad de infectar líneas celulares de fenotipo macrófago-monocito (M) o linfoide (T), ya que estas líneas celulares tienen diferente tendencia a expresar el correceptor CCR5 o CXCR4, respectivamente.

### **5.1.1 GLICOPROTEÍNAS VIRALES DE LA ENVOLTURA (COMPLEJO ENV)**

El complejo Env es sintetizado en la célula infectada originalmente como un precursor polipeptídico, llamado gp160; la síntesis proteica se realiza en el retículo endoplásmico rugoso (REr). Su glicosilación (N-glicosilación) es realizada por enzimas celulares, comienza en el REr y concluye en el aparato de Golgi<sup>47</sup>. La glicosilación representa cerca del 50% del peso molecular (masa molecular) de gp160<sup>48</sup>; estas cadenas de carbohidratos serán importantes para que posteriormente el complejo Env tenga una conformación funcional. En el aparato de Golgi la enzima celular furina corta el precursor gp160<sup>49, 50</sup>, resultando en las dos glicoproteínas gp120 y gp41; ambas se unen no covalentemente y se exportan hacia la superficie de la membrana plasmática de la célula infectada, donde se expone al medio extracelular. Cuando los componentes virales se ensamblan y posteriormente el virus gema (formando la partícula viral) lo hace en los sitios donde se localiza el complejo Env (asociado a las balsas lipídicas de la membrana celular).

La parte más expuesta del complejo Env lo forma gp120, por lo que un nombre alternativo es glicoproteína “superficial” (Su); gp120 se sujeta a gp41 mediante interacciones no covalentes, relativamente débiles <sup>51, 52</sup>; gp41 se encuentra anclada a la membrana lipídica de la célula o de la envoltura viral mediante un dominio transmembranal. Adicional a la unión entre estas dos glicoproteínas, los complejos Env formados se asocian usualmente formando trímeros <sup>53, 54</sup>; este acomodo en trímeros se ha observado claramente con el complejo Env del virus de la inmunodeficiencia de simios (VIS) <sup>55</sup>.

Se mencionó que la interacción del complejo Env con los receptores celulares desencadena cambios conformacionales que fusionan la envoltura viral con la membrana de la célula blanco (ver ciclo de replicación). Hay que agregar que esta fusión se realiza a pH fisiológico <sup>56</sup>, lo que permite que la envoltura se fusione directamente en la superficie celular y no requiera de la endocitosis con la posterior acidificación en el llamado endosoma tardío, como en el caso de otros virus como el de la influenza. Las características individuales de las glicoproteínas gp120 y gp41 se ampliarán a continuación.

### 5.1.1.1 GLICOPROTEÍNA Gp120

La cadena completa de aminoácidos de gp120 tiene cinco secuencias altamente variables entre las distintas cepas del VIH (V1-V5), entremezcladas con secuencias constantes (C1-C5) <sup>57</sup>. En base a su acomodo en la interacción con otros complejos Env, a su estructura tridimensional se le ha dividido en región interna, hoja puente y región externa. La región interna es un acomodo globular en parte de la cadena de aminoácidos (aa) de gp120 con afinidad para unirse a otras gp120; en contraposición a la anterior está la región externa, que también es globular; la cadena de aminoácidos (aa) que une ambas regiones se le llama hoja puente, pues su acomodo es en hoja beta ( $\beta$ ). El acomodo tridimensional se mantiene por nueve puentes disulfuro y por la fuerte glicosilación que presenta, 24 sitios de N-glicosilación <sup>58</sup>. Figura 6

A gp120 se debe que el VIH reconozca tanto a CD4 como al receptor de quimiocinas. Gp120 interacciona con CD4 por medio de una cavidad formada por las regiones interna y externa de gp120, en el que sus secuencias constantes C2, C3 y C4 quedan vecinas (Figura 7A) <sup>59, 60</sup>.

CD4 es una glicoproteína transmembranal de cuatro dominios globulares extracelulares (D1 a D4), pertenece a la **familia de las inmunoglobulinas**. Si bien diversos aminoácidos de CD4 interactúan con gp120 <sup>61</sup>, los aminoácidos fenilalanina-43, arginina-59, lisina-46 y lisina-35 del dominio D1 de CD4 son determinantes (Figura 8A) <sup>62, 63</sup>. Posteriormente la flexibilidad entre los dominios D2 y D3 permite que gp120 se acerque a la membrana para reconocer al correceptor <sup>64</sup>.

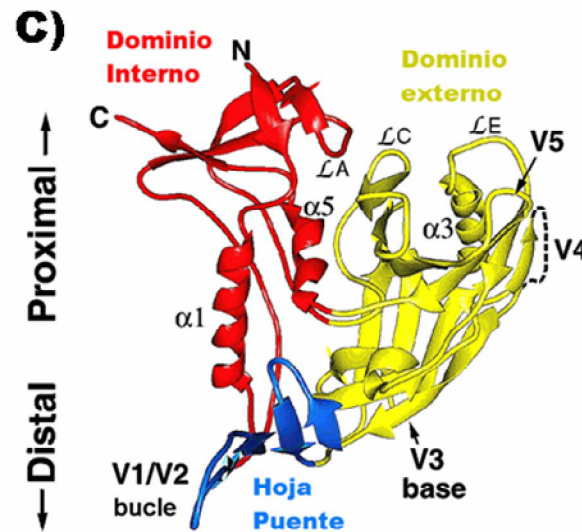
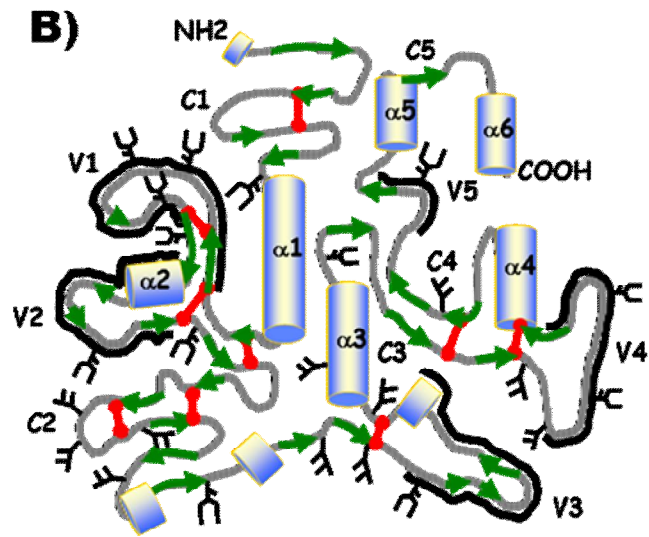
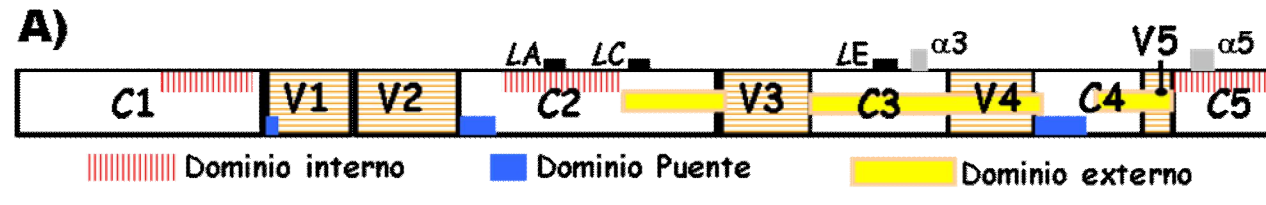
La secuencia V3, en forma de bucle (asa), de gp120 es el determinante mayor del tropismo por CCR5 o CXCR4 <sup>65, 66</sup>, pero también los dominios variables V1 y V2 intervienen al momento de reconocer al correceptor <sup>67</sup>. Mutaciones en estas regiones



variables puede cambiar la afinidad por uno u otro correceptor (CCR5 o CXCR4) <sup>68, 69</sup>.  
Figura 7B.

Tanto CCR5 como CXCR4 pertenecen a la **superfamilia de receptores 7M**, tiene 7 dominios transmembranales (TM1-TM7), tres asas extracelulares (ECL1-ECL3) y tres intracelulares; en el lado extracelular de esta proteína se encuentra el extremo amino (Nt) y en el intracelular el extremo carboxilo (Ct) (Figura 8B), La segunda asa extracelular (ECL-2) del correceptor es importante en la interacción con gp120, para la unión con el virus <sup>70</sup>. Sin embargo, es clara la necesidad de las cepas virales R5 por interaccionar con el extremo Nt de CCR5 para poder infectar a la célula <sup>71, 72</sup>; individuos que han heredado de ambos padres (homocigotos) una mutación en el gene que codifica para CCR5 (la mutación  $\Delta 32$ -CCR5) son resistentes a la infección por el VIH <sup>73, 74</sup>.

Tras la interacción de la gp120 con los receptores celulares se desencadena la maquinaria de fusión que yace en gp41.



Carbohidratos N-ligados tipos híbridos (alta manosa) y complejos, respectivamente

Estructuras secundarias: hebra Beta y alfa hélice, respectivamente

Puente disulfuro

Figura. 6 **Características estructurales de gp120.**

A) Secuencia lineal, ubicación de las secuencias variables (V) y constantes (C); posición relativa de secuencia que forman parte del dominio interno, externo y hoja puente; algunos acomodos secundarios, bucles (LA, LC y LE B) y  $\alpha$  hélices ( $\alpha 3$  y  $\alpha 5$ ). B) Mapa de la estructura secundaria, hebras beta (flecha) y hélices alfa (cilindros); sitios de glicosilación y de puentes disulfuro. C) Representación tridimensional; se muestran los dominios internos, externos y la hoja puente (los elementos de la disposición secundarios se agrupan para formarlos); regiones variables fueron quitadas para facilitar la cristalización y con ello la predicción del acomodo estereoespacial de la molécula completa.

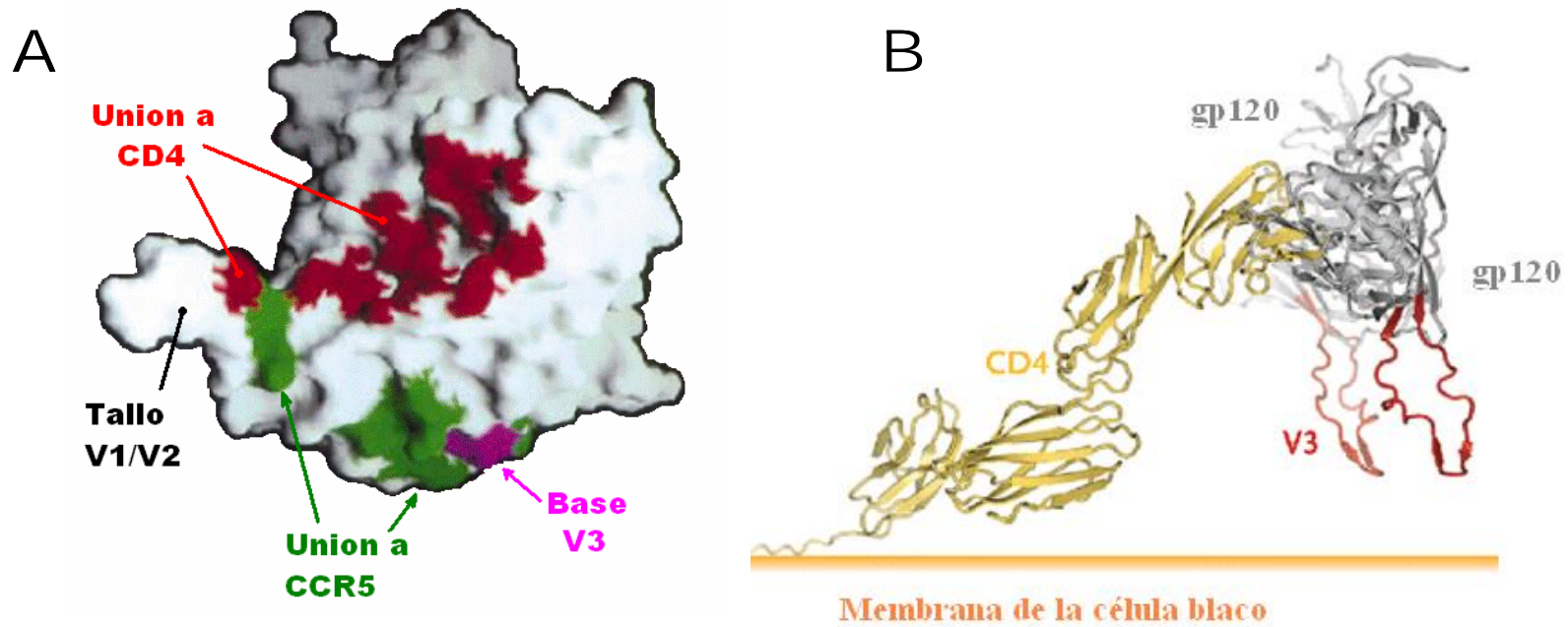


Figura. 7 **Representación de gp120.** A) Modelo superficial de gp120, se observan las zonas de unión a los receptores celulares. B) Representación en listón de CD4 unida a gp120, con la unión se expone el asa V3.

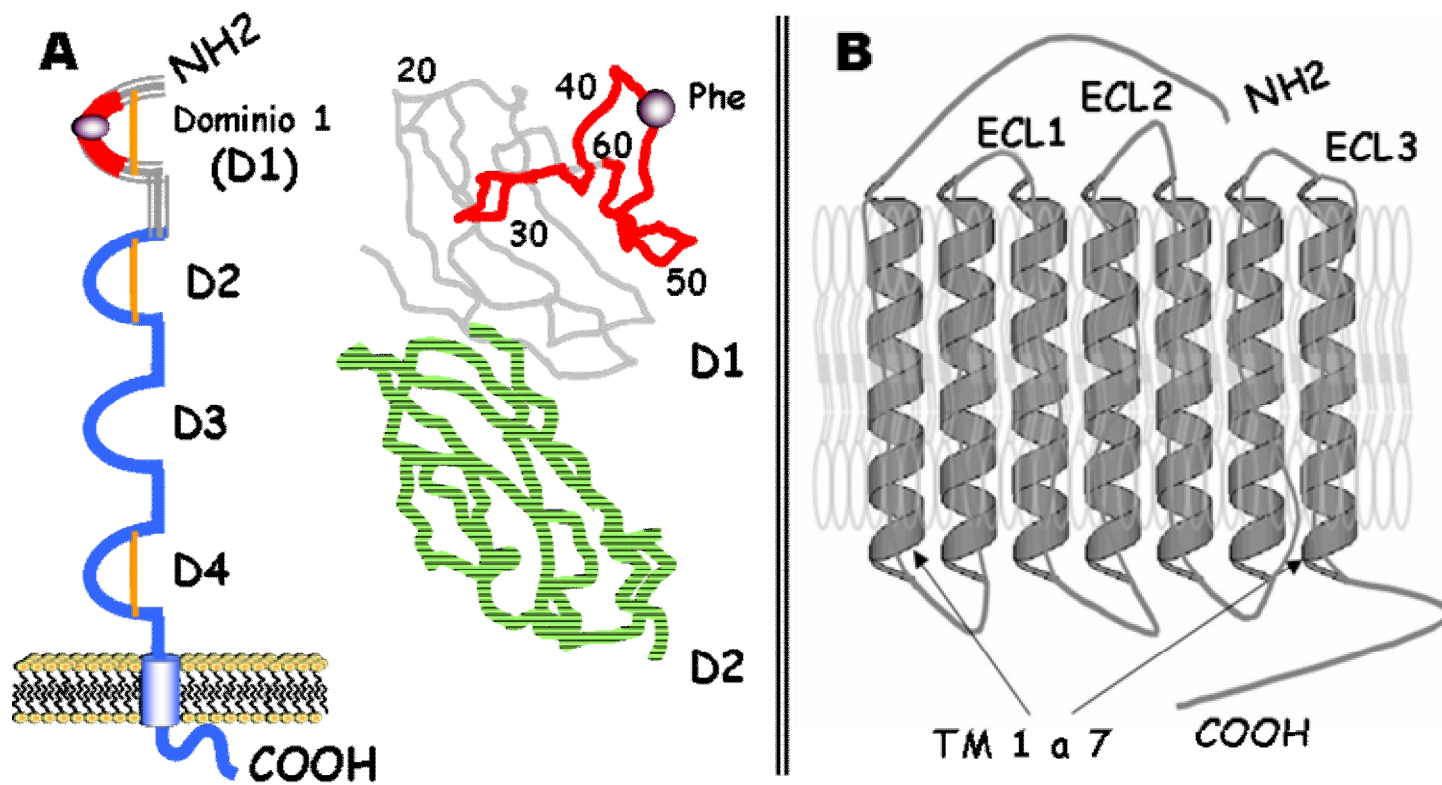


Figura. 8 Receptores de la membrana celular reconocidos por el VIH. A) CD4 y B) CCR5-CXCR4.

### 5.1.1.2 GLICOPROTEÍNA Gp41

La glicoproteína gp41 se ha dividido en tres zonas (Figura 9A): cola citoplasmática (que contiene al extremo carboxilo), región transmembranal (que atraviesa a la membrana) y ectodominio (o dominio extracelular, que contiene el extremo amino); a su vez, cada una de las anteriores se ha subdividido. La cola citoplasmática interactuar con las proteínas de la matriz (MA), lo cual permite su incorporación en el virus <sup>75, 76</sup>; además tiene dos dominios que alteran la estabilidad o permeabilidad de la membrana, denominados péptidos líticos de lentivirus (LLP-1 y LLP-2).

El ectodominio está involucrado directamente en la fusión de la envoltura viral con la membrana blanco. Tiene dos  $\alpha$ -hélices con un patrón característico de 7 aminoácidos (aa), llamadas secuencias hepta repetidas (HR), y en su parte distal (lado amino) se encuentra el péptido de fusión. Ambas hélices están separadas por un bucle (asa) que les permite interactuar de forma antiparalela. La  $\alpha$ -hélice próxima a la membrana se le llama CHR o HR2 y la más distal es llamada NHR o HR1. Adicionalmente, la asociación entre trímeros del complejo Env es mediada por la interacción entre las  $\alpha$ -hélices de gp41 vecinas, se ordenan con las HR1 al centro y las HR2 en la periferia <sup>77</sup>. Figura 9 B y C.

## 5.2 FUSIÓN VIRUS-CÉLULA

El virus se ancla a la membrana blanco debido a que gp120 interactúa con los receptores celulares. El proceso siguiente son los cambios conformacionales en gp41 que propician la fusión de la envoltura viral con la membrana celular. Las  $\alpha$ -hélices de gp41 se despliegan, en un acomodo (motivo) conocido como resorte enrollado (*coiled-coil*, en ingles) o prehorquilla (*prehairpin*, en ingles). La conformación de prehorquilla le permite al péptido fusogénico de gp41 insertarse en la membrana de la célula blanco. Posteriormente gp41 tiende a replegarse, pasando a un acomodo de hélices antiparalelas llamado ovillo de 6 hélices (6HB) (*six-helix bundle*, en ingles). La generación del 6HB acerca lo suficiente la envoltura viral con la membrana celular, lo cual causa una perturbación entre ellas y eventualmente su fusión. La Figura 10 muestra un esquema de los eventos moleculares que tienen lugar durante la fusión de las membranas viral y celular.

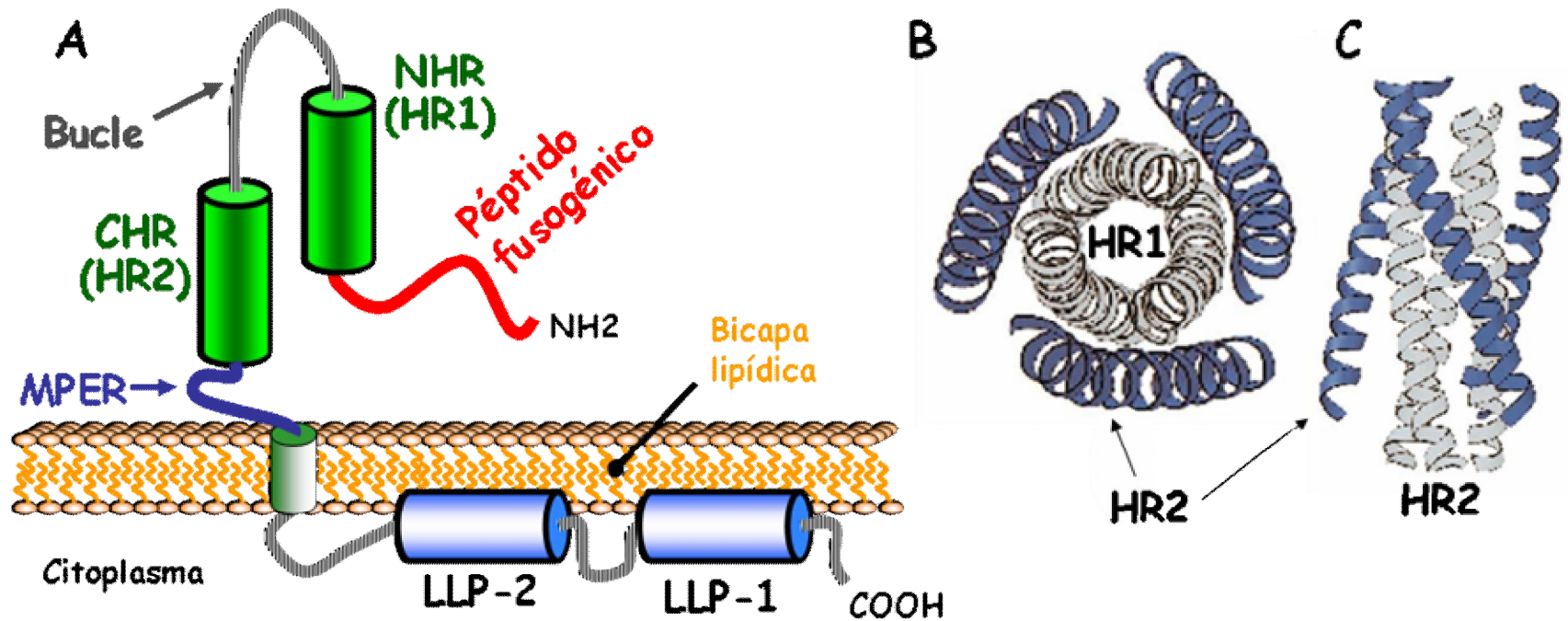


Figura. 9 **Estructuras en gp41**. En A) se representan las principales zonas de gp41: péptido fusogénico, alfa hélices con heptarepetidos (HR) [lado amino (NHR o HR1) y lado carboxilo (CHR o HR2)], bucle, region extracelular próxima a la membrana (MPER) y los LLPs. B) y C) Asociación de los dominios HR cuando las gp41 interactúan formando trímeros; B) vista transversal y C) vista lateral.

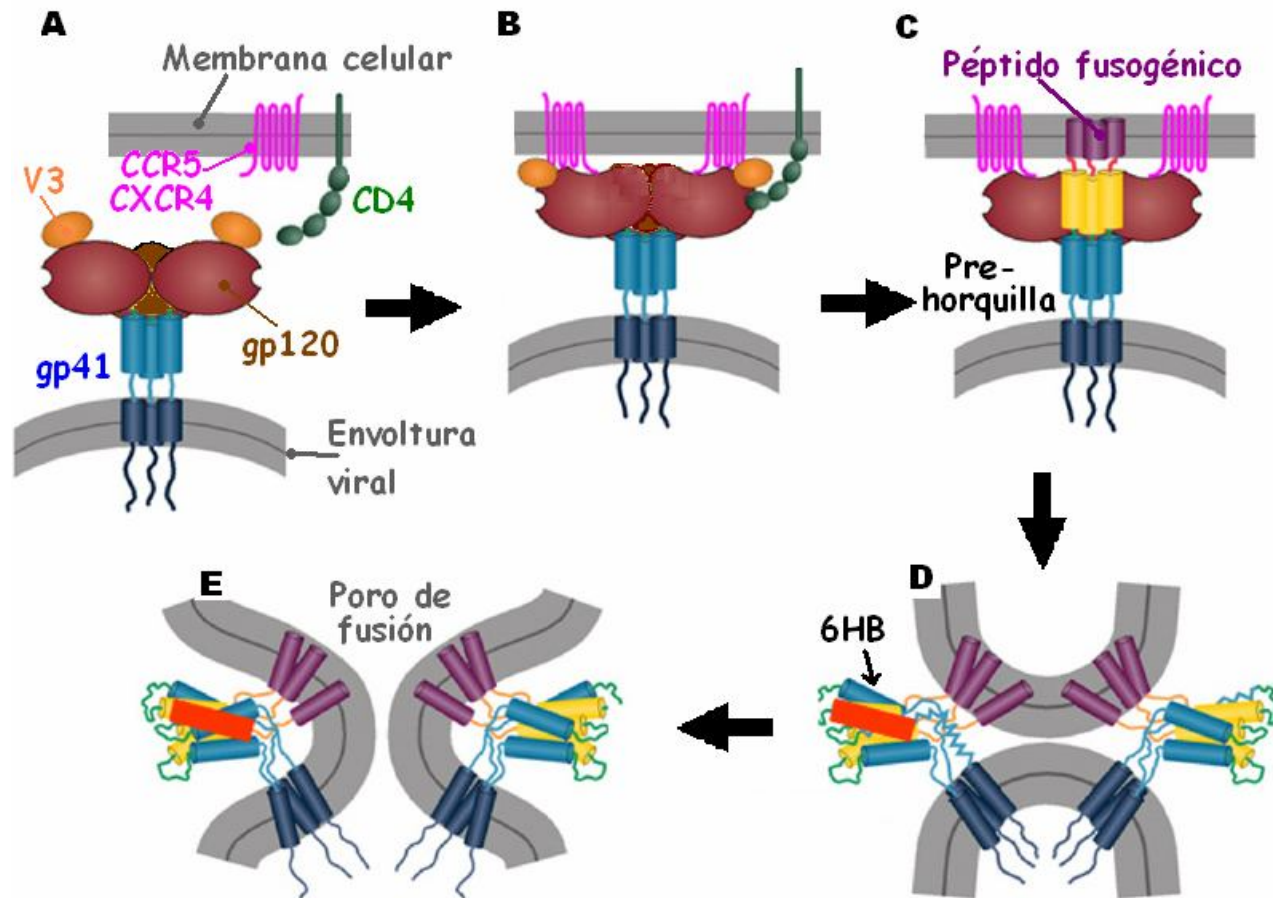


Figura. 10 **Interacción de Env con receptores celulares y fusión de membranas.** A) CD4 es el receptor primeramente reconocido por gp120. B) Tras la interacción, gp120 expone sitios de unión al coreceptor (presentes en V3, V1 y V2); la flexibilidad en CD4 permite un mayor acercamiento de gp120 al coreceptor; C) Al desplegarse gp41, en la llamada prehorquilla, el péptido fusogénico de gp41 puede insertarse en la membrana de la célula blanco, perturbando su estructura. D) La tendencia a restablecer la interacción entre las hélices de gp41 genera la estructura 6HB. E) Lo anterior provee la energía libre necesaria para la formación de un poro de fusión, el cual después se expande.



### 5.3 EVENTOS TEMPRANOS DEL CICLO DE REPLICACIÓN VIRAL

Con la fusión de la envoltura viral a la membrana plasmática el genoma viral accede al citoplasma. La integración del genoma viral es requisito fundamental para una infección productiva <sup>78</sup>. Antes de la integración, el genoma viral tiene que ser retrotranscrito en ADN, así como viajar desde el área adyacente a la membrana celular hacia el núcleo. A continuación se destacan las generalidades y particularidades de estos procesos.

#### 5.3.1 TRÁNSITO HACIA EL NÚCLEO

El ARN genómico viral entra a la célula junto con las distintas proteínas que la acompañan (RT, IN, PR, Nef, MA, CA, Vif y proteínas celulares acarreadas <sup>79, 80</sup>; ver estructura del VIH). A esta asociación de ARN genómico viral y proteínas se le conoce como complejo de la retrotranscripción (RTC).

**Interacción con el citoesqueleto.** El RTC es acarreado hasta la periferia del núcleo celular mediante su interacción con proteínas del citoesqueleto <sup>81</sup>: primero interacciona con el cortex de actina ubicado debajo de la membrana plasmática <sup>82</sup>, posteriormente con la red microtubular y en la vecindad del núcleo interactúa con los filamentos de actina que lo rodea <sup>83</sup>. Específicamente regiones de Gag se asocian con la dineina (tiene afinidad por los microtubulos) <sup>84</sup>. Es posible que la proteína viral Nef participe en el trancito de RTC al núcleo modulando la organización del citoesqueleto <sup>85</sup>. Figura 11.

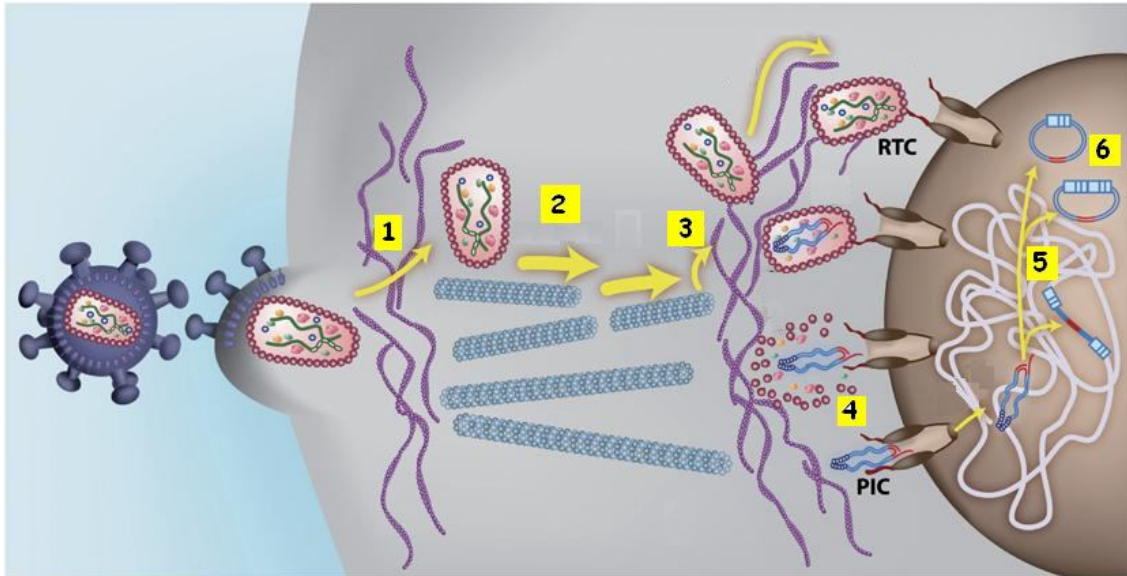


Figura. 11 **Tránsito del genoma viral al núcleo celular.** El RTC interacciona con el citoesqueleto para ser transportado al núcleo (1-3). Una vez que la RT genera la copia del genoma viral en ADN (ADNc viral) sucede la descapsidación, generando el complejo de preintegración (PIC) (4). Las formas circulares de este genoma viral, con una o dos LTR's, son productos alternos a la integración de ADNc viral (5, 6). Ver texto.

### 5.3.2 RETROTRANSCRIPCIÓN

En su camino al núcleo la información genética viral de ARN es copiado en el ADNc, mediante transcripción inversa (ver ciclo de replicación). La enzima encargada de hacer este proceso, es parte del RTC, es la retrotranscriptasa (RT) (también llamada transcriptasa inversa o polimerasa de ADN dependiente de ARN/ADN). En base a su composición, la RT se denomina p66/p51, ya que es un heterodímero asimétrico formado por la asociación de las proteínas p66 y p51 (ésta última es el resultado de la remoción proteolítica de parte del extremo carboxilo de otra p66).

Una característica a destacar del ARN genómico viral (ARNg), importante para entender el proceso de retrotranscripción, es que tiene sentido (polaridad) positivo (+); este término significa que si fuera desprovisto de todas las proteínas virales funcionaría directamente como un ARN mensajero (ARNm); como es típico de los ARNm contiene la

capucha-5' (denominada 5'Cap en ingles) y el tallo poliadenilado-3', en sus extremos respectivos. El ensamblado viral que acompaña al ARNg evita que sea usado como ARNm la contingencia de ser traducido y originar proteínas virales. Por convención se dice que un ARN (+) (ARNm) se origina, durante la transcripción genética, partiendo de un molde de ADN negativo (-).

La RT viral inicia la transcripción inversa del ARNg a partir del cebador (iniciador, *primer*, en ingles) de origen celular (**ARNt-Lys**) localizado en la secuencia PBS (secuencia de unión al iniciador) en el ARNg; como se menciono el ARNt-Lys es acarreado en el virus maduro (ver estructura del virus). Este cebador se encuentra próximo al extremo 5', a partir de éste la RT inicia la síntesis del primer segmento de la hebra de ADN dirigiéndose hasta el final del extremo 5'. Este primer segmento de ADN, llamado ADN de fuerte terminador, tiene un sentido negativo (-) y contiene las secuencias R y U5. La actividad ARNasa (H) de la RT degrada el ARN que fue copiado. Posteriormente este primer segmento de ADN es transferido al extremo 3' del ARN, en donde se unen ARN y ADN mediante sus extremos complementarios R; este proceso es conocido, también, como primer salto. El segmento de ADN (-) ahora colocado en el extremo 3' es el cebador para continuar con la síntesis, del ADN (-), hasta el extremo PBS-5' del ARNg; con lo cual a la secuencia U5 y R se agrega la U3, formando la primera LTR. Nuevamente la actividad ARNasa H de la RT degrada al ARN viral que ha sido copiado en ADN. No obstante, el VIH cuenta con dos sitios de ARN resistentes a la degradación denominados tractos de polipurinas (PPT), uno de ellos por estar colocado al centro se le abrevia como cPPT. Estos PPT de ARN que quedan apareados con la primera hebra de ADN viral (ADN-) sirven como cebadores para la síntesis de la segunda hebra de ADN. Este proceso crea la LTR en el ADN (+), copiando la LTR previamente formada en el ADN (-); la LTR en el extremo del ADN (+) se continua

con la copia del PBS complementaria del ARNg que aun sigue unido al ARNt-Lys del ADN (-), luego del cual la ARNt-Lys unido es degradada. De manera que en conjunto los pasos previos generan dos LTR's y dos extremos PBS, uno en el ADN (-) y otro en el ADN(+). En otra transferencia intramolecular (segundo salto) los extremos PBS se asocian para formar un intermediario circular; lo anterior permite que las cadenas complementarias, ambas ya de ADN, se usen mutuamente como moldes. Con el intermediario circular, los PBS sirven como cebadores para seguir con la síntesis de segmentos que faltan por copiar del ADN. Cuando la síntesis llega al cPPT de ARN que sirvió de cebador es quitado y la síntesis continua algunos pares de bases formando un ADN traslapado, característico del VIH; este segmento procede del PBS unido al LTR. Para agregar las dos LTR faltantes la RT realiza el desplazamiento y síntesis de las LTR localizadas en el intermediario circular. Es importante señalar que la proteína viral NC coopera con los procesos de transferencia requeridos por la RT. Figura 12.

**Nucleocapside (NC, p7).** Durante el ensamble del virus esta proteína viral originalmente forma parte de la poliproteína Gag<sup>86, 87</sup>; es indispensable para empaquetar al ARN genómico viral durante el ensamble de la partícula viral<sup>88</sup>, se une al ARN tanto de forma específica (señal de empaquetamiento  $\Psi$ , psi)<sup>89, 90</sup> como inespecífica<sup>91</sup>. Posteriormente en la infección, hace que la actividad de la RT sea eficiente, funciona como chaperona de la retrotranscripción<sup>92, 93</sup>.

Se ha demostrado que el RTC llega a la periferia del núcleo con la estructura de la capsida (CA) aún integra y es hasta que la retrotranscripción del genoma viral se completa cuando se desensambla (desnudamiento, *uncoating* en inglés)<sup>94</sup>; anteriormente se creía que el desensamble de la capsida era previo a la retrotranscripción. Se considera que la

fosforilación de la capsida por miembros de la MAPK, proteincinasas de la célula, facilita el desensamblado de la capsida<sup>95</sup>.

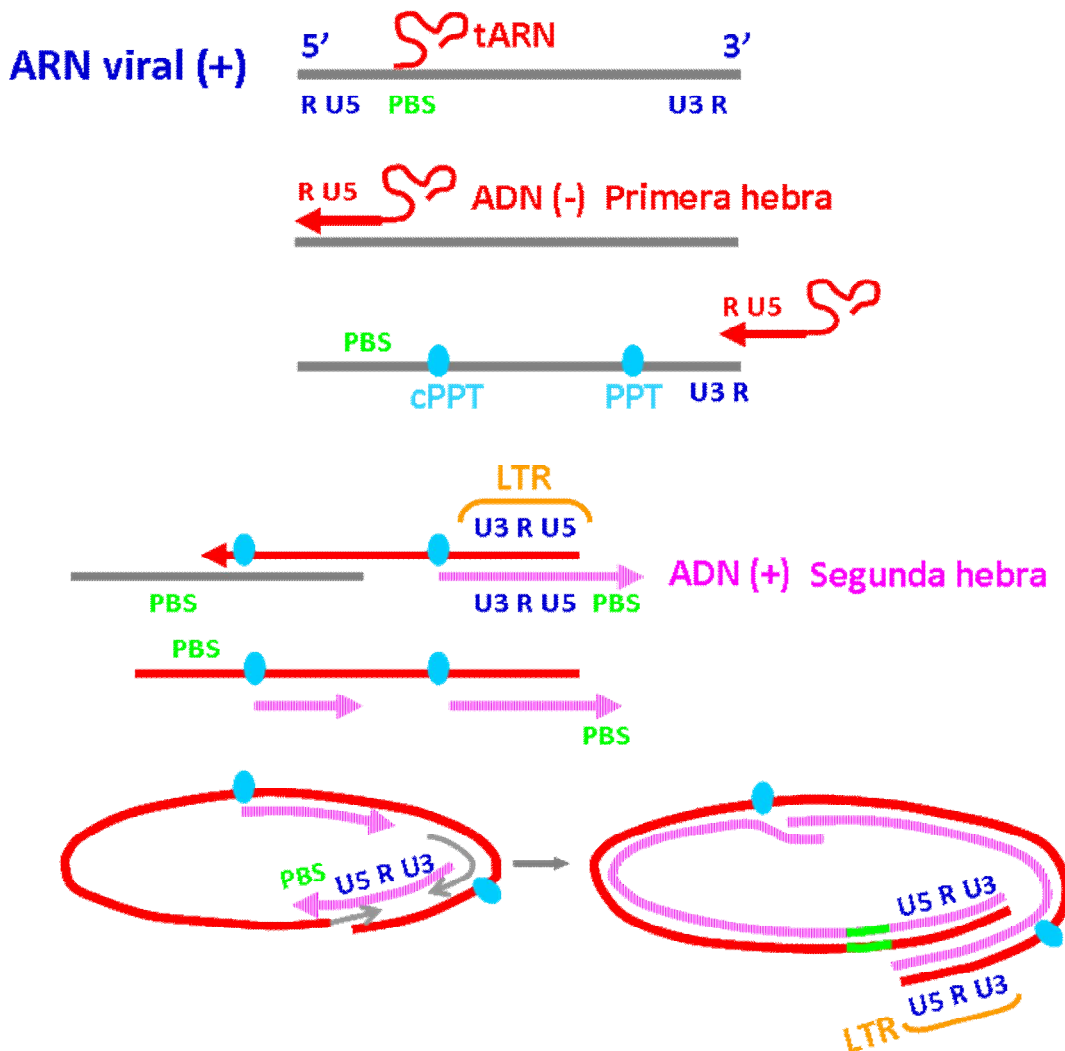


Figura. 12 **Pasos clave de la transcripción inversa del ARN genómico del VIH (ARNg).** En este proceso se generan el ADNc viral. El ARNt-Lys funciona como primer cebador de la transcripción inversa; conforme la RT va haciendo una copia en ADN del genoma viral también va degradando el ARNg ya copiado. Los PPT son secuencias del ARNg que son resistentes a la degradación de la RT, estos segmentos PPT de ARN sirven también como cebadores. La LTR se originan por la transferencia de un segmento copiado en ADN con las secuencias U5 y R (del extremo 5') hacia de el extremo 3' del ARNg que contiene a U3 y R; cuando este segmento de ADN es usado para proseguir con la copia del ARNg a la secuencia U5 y R se le agrega la U3, las tres regiones de la LTR. Cuando las secuencias PBS de ADN son terminadas también sirven como cebadores. En el VIH el PPT central (cPPT) permite la formación de la estructura conocida como ADN traslapado (ADN *flap*, en inglés).

**Ciclofilina A (CypA)**, es una peptidil isomerasa celular acarreada en el virus (durante el ensamble y posterior gemación de la célula infectada). Esta proteína cataliza la isomerización *cis/trans* de la prolina-90 de las proteínas de la capsida (CA)<sup>96</sup>; se une al dominio amino terminal de CA<sup>97</sup>, lo cual aparentemente es requerida para la conformación y ensamble correcto de estos monómeros en la capsida<sup>98</sup>. Es posible que mantenga la estabilidad de la estructura de la capsida, cuando el virus entra a la célula. Esta estabilización podría proteger al RTC de la actividad de la proteína celular **TRIM5- $\alpha$**  (proteína citoplásmica con actividad antiviral)<sup>99</sup>, que manda a degradación proteosómica a las proteínas CA<sup>100</sup>; la CypA evitaría el desensamble prematuro de la capsida antes de que se de la retrotranscripción<sup>101</sup>.

**Vif.** Una de las proteínas accesorias del virus; tiene una masa molecular de 23 kDa. Si bien esta proteína forma parte de la partícula viral su función relevante la realiza antes de que el virus gema de la célula. Evita que el virus acarree a la proteína celular **APOBEC3G (A3G)**, un factor de restricción antiviral que interfiere con la retrotranscripción. A3G es una citidina desaminasa celular que se une al ARN<sup>102, 103</sup>; al momento de la retrotranscripción causa la mutación de la dC por dU en la primera hebra de ADN retrotranscrita; posteriormente por cada dU se adiciona dA a la segunda hebra de ADN (hebra positiva) generada. El gran número de mutaciones (hipermutaciones) que introduce A3G genera un ADNc proviral abortivo<sup>104</sup>. Vif induce la degradación de APOBEC3G vía proteosoma (26S)<sup>105</sup>; específicamente Vif interactúa con la **ubiquitina ligasa E** (complejo proteico celular formado por Cullen-5, elonginas-B/C y Rbx1)<sup>106</sup>, para inducir la poliubiquitinación de A3G. La degradación de A3G evita que sea incorporada en los virus recién formados; lo que impide la retrotranscripción defectuosa antes mencionada.

### 5.3.3 ENTRADA DEL ADNc VIRAL AL NÚCLEO CELULAR

Se mencionó que en su camino hacia el núcleo celular se genera el ADN genómico viral; el desensamble de la capsida es un requisito para que este genoma viral entre al núcleo <sup>107</sup>; sin embargo, sigue asociado con las proteínas RT, IN, Vpr <sup>108</sup> e incluso conserva proteínas de la MA y CA <sup>109, 110</sup>. A la asociación de estas proteínas y el ADNc viral se le denomina complejo de preintegración (PIC).

Las señales de localización nuclear (NLS) son secuencias consenso de aminoácidos presentes en las proteínas destinadas a entrar al núcleo celular. El PIC es redundante en la expresión de dichas señales, ya que las proteínas IN, MA y Vpr contienen secuencias NLS <sup>111, 112, 113, 114</sup>. La redundancia de las NLS en el PIC asegura su importación al núcleo, independientemente de que la célula se encuentren o no en división.

La necesidad de la interacción del PIC con proteínas celulares para su entrada al núcleo se ejemplifica describiendo la función de las proteínas virales Vpr e IN:

**Vpr.** Miembro de las proteínas accesorias del VIH que cuenta con 96 aminoácidos, con alrededor de 14 kDa, forma parte del virión y también es parte del PIC. Es importante para la infección productiva de células que no están en división (ejem, Mφ-Mφ) <sup>115, 116, 117</sup>; esta función la realiza regulando la entrada al núcleo del PIC mediante su interacción con el complejo de proteínas del poro nuclear <sup>118, 119</sup>; específicamente se ha demostrado que se asocia con las proteínas celulares **importina-α** y nucleoporina **hCG1** para realizar su actividad de transportación <sup>120 121</sup>. Adicionalmente Vpr puede desestabilizar la envoltura nuclear <sup>122</sup>, dado que el PIC es más grande que el diámetro del poro nuclear es posible que esta función de Vpr también ayude en la entrada al núcleo.

**IN** (Integrasa del VIH). Proteína viral, como parte el transporte del PIC al núcleo específicamente interactúa con la **importina** (carioferina)  $\alpha/\beta$ <sup>123, 124</sup>, **importina 7**<sup>125, 126, 127</sup> y **transportina-SR2** (transportina 3)<sup>128, 129</sup>, proteínas celulares de las vías de transporte nuclear. Desde luego posteriormente la IN se encarga de unir el ADNc viral al genoma de la célula, esta función se describirá adelante.

Otras proteínas celulares implicadas en la entrada del PIC al núcleo son las nucleoporinas **Nup98**, **Nup358/RanBP2** y **Nup153**<sup>130, 131, 132</sup>.

#### 5.3.4 INTEGRACIÓN DEL ADNc VIRAL AL GENOMA CELULAR

El genoma viral es integrado en el ADN celular después la entrada del PIC al núcleo celular. Brevemente, el proceso de integración consiste en que la IN corta dos nucleótidos en los extremos-3' de las dos hebras del ADN bicatenario viral, específicamente remueve los nucleótidos GT en los extremos-3' de las LTR; además la IN hace dos cortes en el ADN celular, entre un corte y otro hay una separación de 5 nucleótidos y están en cadenas distintas del ADN celular; la IN une covalentemente los extremo-3' del LTR viral con los sitios de corte en el ADN celular, estos extremos ocupan cadenas contrarias del ADN. Sin embargo, para que los extremos-5' del genoma viral se unan covalentemente a la hebra de ADN que les corresponde, la IN quita dos nucleótidos al extremo-5' del LTR y las proteínas celulares termina el proceso; la **maquinaria celular de reparación del ADN** se encarga de llenar las brechas de cinco nucleótidos faltantes entre la hebras del ADN celular y su correspondiente extremo 5' del LTR y finalmente une covalente los extremos-5' del LTR con el ADN celular. Figura 13.



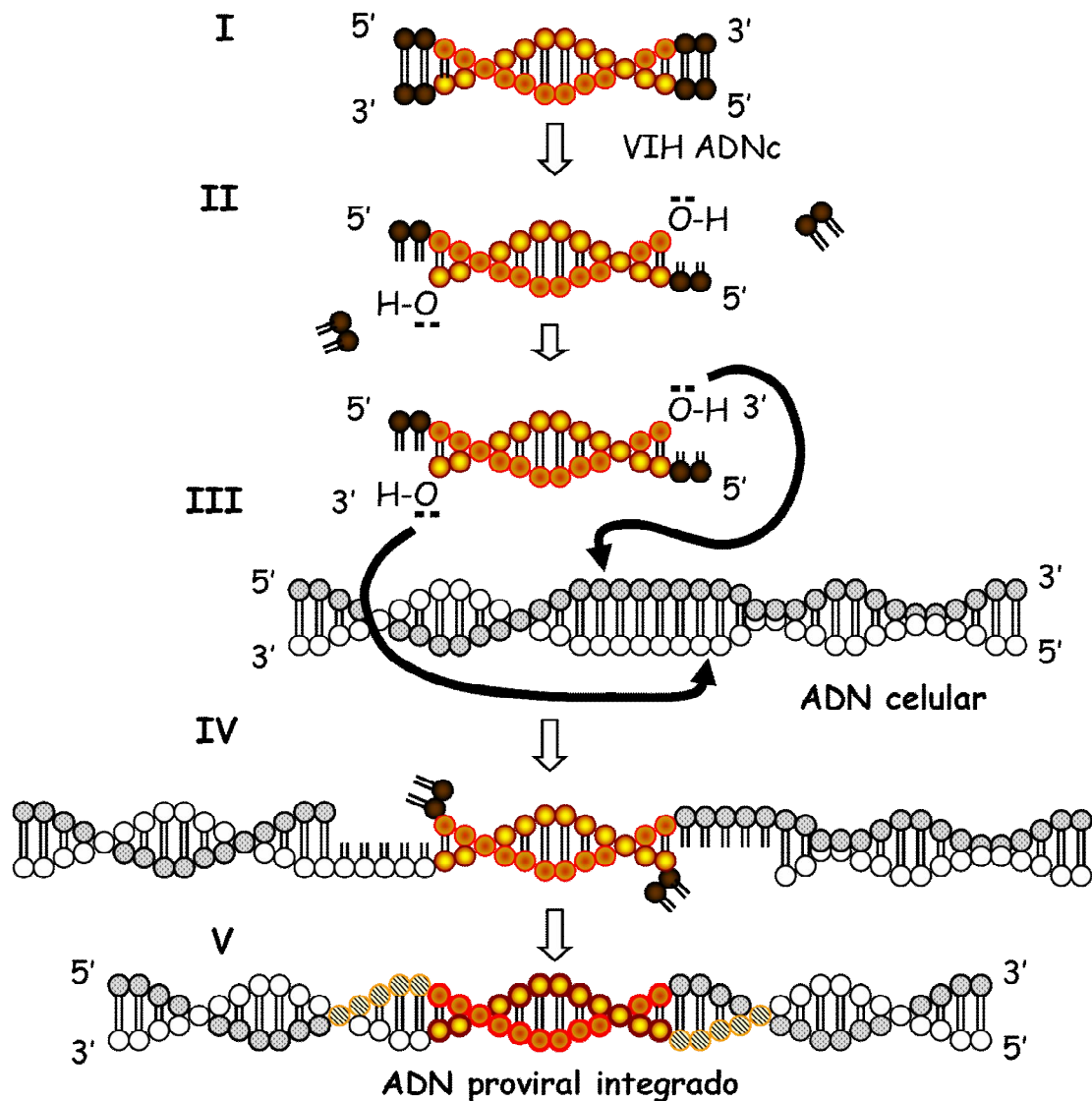


Figura. 13 **Integración del VIH.** La integración del ADNc viral (I) requiere la catálisis de la proteína viral IN, la cual realiza cortes tanto en las LTR (II) del virus como en el genoma celular (III); además, la integrasa une parcialmente los extremos del ADN proviral a la célula (IV). La maquinaria de reparación de ADN de la célula llena los huecos y une covalente la secuencia reparada (V). El proceso se describe en el texto.

Diversas interacciones entre la IN y las proteínas celulares permiten que la integración del genoma viral no sea al azar. Los sitios de integración tienen la característica de ser regiones con genes activos<sup>133</sup>, con bajo contenido en GC. La IN se une al factor de transcripción celular **LEDGF/p75** favoreciendo la inserción del ADN en sitios donde se encuentra este factor de transcripción<sup>134, 135 136</sup>. Así mismo la IN interactúa con la proteína

celular **HMGA1** [además conocida como **HMG1(Y)**] para reconocer los sitios y aumentar la eficiencia de integración <sup>137, 138</sup>; **HMGA1** es miembro de las proteínas no histonas con preferencia por secuencias ricas en AT del DNA, que está en concordancia con la afinidad del ADN viral por sitios del genoma con alta transcripción; adicionalmente se sabe que la interacción de **HMG1** con otras proteínas nucleares modula la arquitectura y transcripción del ADN <sup>139</sup>, estas funciones serían importantes para aumentar la antes mencionada eficiencia de integración del ADN viral. Figura 14

También se observa una preferencia de la integración del genoma viral por segmentos del ADN celular flanqueados por los llamados **MAR** o **SAR** <sup>140</sup>, es decir flanqueados por secuencias del ADN que se unen a la envoltura nuclear. La unión del ADN a la envoltura nuclear es mediada por proteínas adaptadoras, con afinidad en un extremo por los microfilamentos de la lámina de la envoltura nuclear y por el otro extremo con afinidad por secuencias del ADN. Dos de estas proteínas, que también se asocian entre ellas, participan en la integración del genoma viral: la **emerina** y **BAF**, esta última previene que el genoma viral se una consigo mismo (auto integración) <sup>141 142, 143</sup>.

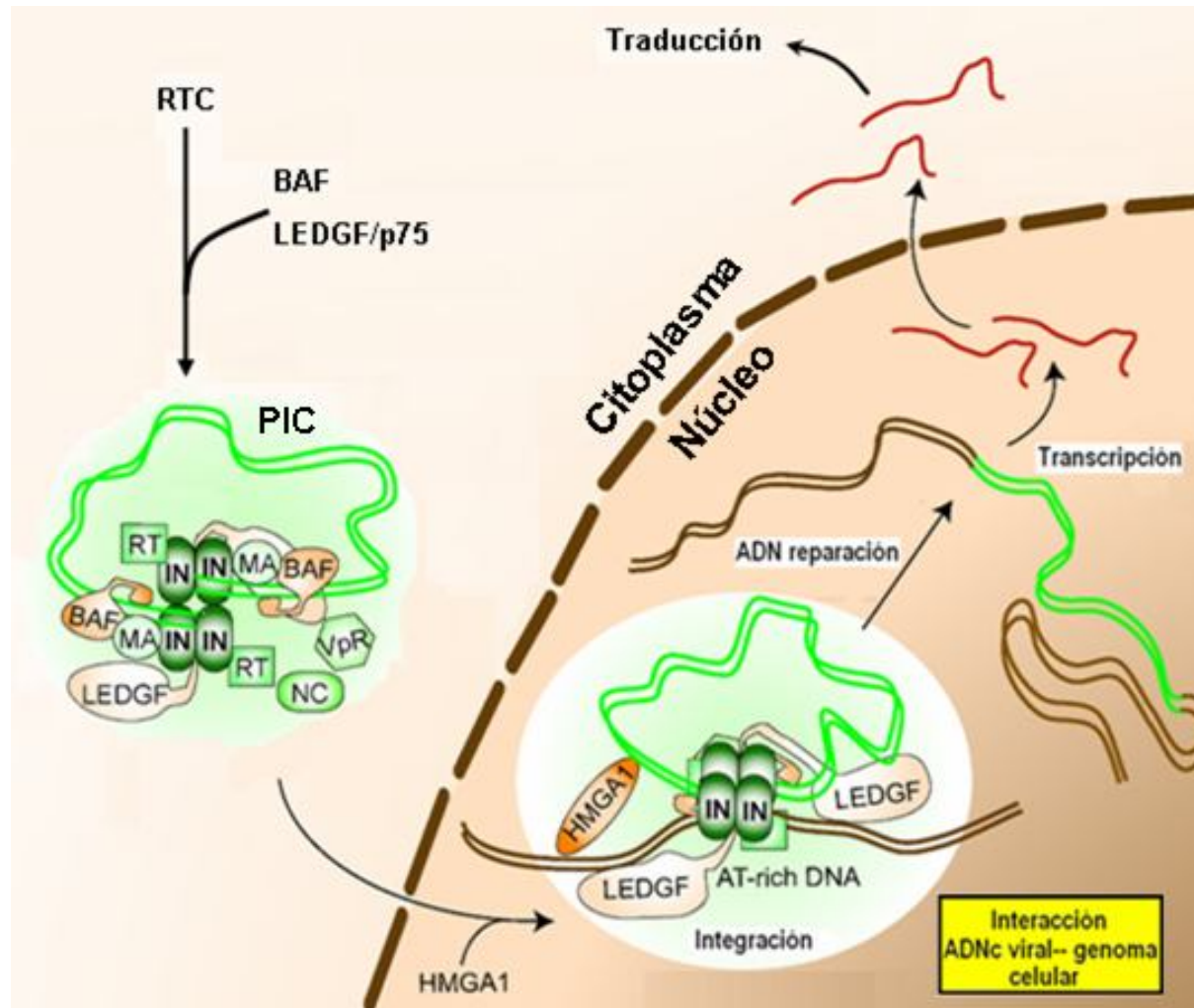


Figura. 14 **Integración del genoma viral.** Una vez que el PIC entra al núcleo celular su interacción con diversas proteínas celulares (LEDGF, HMGA1, BAF, emerina) permiten que la integración no sea al azar, ocurre en secuencias del genoma celular flanqueadas por las MAR/SAR. La integración del genoma viral se da en regiones activas del genoma ricas nucleótidos AT.

## **5.4 EVENTOS TARDÍOS EN LA REPLICACIÓN DEL VIH**

Los eventos tardíos de la replicación viral comienzan con la transcripción, siguen con la expresión de las proteínas virales y concluyendo con la formación de un virus maduro (ver ciclo de replicación).

### **5.4.1 ELEMENTOS DEL PROVIRUS QUE DETERMINAN SU ACTIVIDAD**

#### **TRANSCRIPCIONAL**

Al genoma del VIH integrado se le conoce como provirus. El provirus interacciona con las proteínas nucleares, al igual que el genoma del hospedador, lo que permite que se comporte como un gen inducible (que es afectado por señales de activación o represión). El efecto de la interacción entre el provirus y proteínas celulares nucleares tiene una manifestación extrema en la llamada latencia viral, en este estado no hay transcripción viral en la célula infectada a pesar de que si hay integración del genoma viral <sup>144, 145</sup>.

Un elemento viral clave para la replicación del VIH son las LTR, como se dijo, se forman durante la retrotranscripción y es requerida para la integración del provirus. Su importancia en la replicación reside especialmente en que la LTR del extremo 5' es el promotor transcripcional del provirus. Tienen todas las características de un promotor eucariótico complejo, adaptado al ambiente nuclear, que interacciona con factores de transcripción positivos o negativos celulares <sup>146</sup>. La LTR del extremo 3' funciona como señal de terminación y poliadenilación.

A continuación se describirá las características de la LTR (en su función como promotor) y se revisará el efecto de los factores celulares y virales asociados con la actividad transcripcional del provirus.

#### 5.4.1.1 CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES Y GENERALES DE LA LTR.

Las LTR se han dividido en tres regiones funcionales U3, R y U5 <sup>147</sup> (Figura 15). La región R, que se transcribe (posición +1 a +100), contiene a la secuencia que codifica para TAR; TAR es un transcrito de ARN al que se une la proteína viral transactivadora Tat para hacer eficiente la actividad de la ARN polimerasa II (ver adelante). La región U5 se encuentra distal al sitio de inicio de la transcripción (+100 a +181), contiene sitios de unión para los factores de transcripción Ap-1, Ap3-L/NFAT, DBF/IRF y Sp-1 <sup>148, 149</sup>. La región U3 es la que contiene a la región promotora, esta situada corriente abajo del inicio de la transcripción (-454 a -1). La región U3 tiene la caja TATAA y la secuencia de unión a Sp-1 (imprescindible para la unión del complejo de preiniciación de la ARN polimerasa II); contiene los sitios de unión de NF-κB (importantes por unir al factores de transcripción que median la activación inmunológica); por último tiene una región modulable por diversos factores de transcripción, como USF, NF-IL6, LEF, RBF, T3R y, nuevamente, Ap-1 y NFAT. Para una revisión, ver Ramirez et al., 2005 y Pereira et al., 1999 <sup>150, 146</sup>.

El ADN proviral del VIH se organiza dentro de la cromatina en una estructura altamente ordenada <sup>151, 152</sup>. El genoma proviral interacciona con el ensamblado octamérico de proteínas celulares conocidas como **histonas**, generando nucleosomas (nuc). Dos de estos nucleosomas formados en la LTR se les denomina nuc-0 y nuc-1, se superponen con el sitio de inicio de la transcripción viral y con varios sitios de unión de factores de transcripción <sup>153</sup>. La formación de estos y otros nucleosomas a lo largo del provirus lo hace susceptible al control epigenético, del estado de acetilación de la cromatina, realizado por las enzimas celulares histonas acetil transferasas (**HAT**) (que favorecen la transcripción) <sup>154, 155</sup> y las histonas deacetilasas (**HDAC**) (que reprimen la transcripción) <sup>156</sup>. Otras



#### 5.4.1.2 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN CELULARES QUE SE UNEN A LA LTR

**Sp1** es requerido para la transcripción del VIH, tanto basal como dependiente de Tat; posiblemente dirige la unión de componentes clave de la maquinaria de transcripción celular basal <sup>160</sup>, pues se sabe que se asocia con **TBP** (proteína de unión a TATA), **TAF250** y **TAF55** (factores asociados a TBP 250 y 55, respectivamente) <sup>161</sup>. Además, potencia la transcripción, junto al NF- $\kappa$ B <sup>162</sup>.

**NF- $\kappa$ B** constituye una familia de factores de transcripción relacionados (también conocida como familia Rel) que participan en la transcripción viral en respuesta a mitógenos, citocinas y estímulos inmunológicos; además se conoce que NF- $\kappa$ B es un activador de genes implicados en inflamación y apoptosis. Dependiendo del miembro de la familia NF- $\kappa$ B unido al LTR del VIH se puede generar un efecto positivo o uno negativo sobre la transcripción del VIH <sup>163</sup>; cuando el homodímero **NF- $\kappa$ B p50 (NF- $\kappa$ B1)** se une al LTR del VIH promueve su represión, al asociarse con el represor de la transcripción HDAC1 <sup>164</sup>; en cambio, en los linfocitos T activados, el heterodímero NF- $\kappa$ B p50-**RelA** (RelA también se conoce como **p65**) promueve la transcripción, pues tiene la capacidad de desplazar al homodímero anterior y reclutar a las **HAT p300** y **CBP** (proteína de unión a CREB) <sup>165, 166, 167</sup>. Adicionalmente, RelA recluta directamente al complejo cinasa de la RNA polimerasa II, incluyendo a **TFIIH/CDK7** y **P-TEFb** <sup>168, 169</sup>; como describiremos más adelante P-TEFb es importantísima para la función de la proteína viral Tat.

**NFAT**, es una familia de factores de transcripción, algunos de sus miembros actúa en sinergia con otros factores (como NF- $\kappa$ B) para potenciar la transcripción del VIH <sup>170</sup>; en cooperación con **AP-1** promueve una extensa disrupción de los nucleosomas <sup>171</sup>. Además,

NFAT es un regulador clave de la activación de la expresión de los genes del VIH inducida por la IL-7<sup>172</sup>. Al igual que NF-κB, NFAT puede promover la remodelación de la cromatina, pues se ha visto que NFAT1 se asocia con miembros de la familia de coactivadores p300/ CBP<sup>173</sup>, cofactores antes mencionados.

**LEF/TCF1-α**, un factor de transcripción no inducible que al unirse a la LTR del VIH y promueve la activación del provirus. LEF/TCF1-a establece regiones libres de nucleosomas entre nuc-0 y nuc-1<sup>174</sup>, estas regiones pueden ser aun más expandidas por la unión de las proteínas **USF** y **Ets**; en cooperación con estos factores promueven la transcripción del VIH<sup>175</sup>.

**Factores RBF-1 y RBF-2**, se unen a los elementos de respuesta a **Ras (RBE I, II, III y IV)** presentes en la región U3 del LTR, estimulando la transcripción del VIH en respuesta a Ras. Ras es una proteína que permite la propagación de señales celulares mediante la activación de una cascada de cinasas. Mutaciones en las regiones RBE impiden la estimulación de la LTR en respuesta a Ras<sup>176</sup>.

**NF-IL6**. Es importante en el control de la expresión de genes en respuestas celulares mediadas por citocinas y lipopolisacáridos; parece regular la transcripción del VIH-1 a través de la unión compleja con otros factores celulares como **USF**<sup>177</sup>.

**Ets**, familia multigénica de proteínas (**Ets-1**, **Ets-2** y **Elf-1**) importantes en la regulación de la expresión del VIH en células T. Estudios *in vitro* con células T demostraron que la interacción entre múltiples proteínas Ets y miembros de la familia NF-κB/NF-AT son necesarios para la expresión eficiente de genes virales<sup>178</sup>. Además, la unión cooperativa entre Ets y el factor USF-1 activa sinérgicamente la transcripción del VIH-1

175.



**T3R** (receptor de la familia de hormonas tiroideas T3), estos se unen a elementos de respuesta a hormonas tiroideas (**TRE**) presentes en el LTR, traslapando con sitios de unión a NF-kB o a SP1<sup>179</sup>. Al unir a la hormona T3 tiene la capacidad de estimular la transcripción del VIH<sup>180</sup>, en ausencia o presencia de la proteína viral Tat<sup>181</sup>.

#### 5.4.1.3 FACTORES VIRALES QUE REGULAN LOS PRODUCTOS DE LA TRANSCRIPCIÓN

Además del efecto que tienen el estado de la cromatina y los factores celulares sobre la actividad transcripcional de las LTR (por lo tanto de la expresión del provirus), las proteínas virales Tat y Rev también alteran el curso de la expresión transcripcional. El efecto de Tat y Rev es análogo a un apagador (“*switch*”) que cambian la producción basal de un repertorio limitado de proteínas a una producción completa y eficiente de todas las proteínas que forman al virión.

**Tat** potencia la transcripción al unirse al ARN en una estructura terciaria denominada TAR (Transactivator Active Region), localizada en su extremo 5´ (al inicio de la transcripción de de todo ARN viral nascente). La unión de Tat a TAR es interpretada por P-TEFb, una cinasa celular compuesta del heterodímero CDK9 y la ciclina T1 (**CycT1**), la cual fosforila (en la serina 2) al dominio terminal carboxilo (CTD) de la subunidad más grande de la ARN pol II<sup>182</sup>. Mantiene fosforilado el CTD mientras transita corriente debajo de la LTR, lo que promueve un “ensamblaje móvil” del complejo **ARNpol-II-CDK9** y hace eficiente la transcripción. Figura 16

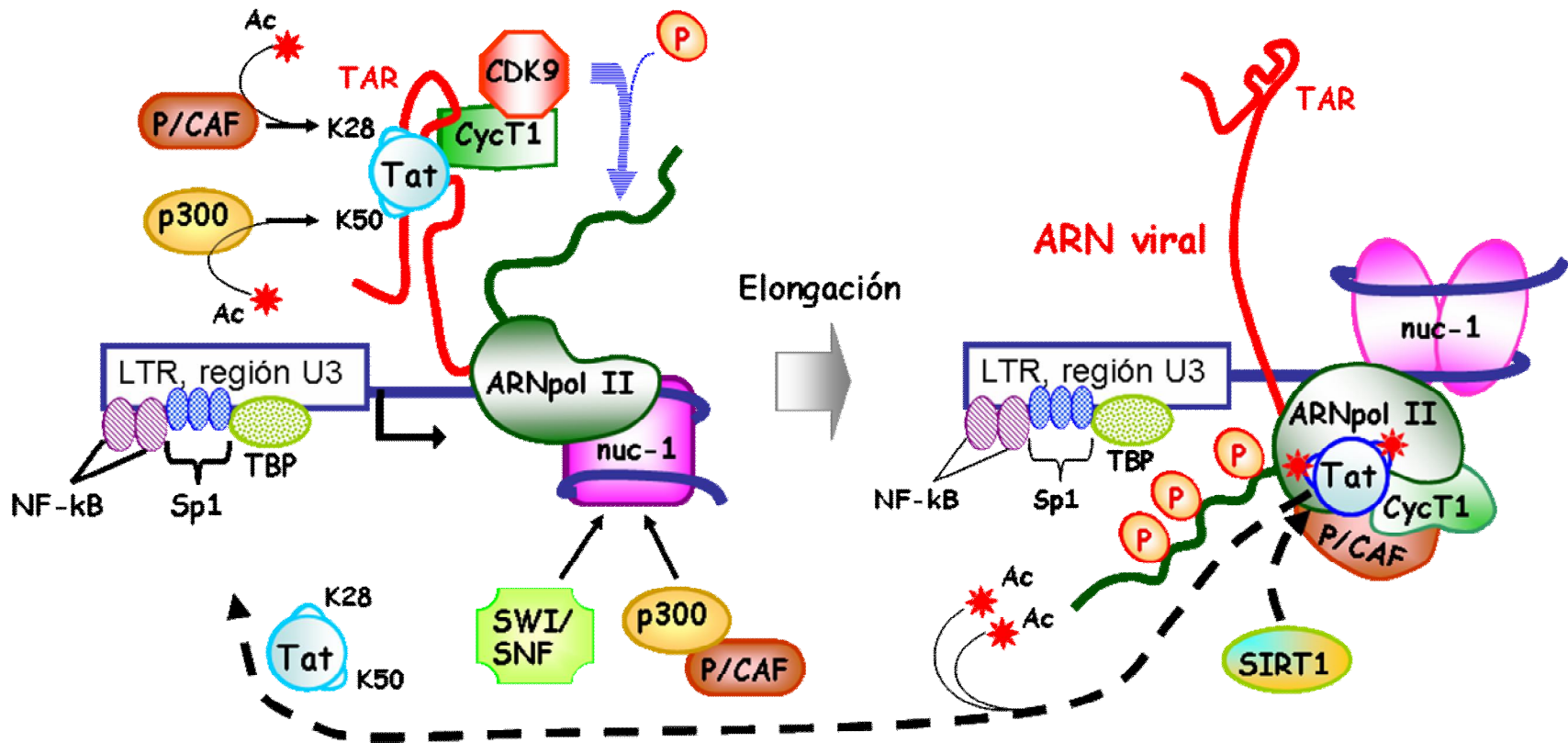


Figura. 16 **Mecanismos de activación transcripcional de la proteína viral Tat.** A) A raíz de la unión de Tat a la horquilla ARN TAR de todos transcrito naciente de VIH-1 activa la transcripción viral; esta proteína recluta al factor de transcripción positivo pTEFb, compuesto de Cdk9 y CycT1. Esta asociación mejora mediante acetilación de Tat por P/CAF en su residuo K28. Cdk9 fosforila el dominio CTD de la ARNpol-II, lo que aumenta su eficiencia de elongación. Posteriormente Tat se libera de TAR mediante la acetilación de su residuo K50, realizado por p300 y Gcn5. Entonces Tat se transfiere al complejo de elongación de la polimerasa, asociándose también con P/CAF. Tat también promueve la transcripción reclutando al complejo de remodelación de cromatinas SWI/SNF. B) Al finalizar la transcripción una HDAC [la sirtuina 1, (SIRT1)] desacetila a Tat, lo que desarma el complejo de elongación; con lo cual Tat puede reanudar el ciclo de activación transcripcional.

Además de promover directamente la transcripción del genoma viral, Tat también promueve el reclutamiento o interacción de éste con diversos factores celulares: interviene en el reclutamiento de HATs (p300 y P/CAF) a la LTR <sup>183, 184</sup>, reforzando o permitiendo un ambiente acetilado (de cromatina abierta) que favorecen una ciclo continuo de iniciación transcripcional; Tat puede estimular la acetilación del complejo RelA/p50 (miembros de la familia NF-κB, antes mencionados) lo que también estimula la actividad del complejo RelA-p50 <sup>185</sup>; alternativamente, Tat puede unirse a las secuencias de unión a NF-κB del DNA del genoma del VIH y transactivar en ausencia del NF-κB <sup>186</sup>; Tat promueve la actividad del complejo SWI/SNF (antes mencionado), este complejo remodelan la cromatina para permiten el paso de la maquinaria transcripcional <sup>187, 188</sup>; Tat puede influir en el reconocimiento del sitio de corte y empalme (*splicing*) a traves de su interacción con el complejo de corte y empalme (*splicing*) **ASF/SF-2**; se ha encontrado que P-TEFb interactúa con el factor de corte y empalme (*splicing*) celular **SKIP** que es esencial para la actividad transcripcional mediada por Tat <sup>189</sup>; Tat interactúa con los componentes de la maquinaria del encapuchado del ARN mensajero viral (*camping*, en ingles) (**Mce1** y **Hcm1**) <sup>190, 191</sup>.

**Rev** es una proteína viral indispensable para controlar eventos postranscripcionales requeridos para la replicación viral. Su actividad mantiene un equilibrio en la producción de las diversas proteínas virales y en la generación del ARN genómico.

En ausencia de Rev el transcrito proviral sufre cortes y empalmes múltiples que llevan a la síntesis de las proteínas Tat, Rev y Nef (proteínas tempranas, ver siguiente sección). Después de su síntesis, Rev asegura que el pre-ARNm sea exportado del núcleo antes de sufrir algún corte y empalme o cuando solo ha sufrido uno. El transcrito así rescatado codifica para proteínas estructurales (productos de los genes *gag* y *env*),

componentes enzimáticos (productos del gen *pol*) y para el genoma de ARN del VIH. Esta actividad de Rev se debe a su asociación con el ARN en una estructura terciaria (horquilla), denominada elemento de respuesta a Rev (**RRE**), en la región *env* del transcrito viral. Para exportar del núcleo a los ARN's incompletamente procesados y rescatarlos del corte y empalme, Rev recluta la proteína de exportación nuclear **CRM1/exportina-1** dependiente de **Ran GTP**<sup>192</sup>. Figura 17

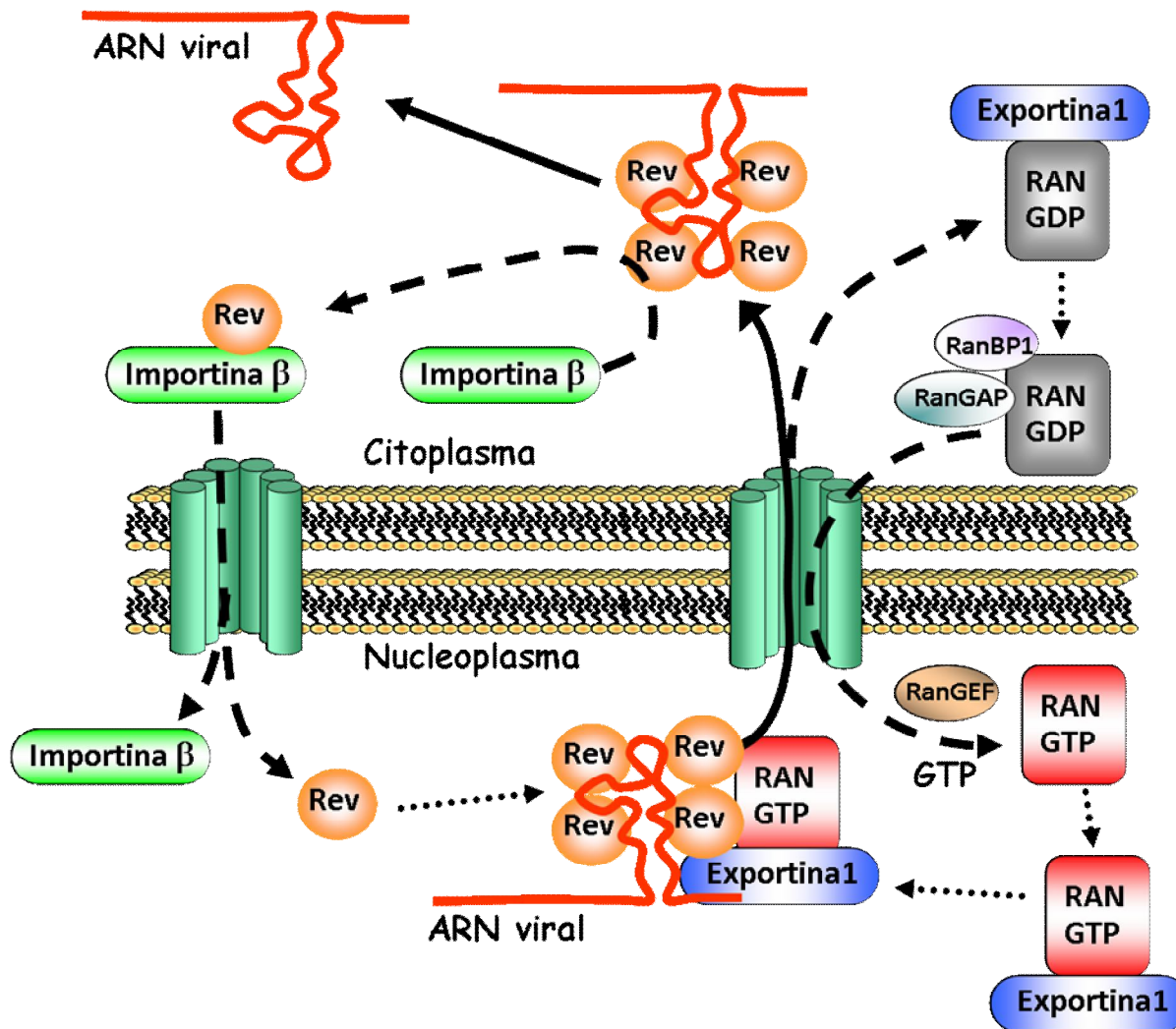


Figura. 17 **Exportación del núcleo mediada por Rev de los transcritos del genoma viral** En el núcleo, Rev se une a la región RRE de las transcripciones virales. Para su exportación hacia el citoplasma Rev requiere asociarse con la exportina1; para que esta unión suceda la exportina1 requiere estar unido a Ran-GTP. En el citoplasma la GTP de Ran es hidrolizada y la exportina1 se libera de Rev, dejando al retrotranscrito en el citoplasma. Mientras que Rev es desplazado del transcrito (del RRE) cuando se le asocia la importina- $\beta$ . Rev regresa al núcleo asociada a la importina- $\beta$ . La unión de Ran-GTP y la exportina- $\beta$  libera nuevamente a Rev dentro del núcleo. El balance de Ran-GTP contra Ran-GDP es mantenido por RCC1, RanGAP y RanBP1.

#### 5.4.2 ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DEL VIH

El pre-ARNm resultante de transcribir el provirus contiene intrones y exones, al igual que los transcritos del genoma celular, dependiendo de los sitios de corte y empalme alternativo se originan distintos ARNm maduros. Los transcritos virales tienen tres posibilidades para ser procesados: 1) aquellos que han sufrido múltiples cortes y empalmes alternativos, dan lugar a las proteínas Tat, Rev y Nef; 2) aquellos ARNm que solo han sufrido un corte y empalme alternativo, son utilizados para generar la poliproteína Env, Vif, Vpr y Vpu; 3) aquellos ARNm que no han sufrido corte y empalme alternativo, son utilizados para generar las poliproteínas Gag y Gag-Pol y la nueva generación de ARN geonómicos virales.

En un principio la transcripción viral no es eficiente y los transcritos formados sufren múltiples cortes y empalmes alternativos; por lo que a las proteínas resultantes de la traducción de estos ARNm's (Tat, Rev y Nef) se les denomina proteínas tempranas y a sus genes de origen se les llama genes de expresión temprana. Una vez que se sintetizó Tat la transcripción se hace eficiente, por su unión a TAR al inicio de la síntesis de todo ARN naciente y los mecanismos antes señalados (ver factores virales que promueven la replicación viral).

La proteína Rev es la encargada de exportar al ARNm viral fuera del núcleo celular antes de sufrir corte y empalme alternativo o cuando solo se ha dado uno. Las proteínas que se sintetizan a partir de dichos ARNm's se les agrupa con el nombre de proteínas tardías (Gag, Pol, Env, Vif, Vpr y Vpu); por consiguiente a los genes de origen se les llama genes de expresión tardía.

Algunas de las funciones de Nef, Vpr y Vif se han referido antes (ver transito hacia el núcleo y retrotranscripción). Otras de las propiedades de estas y otras proteínas

accesorias (Vpu, Vpx) se describirán a continuación. Si bien se les ha denominada proteínas accesorias su función es indispensable para la replicación del VIH.

#### 5.4.2.1 PROTEÍNAS ACCESORIAS Y ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DEL VIH

**Nef.** Proteína del VIH-1 de alrededor de 27 kDa y 206 aa (en el VIH-2 tiene 256 aa). Existe una alta variabilidad genética entre los distintos aislados virales de Nef, haciendo que sus propiedades funcionales varíen entre una y otra cepa viral<sup>193</sup>. Las siglas con las que se le identifica se derivan del primer efecto que se le identificó: “factor negativo (*negative factor*, en inglés) de la replicación viral”<sup>194, 195</sup>. En un balance de sus interacciones intracelulares, hoy las evidencias muestran que la actividad de Nef crea un ambiente permisivo para la replicación viral<sup>196, 197</sup>. Las interacciones moleculares que causan estos efectos contrapuestos dependen de su localización intracelular<sup>198</sup>, algunas de estas interacciones se discutirán a continuación.

Nef regula negativamente la expresión de CD4 al unirse a la cola citoplásmica de esta molécula<sup>199</sup>; con lo cual sufre endocitosis mediada por **clatrina**, previa interacción con **AP2**<sup>200, 201</sup>. Posteriormente la interacción de Nef con proteínas del sistema **COP** dirige la molécula CD4 a degradación lisosomal<sup>202, 203</sup>. El significado de la disminución de CD4 se describirá más adelante (ver Vpu).

Nef también disminuye la expresión de MHC-I en la membrana celular, se han propuesto dos mecanismos para ello: Se considera que Nef evita la llegada a la superficie celular de MHC-I<sup>204</sup>, redireccionando los endosomas que salen del trans-Golgi con MHC-I hacia degradación lisosomal; para lo cual Nef interacciona con la cola citoplásmica de MHC-I, luego con **AP-1** y finalmente con el sistema COP que lo dirige a degradación<sup>205</sup>.

Otra propuesta es que Nef induce una endocitosis prematura de MHC-I; este efecto se realiza por la interacción de la cola citoplasmática de MHC-I con Nef y **PACS-1**<sup>206</sup>, lo que causa la actividad anormal de su vía de endocitosis. En ambas propuestas se observa una acumulación del MHC-I en endosomas del trans-Golgi.

Inducir una disminución del MHC-I en la membrana es una estrategia común en los virus para evitar que las células infectadas presenten péptidos virales al sistema inmune celular, dificultando así la activación de este sistema y una muerte anticipada de la célula infectada por la citotoxicidad celular adaptativa.

Nef también influye en vías de señalización que favorecen la activación celular. Forma un complejo que activa a la **cinasa celular PAK**<sup>207, 208, 209</sup>, este complejo se forma en las **balsas lipídicas** e incluye a las proteínas **PI3K, Vav, CDC42 y Rac**<sup>210, 211, 212, 213</sup>. Lo cual puede tener un efecto sinérgico de activación de vías dependientes de **calcio**<sup>214</sup>, de las **MAPK** y de **NFAT**<sup>215</sup>.

Nef propicia la replicación viral al incrementar la síntesis y transporte de colesterol a las balsas lipídicas<sup>216, 217</sup>, lo que facilita la producción de partículas virales pues son sitios requeridos para la gemación viral.

En lo que respecta al efecto represor de Nef sobre la replicación viral. En algunos estudios se observó que interfería con la actividad transcripcional del LTR<sup>218, 219</sup>. También se encontró que interfería con la activación de factores celulares que interactúan con este promotor viral (AP-1 y NF-kB)<sup>220, 221</sup>; sin embargo, este efecto no fue encontrado por otros grupos<sup>222</sup>.

**Vpr** Se describieron algunas de las funciones de Vpr al describir la entrada del genoma viral al núcleo, otras funciones son descritas aquí. Esta proteína viral forma parte



tanto del VIH-1 como del VIH-2. Además, el VIH-2 cuenta con la proteína **Vpx**, que tiene homología con la proteína **Vpr**; se cree que posiblemente se origino por la duplicación del gen *vpr*. Al igual que la proteína Vpr, Vpx también es acarreada dentro de la partícula viral, en el VIH-2 <sup>223, 224</sup>. Para ambos virus algunas de las funciones de sus respectivas Vpr son comunes; sin embargo, en el VIH-2 algunas de las funciones que realiza el Vpr del VIH-1 se han segregado hacia la proteína Vpx. Describiremos las características de ambas proteínas.

Vpr manipula el ciclo celular al arrestarla en la etapa **G<sub>2</sub>** <sup>225</sup>, debido a que activa la vía **ATR** de reparación de daño al DNA. El virus aprovecha esta condición para aumentar su replicación, puesto que se puede detectar una óptima actividad transcripcional de la LTR viral y la traducción del ARNm viral en la etapa G<sub>2</sub> del ciclo celular <sup>226, 227</sup>. Sin embargo, una posibilidad de la activación de la vía ATR es que la célula se vaya a apoptosis. Se ha observado que Vpr también ejerce un efecto dual de prevención o inducción de la apoptosis <sup>228</sup>; aunque la idea que prevalece es que *in vivo* Vpr induce la apoptosis.

Como se mencionó Vpr permite la infección de células que no se encuentran en división. En el VIH-2 esta función se ha segregado a su proteína Vpx; al parecer interactúa con la vía de ubiquitinación (Cullen-4, DCAF1, E2) para inactivar un factor de restricción celular <sup>229</sup>.

**Vpu**. Es la proteína codificada en el genoma del VIH-1 que no está en el genoma del VIH-2. Ésta tiene dominios que la unen con la membrana <sup>230</sup>, principalmente del RER y del aparato de Golgi. A su estructura y localización en la membrana se le asocia con dos actividades importantes para la replicación viral, como describiremos.

Promueve la liberación de partículas virales de la membrana celular, se han propuesto diversos mecanismos: interactuando con canales iónicos (**TASK-1**)<sup>231</sup>; contrarrestando el efecto de proteínas celulares que pudieran inhibir la gemación<sup>232</sup>, por ejemplo contrarrestar el efecto de la **tetherina**<sup>233</sup>; otra propuesta es que desestabiliza la membrana, agrupándose para formar un canal iónico<sup>234, 235</sup>. En el VIH-2 el dominio KDA de la cola citoplasmática y parte del ectodominio de gp41 es la encargada de promover la gemación del virus<sup>236</sup>.

Por otra parte, Vpu regula negativamente la expresión de CD4; como se menciono, Nef también tiene este efecto (ver antes); ambas actúan sinérgicamente. Esta regulación negativa evita que CD4 se una con el complejo Env dentro de la misma célula; lo que permite una concentración óptima de Env en la membrana celular, necesaria para la gemación viral<sup>237</sup>. El mecanismo de disminución de CD4 consiste en que el dominio citoplasmática de Vpu se une a la cola citoplasmática de CD4 cuando aún se encuentra dentro del RER, lo que induce su ubiquitinación y posterior degradación proteosomal<sup>238, 239</sup>.

### 5.4.3 LIBERACIÓN DEL VIRUS DE LA CÉLULA, GEMACIÓN

Con adición a lo antes descrito, la afinidad del virus por las balsas lipídicas y del papel de Nef y Vpu para modular las características de la membrana. Se describirán algunas otras interacciones entre el virus y la célula que suceden durante la gemación viral.

El ensamblado cimentado en la asociación de precursores virales es la forma en la que el VIH asegura la composición y proporción de sus elementos en la partícula viral<sup>6</sup>. Gag es uno elemento clave para el ensamble<sup>240</sup>, esta poliproteína es cortada por la proteasa viral (PR) después de la gemación para generar a las proteínas MA, CA, NC y otros péptidos menos mencionados, SP1, SP2 y p6. La zona donde se encuentra la NC en Gag se

une y acarrear al ARN genómico viral (antes mencionado). La otra poliproteína precursora Pol también es acarreada por Gag, ya que durante su síntesis Pol se encuentra unido con Gag, formando el gran precursor Gag-Pol. Posterior a la gemación, Pol es autoescindida por su dominio PR para liberar a las proteínas RT, IN y a la misma PR. Otros elementos virales se incorporan al virión por su afinidad con alguna de las proteínas antes mencionadas.

El dominio MA de Gag le permite unirse a las balsas lipídicas de la membrana. La asociación MA a la membrana se debe a su dominio  $\alpha$ -hélice con aminoácidos básicos que se unen a fosfolípidos ácidos [como el IP (4, 5) P<sub>2</sub>], lo que favorece interacciones electrostáticas<sup>241, 242</sup>, además cuenta con un grupo miristilo (en su extremo amino) que se inserta en la membrana<sup>243</sup>. A su vez, las proteínas MA interactúa con gp41 lo que le permite incorporar al complejo Env en la envoltura viral; se ha visto que esta interacción también requiere de la proteína celular **TIP47**, que actúa como conector entre ambas<sup>244</sup>.

La proporción de Gag en su ensamble en la membrana también es favorecido por las proteínas celulares **ABCE1/HP68**, **STAUFEN** y, posiblemente, la proteína **nucleolina**<sup>245, 246, 247</sup>. Estas proteínas interactúan con el dominio NC de Gag y el ARNg viral asociado<sup>248</sup>.

La gemación viral también es asistida por proteínas celulares pertenecientes al transporte vesicular: la proteína adaptadora de clatrina **AP-3**<sup>249</sup>, proteínas del complejo de los cuerpos multivesiculares [tales como **TSG101**, **Tal**, proteínas del complejo **ESCRT (VPS-CHMP)** y **ALIX/AIP1**]<sup>250, 251, 252, 253, 254</sup>. También miembros de la familia **tetraspanina** están involucrados<sup>255</sup>; las tetraspaninas, en la célula, cooperan en la organización de proteínas que se unen a la cola citoplasmáticas de diferentes receptores de membrana. Se ha encontrado que el péptido p6 de Gag esta involucrado en las interacciones con estas proteínas celulares. Figura 18.

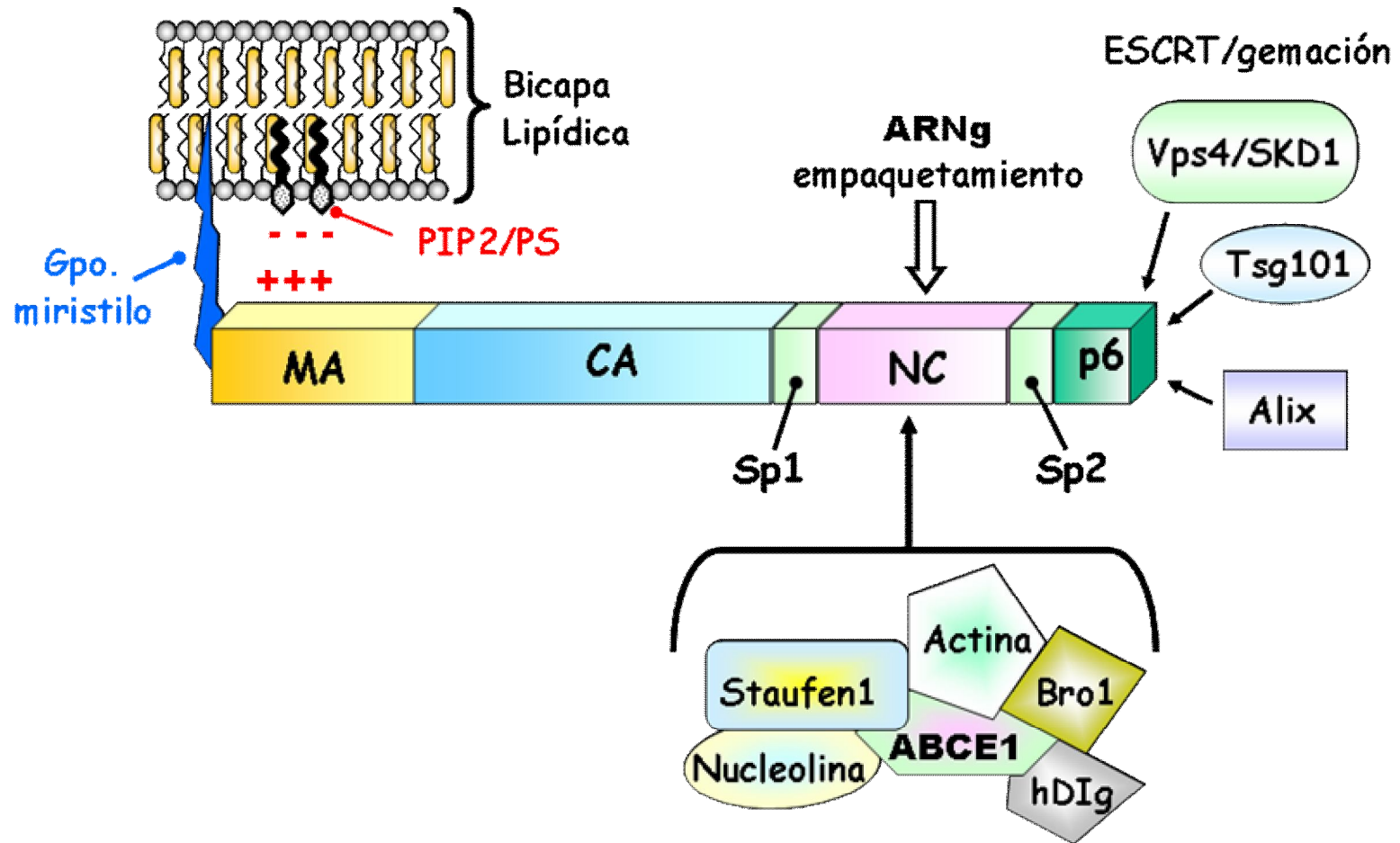


Figura. 18 **Proteínas celulares involucradas en el ensamble y gemación del VIH.** La poliproteína viral Gag es un elemento clave en la reunión de los componentes virales; por un lado su dominio MA se asocia con la membrana celular y por otro, su dominio NC, se asocia al genoma viral y a factores celular que colaboran con el ensamble viral. Al dominio p6 de Gag se le unen factores necesarios para la gemación viral.

## VI DISCUSIÓN

Las complejas interacciones del VIH con la célula hospedadora se manifiestan a distintos niveles: celular, orgánico, sistémico (el más evidente es el colapso del sistema inmune), variaciones en el curso clínico de la enfermedad y en el comportamiento epidemiológico (un contexto poblacional). Dichas interacciones influyen en la capacidad infectiva del virus y grado de replicación. Cuando se realiza trabajo de investigación es importante tener en cuenta esta complejidad para realizar una interpretación adecuada de los resultados experimentales, como se muestra a continuación.

### 6.1 EXPRESIÓN DE LA COMPLEJIDAD DE LA INTERACCIÓN VIH-CÉLULA

La dependencia del VIH hacia las células humanas se pone de manifiesto en la incapacidad del virus para infectar o mantenerse de forma óptima en células de otras especies animales. Esto llevó a buscar los factores moleculares humanos causales de la especificidad. Así por ejemplo, se mostró que no bastaba el receptor CD4 humano para que el virus pudiera infectar células de roedor transgénicas para CD4<sup>256</sup>, y que se requería de un factor adicional para que el virus pudiera infectar<sup>257</sup>, el cual posteriormente se demostró que consistía de un receptor utilizado por quimiocinas, principalmente CCR5 o CXCR4. Aun después de infectar células animales transgénicas para los genes de estos receptores, la replicación viral continuaba siendo deficiente; lo que condujo a descubrir la existencia del factor de restricción TRIM- $\alpha$ , que es especie específico y protege contra determinados retrovirus<sup>258, 259</sup>.

Por otra parte, es muy común que en los artículos científicos se reporten resultados muy contrastantes entre un investigador y otro. Algunas de dichas divergencias se deben a las diferencias entre la gran variedad de líneas celulares (de origen humano) utilizadas para

la investigación. Por ejemplo, en la línea celular CEM-SS los virus con defectos en Vif pueden replicarse sin problema, lo que no sucede en otras líneas celulares. Esto se debe a que las células CEM-SS carecen de APOBEC3<sup>260</sup>, el factor de restricción celular antes mencionado. Lo cual, también sirve para ilustra la existencia de fuentes de variabilidad experimental que afectan los resultados y las interpretaciones derivadas de los mismos, por lo que es primordial para un investigador mantener sus conocimientos actualizados. También se deduce que es justificable usar nuevas técnicas experimentales para corroborar investigaciones previas. En caso de usar líneas celulares como modelo de experimentación, se debe tener en cuenta que la línea celular usada puede influir sobre el resultado. Si existieran divergencias entre los resultados obtenidos con modelos celulares *in vitro* respecto a lo que sucede en el organismo vivo, el encontrar la razón de estas diferencias puede generar nueva información.

## **6.2 EXPRESIÓN DE LA INTERACCIÓN VIH-CÉLULA A NIVEL INDIVIDUO**

La expresión epidemiológica y clínica de la enfermedad también nos remite a las complejas interacciones entre el VIH y la célula, por ejemplo: El VIH-1 es más patógeno que el VIH-2; dentro de los grupos del VIH-1 hay diferencias en la velocidad de la progresión a SIDA; el grupo M es el causante de la pandemia. A lo anterior se han propuesto diversas explicaciones, una de ellas se basa en las diferencias en la cantidad de sitios de unión de NF-kB en el promotor transcripcional (LTR), los virus con más de un sitios de unión para este factor nuclear son más activos para replicarse.

La susceptibilidad a la infección también se relaciona con la variabilidad entre las distintas proteínas celulares. Dentro de las personas expuestas al VIH hay quienes son poco susceptibles a ser infectados, denominados seronegativos de alto riesgo. En este grupo se

encuentran los individuos que portan una mutación homocigótica llamada  $\Delta 32$ -CCR5 (mencionados en la sección glicoproteína gp120), los que sobreexpresan  $\beta$ -quimiocinas (competidor natural por el correceptor del VIH) y los que tienen una tendencia a desarrollar una baja activación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> <sup>261, 262, 263, 264</sup>. Lo anterior habla de la gran dependencia del VIH hacia un correceptor determinado y de un ambiente celular que propicie la expresión de las proteínas virales (ver adelante).

Otro caso raro son las personas infectadas que permanecen estables sin progresar a SIDA aun cuando no reciben tratamiento, estos son los llamados controladores élite o no progresores a largo plazo. La falta de progresión de estos pacientes se ha relacionado a varios factores, por ejemplo: han sido infectados con mutantes virales en algunas de las proteínas Nef, Rev o en Vif <sup>265, 266, 267</sup>, poseen alelos del complejo principal de histocompatibilidad considerados protectores (como HLA-B\*27 y HLA-B\*57) <sup>268</sup> o bien tienen una eficiente respuesta inmune citotóxica (últimos dos temas no tratados en esta tesis).

Con el uso de la terapia combinada de medicamentos contra diferentes procesos virales, llamada terapia antirretroviral altamente activa (HAART, siglas en inglés de *highly active antiretroviral therapy*), se observó una disminución de la carga viral en la sangre a niveles imperceptibles. Sin embargo, una vez que se quita el tratamiento la viremia reemerge e incluso surgen cepas resistentes a los fármacos empleados <sup>269</sup>. Esto llevó a comprobar que una parte de las células infectadas con el VIH genera provirus silentes (latentes), que no se replican hasta en tanto la célula no pase a un estado activado (latencia replicativa) <sup>270</sup>; se retomará el tema en siguiente apartado, donde se analiza el efecto del estado fisiológico celular sobre el curso de la enfermedad.

### **6.3 INFLUENCIA DEL ESTADO FISIOLÓGICO DE LA CÉLULA EN LA REPLICACIÓN VIRAL**

Para entender la concordancia entre el estado fisiológico de las células (activación, reposo, diferenciación, etc.) y el destino del virus, se requiere describir algunas de las características de los linfocitos T. Los linfocitos T pueden transitar hacia un estado activo por diferentes señales estimulantes que llegan a sus receptores. Estas señales incluyen el reconocimiento de un antígeno (epitopo) por medio del receptor de células T (TCR), la unión de interleucinas (por ejemplo IL-1, IL-7, TNF- $\alpha$ ) a receptores específicos y estímulos experimentales, como el mediado por el anticuerpos anti-CD3 y otros mitógenos artificiales (PMA, prostatin, etc.).

Cuando los linfocitos T son activados por un antígeno estos dejan de ser T vírgenes (también llamados *naive*), sufren una expansión clonal y se diferencian en linfocitos de memoria efectores o de memoria central; los linfocitos efectores se quedan activos combatiendo la fuente de estimulación antigénica, después de la cual se mueren; los de memoria central son parte de la clona que quedan almacenadas, en un estado de reposo de baja división celular, listas para activarse cuando se presenta el mismo estímulo inmunológico que las origino. Las células T vírgenes (*naive*) expresan los receptores CD45RA, CD62L y CXCR4. Los de memoria expresan a CD45RO y a CCR5; sin embargo, estos receptores se expresa en bajas cantidades si es una célula T en reposo (memoria central).

Se ha hecho las siguientes observaciones: El VIH se replica eficientemente células que se encuentran activas; la cepa viral R5 (se une al recetor CCR5) es la que se presenta preferentemente al principio de la infección y hacia el final de la infección se aislante cepas X4 (se une a CXCR4), que es un marcador de cercanía a la etapa de SIDA.



Posiblemente haya una correlación entre estas observaciones; la explicación sería la siguiente:

Dado que el VIH se replica eficientemente en células activadas, es lógico que el fenotipo viral que se favorezca sea el R5; pues esto asegura una preferencia por los linfocitos T activos o que están listos para entrar en activación; es decir, hay preferencia del virus por linfocitos T CD4<sup>+</sup> efectores y de memoria central <sup>271</sup>, tienen al receptor CCR5. El fenotipo R5 se mantendría mientras se disponga de estas poblaciones celulares. Conforme avanza la enfermedad la población de células T de memoria se agotan y la respuesta inmune (celular y humoral) decae; en respuesta, los mecanismos de homeostasis aumentan la concentración de IL-7 para inducir la proliferación de las células T vírgenes (*naive*) <sup>272</sup>, entran en un estado de activación sin estímulo antigénico; así, este aumento de la señal mitogénica permite que hacia el final de la enfermedad el VIH disponga de una población suficiente de células T vírgenes (*naive*) activadas, en número suficiente como para sostener el cambio hacia el fenotipo X4 del virus. Cabe aclarar que el cambio de fenotipo viral R5 a X4 no se observa en el 50% de los casos de individuos infectados.

Es desfavorable para el VIH infectar células que se encuentran en reposo (tanto linfocitos T vírgenes como de memoria en reposo), esto se debe principalmente a cuatro motivos:

- 1) Pueden generarse provirus defectuosos (defectivos) por hipermutación, pues la APOBEC3G se encuentra activa en los linfocitos T en reposo <sup>273</sup>.
- 2) La retrotranscripción es ineficiente por la existencia de niveles bajos de nucleótidos.
- 3) Los bajos niveles de ATP restringe los mecanismos de importación del ADN proviral al núcleo <sup>274</sup>.

4) El ambiente restrictivo de las células en reposo también hace que el genoma viral no se integre al genoma celular; con lo que el genoma viral queda episomal en forma lineal o circular. El tiempo de vida media del genoma viral no integrado va de 24 h a unos cuantos días<sup>275, 276</sup>.

Lo anterior ocasiona que la infección del VIH de células en reposo pudiera ser abortada (no productiva). Sin embargo, en el caso del genoma viral que se quedó episomal, cuando la célula en reposo es activada el genoma viral no integrado puede incorporarse al genoma celular; éste “rescate” se da solo si el episoma permaneció lineal, si no fue circularizado<sup>277</sup>.

Respecto a la integración, como se esperaría, variaciones en los sitios de integración también afectan el ambiente próximo al promotor genético del virus (LTR), haciendo que el nivel de replicación varíe hasta en 100 veces<sup>278</sup>.

Cuando el VIH integra su genoma en células que van a salir del estado de activación, también sucede que, si las células infectadas logran regresar al estado de reposo (si no mueren antes) la expresión del genoma viral es silenciada, dicho fenómeno es conocido como latencia viral de postintegración. Este tipo de latencia es un reservorio viral difícil de combatir, tanto inmunológica como farmacológicamente. Se ha calculado que su tiempo de vida media aproximado son 3.7 años<sup>279, 280</sup>. La activación de estas células permite que se reinicie el ciclo de replicación viral.

Las vías de señalización que favorecen la replicación viral se pueden resumir como sigue: Con las señales de estimulación celular los factores de transcripción celulares transitan a un estado activo, por ejemplo, el heterodímero RelA-p50 de NF-κB, NFAT y SP1 son tres factores nucleares con un claro efecto estimulador de la actividad transcripcional del promotor genético del VIH (LTR). Estos factores celulares junto con la

proteína viral Tat estimulan la transcripción del genoma viral, de varias maneras: favorecen la remodelación de la cromatina hacia un estado abierto (eucromatina) (proceso realizado por HATs y el complejo SWI/SNF) y cooperan con el reclutamiento, ensamble o actividad del complejo de la ARNpol-II y de la maquinaria de procesamiento del ARNm

Diversos grupos de investigación consideran que la activación celular es el motor de la enfermedad, ya que se establece un círculo vicioso de activación, infección, diseminación, muerte celular y más activación<sup>281, 282</sup>. Observaciones que están en este contexto son:

- 1) Los procesos inflamatorios favorecidos por infecciones subyacentes aumentan la predisposición al contagio del virus<sup>283</sup>.
- 2) Los linfocitos que reconocen los antígenos de este virus están predispuestos a la infección y a la depleción, pues se activan al reconocer el antígeno<sup>284</sup>.
- 3) El virus cuenta con proteínas que favorecen un estado de sobrestimulación celular (en esta actividad destaca Nef, ya que personas que han sido infectadas con ciertos virus defectuosos en Nef progresan lentamente a la enfermedad<sup>285</sup>).
- 4) Los órganos linfoides altamente activados se vuelven sitios de replicación eficiente del VIH y de pérdida masiva de linfocitos T CD4<sup>+</sup>; destaca el efecto sobre el tejido linfoide asociado al intestino, sitio de una alta activación por traslocación antigénica, que resulta especialmente dañado durante el curso de la enfermedad<sup>286</sup>.

Se considera que la sobre-activación inmune en contra del VIH evita que se establezca como una infección crónica, tal y como sucede con algunas infecciones virales humanas: herpes simple, la hepatitis B o C, citomegalovirus (CMV) y virus de Eipsten-Bar (EBV).

La estrecha interacción entre el virus y la célula produce la paradoja de que la respuesta inmune que podría contener la replicación viral, conlleva la activación de la replicación viral y daño al sistema inmune. Esto complica considerablemente el desarrollo de vacunas que tengan como consecuencia la activación de células T CD4<sup>+</sup>. También es un reto el diseñar fármacos que puedan modular la respuesta inmune en beneficio del paciente.

## VII CONCLUSIÓN

- El VIH es uno de los patógenos más estudiados, la hemerografía disponible es muy vasta, por lo que el trabajo de integrar esta información es compleja. La gran cantidad de investigaciones realizadas en relación al VIH hace necesaria la elaboración de revisiones que agrupen los conocimientos más destacados sobre la biología del virus; se ha hecho un esfuerzo por elegir los artículos más relevantes y presentarlos de una manera accesible.
- A la par de la acumulación del conocimiento en relación al VIH; que en su gran mayoría solo accesible en el lenguaje inglés, el lenguaje de divulgación científica más común hoy en día; se requieren hacer ejercicios de compendio, revisión y análisis de los mismos. El plasmar esta información en nuestro idioma natal genera una base de conocimientos teóricos para profesores y estudiantes del área de las ciencias biológicas y de la salud; dando una visión global del tema, en forma accesible y rápida.
- Cuando se trata de diseñar estrategias terapéuticas, el conocimiento de todos los factores participantes en la replicación viral abre la ventana para diseñar un conjunto de fármacos que complementen, suplan o refuercen la terapia farmacológica actual. Por lo pronto, aunque se conocen múltiples compuestos capaces de interferir *in vitro* con los procesos del virus, aún es muy limitado el número de tales compuestos que tienen un potencial real de aplicación en el control de la infección. Esto es debido precisamente a que la relación estrecha del virus con las células, hacen difícil la obtención de compuestos anti-virales específicos, que tengan poco o nulo efecto sobre el metabolismo celular normal.

## VIII PERSPECTIVAS

En esta revisión se han esbozado las interacciones virus-célula más referidas en los artículos científicos; seguramente faltará por descubrir la existencia o la importancia de algunas otras interacciones. Esta noción se hace más evidente por la investigación de Brass et. al., quienes encontraron que alrededor de 273 factores celulares participan en la replicación viral; de dichos factores, ya se conocía la participación de alrededor de treinta de ellos <sup>287</sup>. Los investigadores descubrieron el efecto de estos factores observando el efecto del silenciamiento de cada uno de ellos sobre la replicación viral; previamente se vigilo que el silenciamiento de estos genes no alterara en forma drástica la viabilidad de la célula.

Gracias a nuevas técnicas de investigación y al proceso de contrastar lo que sucede *in vitro* con respecto a lo que sucede *in vivo* será posible que se reevalúe la importancia de algunos factores celulares para la replicación viral. El estudio de la interacción de los factores virales con los celulares abre la posibilidad de diseñar fármacos novedosos (profilácticos y terapéuticos) que interfieran con la replicación viral. De manera que se espera que el empleo de una amplia batería de fármacos erradique los reservorios virales (de sitios inmunoprivilegiados y de latencia transcripcional), combata los síntomas de la enfermedad y disminuya la infectividad de los portadores. Es decir, se espera que la interferencia simultánea con múltiples sitios claves en la replicación viral pueda dificultar la generación de resistencia farmacológica.

El presente trabajo integra la información de distintas áreas del conocimiento sobre el ciclo de replicación del VIH, con énfasis en la descripción de los factores celulares que la propician. Sin embargo, falta por generarse mucha literatura de revisión y análisis en español sobre temas importantes como: vías de muerte celular inducidas por el VIH (incluido el efecto que tiene sobre la replicación viral), efecto citopático de las proteínas

virales, red de interacciones inmunes establecidas durante en el curso de la enfermedad (citocinas, inmunidad innata y adaptativa), efecto de la variabilidad genética del hospedador y de la variabilidad genética del virus sobre el curso de la enfermedad.

## IX ABREVIATURAS

aa	aminoácidos
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ADNc	ADN complementario
A3G	APOBC3G
APOBC3G	Apolipoprotein B ARNm-editora, encima catalítica, polipéptido semejante a 3G
ARN	Ácido ribonucleico
ARNg	ARN genómico viral
ARNm	ARN mensajero
ARNpol-II	ARN polimerasa II
ARNt-Lys	ARN de transferencia de la lisina
BAF	Factor barrera para la autointegración
CA	Cápside
CBP	roteína de unión a CREB
	Centros para el control y la prevención de enfermedades de los Estados Unidos
CDC	Unidos
CFR	Forma recombinante circulante
Ct	Carboxilo terminar
CTD	Dominio terminal carboxilo de la ARN pol II
CypA	Ciclofilina A
env	Envoltura
EuroHIV	Centro europeo para la vigilancia epidemiológica del SIDA
gag	Antígeno de grupo
gp	Glicoproteína
HAART	Terapia antirretroviral altamente activa
HAT	histonas acetil transferasas
6HB	Ovillo de 6 hélices
HDAC	histonas deacetilasas
HR	Hepta repetidas
IN	Integrasa
kDa	Kilo daltons
LFA	Antígeno asociado a la función linfocitaria
LLP	Péptidos líticos de lentivirus
LTR	Repetida larga terminal
MA	Matriz
MAPK	MAP cinasa
MAR	Region de unión a la matriz
MBD2	proteínas de unión a dominios CpG metilados
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
NC	Nucleocápside
NCBI	Centro Nacional Para La Información Biotecnológica
nef	Factor negativo regulatorio



NLM	Biblioteca Nacional De Medicina
NLS	Señales de localización nuclear
Nt	Amino terminal
nuc	nucleosoma
Nup	Nucleoporina
OMS	Organización mundial de la salud
ONUSIDA	Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA
PBS	Sitio de unión del sebador
PIC	Complejo de preintegración
pol	Polimerasa
PPT	tractos de polipurinas
PR	Proteasa
REr	retículo endoplásmico rugoso
rev	Regulador de la expresión de las proteínas del virión
RRE	Elemento de respuesta a Rev
RT	Retrotranscriptasa
RTC	Complejo de la retrotranscripción
SAR	Region de unión al andamiaje
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SRA	Síndrome retroviral agudo
SU	Superficial
TAF	Factores asociados a TBP
TAR	Transactivator Active Region
tat	Transactivador de la transcripción
TBP	Proteína de unión a TATA
TM	Trasmembranal
TRIM5-alfa	Proteína 5 que contiene el motivo tripartita
UFR	Forma recombinante única
vif	Factor de infectividad del virión
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
VIS	Virus de la inmunodeficiencia de simios
vpr	Proteína viral R
vpu	Proteína viral U
vpx	Proteína viral X

## X REFERENCIAS

---

- 1 Gottlieb MD, Schroff R, Schanker HM, Weisman JD, Fan PT, Wolf RA, Saxon A. (1981) Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. N Engl J Med; 305(24):1425-31
- 2 Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Daugey C, Axler-Blin C, Vézinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science; 220:868-71.
- 3 Clavel F, Guetard D, Brun-Vezinet F, Chamaret S, Rey MA, Santos-Ferreira MO, Laurent AG, Daugey C, Katlama C, Rouzioux C, Klatzmann DK, Champalimaud JL, Montagnier L. (1986) Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. Science; 233:343-6.
- 4 Coffin J., Hasse,A., Levy,J.A., Montagnier,L., Oroszlan,S., Teich,N., Temin,H., Toyoshima,K., Varmus,H., Vogt,P. Weiss,R. (1986) Human immunodeficiency viruses. Science; 232:697.
- 5 Gelderblom H. (1997) Fine structure of HIV and SIV. Los Alamos, N.Mex: Los Alamos National Laboratory; pp. IV-37-50
- 6 Ganser-Pornillos BK, Yeager M, Sundquist WI. (2008) The structural biology of HIV assembly. Curr Opin Struct Biol.;18:203–17.
- 7 <http://www.who.int/hiv/pub/guidelines/clinicalstaging.pdf>:
- 8 Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA. Enfermedades oportunistas relacionadas con el VIH: actualización técnica del ONU-SIDA. Ginebra: ONUSIDA; 1999.
- 9 Informe sobre la epidemia mundial de sida 2008. (Original en inglés, agosto de 2008) «ONUSIDA/08.25S».
- 10 Gonda M., Wong-Staal F., Gallo RC., Clements JE., Narayan O., Gilden RV. (1985) Sequence homology and morphologic similarity of HTLV-III and visna virus, a pathogenic lentivirus. Science 227:173-7.
- 11 De acuerdo al National Center for Biotechnology Information (NCBI), GenBank: NC\_001802.1 y NC\_001722.1, respectivamente para el VIH-1 y VIH-2.
- 12 Nota: El significado de estas abreviaciones clásicas son: **gag**: antígeno específico de grupo; **pol**: polimerasa; **env**: envoltura; **tat**: transactivador de la transcripción; **rev**: regulador de la expresión de las proteínas del virión; **nef**: factor negativo regulatorio; **vif**:

---

factor de infectividad del virion; *vpr*: proteína viral R; *vpu*: proteína viral U; *vpx*: proteína viral X.

- 13 Imagen de Internet, con modificaciones:  
[http://expasy.org/viralzone/all\\_by\\_species/64.html](http://expasy.org/viralzone/all_by_species/64.html);  
[http://expasy.org/viralzone/all\\_by\\_species/7.html](http://expasy.org/viralzone/all_by_species/7.html)
- 14 Tripathi P, Agrawal S. (2007) Immunobiology of human immunodeficiency virus infection. *Indian J Med Microbiol.* Oct; 25:311-22.
- 15 Alcamí J. (2008) The HIV replication cycle. Established therapeutic targets and potential targets. *Enferm Infecc Microbiol Clin.*; 26 Suppl 12:3-10.
- 16 Abecasis, A. B., P. Lemey, N. Vidal, T. de Oliveira, M. Peeters, R. Camacho, B. Shapiro, A. Rambaut, A. M. Vandamme. (2007) Recombination confounds the early evolutionary history of human immunodeficiency virus type 1: subtype G is a circulating recombinant form. *J. Virol.* 81:8543-51.
- 17 Ji, J., Hoffmann, J.-S. & Loeb, L. (1994) Mutagenicity and pausing of HIV reverse transcriptase during HIV plus-strand DNA synthesis. *Nucleic Acids Res.*; 22:47–52.
- 18 Roberts JD, Bebenek K, Kunkel TA. (1988) The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science*; 242:1171–3.
- 19 Mansky LM, Temin HM. (1995) Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase. *J Virol.*; 69:5087–94.
- 20 Hahn, B. H., Shaw, G. M., De Cock, K. M. & Sharp, P. M. (2000) AIDS as a Zoonosis: Scientific and Public Health Implications. *Science*; 287, 607–14.
- 21 Kuznetsov, Y. G., J. G. Victoria, W. E. J. Robinson, A. McPherson. (2003) Atomic force microscopy investigation of HIV and HIV-infected lymphocytes. *J. Virol.*; 77:11896-11909.
- 22 Briggs, J. A. G., T. Wilk, R. Welker, H.-G. Krausslich, S. D. Fuller. (2003) Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores. *EMBO J.*; 22:1707-15.
- 23 Kotov A, Zhou J, Flicker P, Aiken C. (1999) Association of Nef with the human immunodeficiency virus type 1 core. *J Virol.*; 73:8824-30.
- 24 Khan MA, Aberham C, Kao S, Akari H, Gorelick R, Bour S, Strebel K. (2001) Human immunodeficiency virus type 1 Vif protein is packaged into the nucleoprotein complex through an interaction with viral genomic RNA. *J Virol.*; 75:7252–65.

- 
- 25 Lu YL, Spearman P, Ratner L. (1993) Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R localization in infected cells and virions. *J Virol.*;67:6542–50.
- 26 Yu X F, Ito S, Essex M, Lee T H. (1988) A naturally immunogenic virion-associated protein specific for HIV-2 and SIV. *Nature.*; 335:262–5.
- 27 Franke EK, Yuan HE, Luban J. (1994) Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions. *Nature*; 372:359-62.
- 28 Strebel K, Luban J, Jeang KT. (2009) Human cellular restriction factors that target HIV-1 replication. *BMC Med.*; 7:48.
- 29 Arthur LO, Bess JW, Jr, Sowder RC, 2nd, Benveniste RE, Mann DL, Chermann JC, Henderson LE. (1992) Cellular proteins bound to immunodeficiency viruses: implications for pathogenesis and vaccines. *Science*; 258:1935–8.
- 30 Cantin R, Fortin J-F, Lamontagne G, Tremblay M. (1997) The Acquisition of Host-Derived Major Histocompatibility Complex Class II Glycoproteins by Human Immunodeficiency Virus Type 1 Accelerates the Process of Virus Entry and Infection in Human T-Lymphoid Cells. *Blood* 90:1091–1100.
- 31 Hildreth J E, Orentas R J. (1989) Involvement of a leukocyte adhesion receptor (LFA-1) in HIV-induced syncytium formation. *Science* 244:1075–8.
- 32 Hioe CE, Chien PC, Jr, Lu C, Springer TA, Wang XH, Bandres J, Tuen M. (2001) LFA-1 expression on target cells promotes human immunodeficiency virus type 1 infection and transmission. *J. Virol.*; 75:1077–82.
- 33 Berger EA, Murphy PM, Farber JM. (1999) Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol* 17:657-700.
- 34 Klatzmann D, Barré-Sinoussi F, Nugeyre MT, Danquet C, Vilmer E, Griscelli C, Brun-Veziret F, Rouzioux C, Gluckman JC, Chermann JC. (1984) Selective tropism of lymphadenopathy associated virus (LAV) for helper-inducer T lymphocytes. *Science*; 225:59-63.
- 35 Gartner S, Markovits P, Markovitz DM, Kaplan MH, Gallo RC, Popovic M. (1986) The role of mononuclear phagocytes in HTLV-III/LAV infection. *Science*; 233:215-9
- 36 Ayehunie S, Garcia-Zepeda EA, Hoxie JA, Horuk R, Kupper TS, Luster AD, Ruprecht RM. (1997) Human immunodeficiency virus-1 entry into purified blood dendritic cells through CC and CXC chemokine coreceptors. *Blood*; 90:1379-86.
- 37 Blauvelt A, Asada H, Saville MW, Klaus-Kovtun V, Altman DJ, Yarchoan R, Katz SI. (1997) Productive infection of dendritic cells by HIV-1 and their ability to capture virus are mediated through separate pathways. *J Clin Invest*; 100:2043-53

- 
- 38 Melikyan GB. (2008) Common principles and intermediates of viral protein-mediated fusion: the HIV-1 paradigm. *Retrovirology*; 5:111.
- 39 Yang, X., S. Kurteva, S. Lee, J. Sodroski. (2005) Stoichiometry of antibody neutralization of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 79:3500-8.
- 40 Nguyen DH, Hildreth JE. (2000) Evidence for budding of human immunodeficiency virus type 1 selectively from glycolipid-enriched membrane lipid rafts. *J Virol.*; 74:3264-72.
- 41 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>
- 42 Klatzmann D, Champagne E, Chamaret S, Gruest J, Guetard D, Hercend T, Gluckman JC, Montagnier L. (1984) T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature*; 312:767-8.
- 43 Dalgleish AG, Beverley PC, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA. (1984) The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature*; 312:763-7.
- 44 Alkhatib, G., Combadiere, C., Broder, C. C., Feng, Y., Kennedy, P. E., Murphy, P. M., Berger, E. A. (1996) CC CKR5: a RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science*; 272:1955-8.
- 45 Feng, Y., Broder, C. C., Kennedy, P. E., Berger, E. A. (1996) HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science*; 272: 872-77.
- 46 Berger EA, Doms RW, Fenyö EM, Korber BT, Littman DR, Moore JP, Sattentau QJ, Schuitemaker H, Sodroski J, Weiss RA. (1998) A new classification for HIV-1. *Nature*; 391:240
- 47 Lee W R, Yu X F, Syu W J, Essex M, Lee T H. (1992) Mutational analysis of conserved N-linked glycosylation sites of human immunodeficiency virus type 1 gp41. *J Virol.*; 66:1799-1803.
- 48 Fenouillet E, Gluckman J C, Bahaoui E. (1990) Role of N-linked glycans of envelope glycoproteins in infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.*; 64:2841-8.
- 49 McCune, J. M., L. B. Rabin, M. B. Feinberg, M. Lieberman, J. C. Kosek, G. R. Reyes, I. L. Weissman. (1988) Endoproteolytic cleavage of gp160 is required for the activation of human immunodeficiency virus. *Cell*; 53:55-67.

- 
- 50 Morikawa, Y., E. Barsov, I. Jones. (1993) Legitimate and illegitimate cleavage of human immunodeficiency virus glycoproteins by furin. *J. Virol.*; 67:3601-4.
- 51 Gelderblom HR, Reupke H, Pauli G. (1985) Loss of envelope antigens of HTLV-III/LAV, a factor in AIDS pathogenesis? *Lancet.*; 2:1016-7.
- 52 McKeating JA, McKnight A, Moore JP. (1991) Differential loss of envelope glycoprotein gp120 from virions of human immunodeficiency virus type 1 isolates: effects on infectivity and neutralization. *J Virol.* ; 65:852-60.
- 53 Center, R. J., R. D. Leapman, J. Lebowitz, L. O. Arthur, P. L. Earl, B. Moss. (2002) Oligomeric structure of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein on the virion surface. *J. Virol.* 76:7863-7.
- 54 Liu J, Bartesaghi A, Borgnia MJ, Sapiro G, Subramaniam S. (2008) Molecular architecture of native HIV-1 gp120 trimers. *Nature*; 455:109-13.
- 55 Zhu, P., E. Chertova, J. Bess, Jr., J. D. Lifson, L. O. Arthur, J. Liu, K. A. Taylor, K. H. Roux. (2003) Electron tomography analysis of envelope glycoprotein trimers on HIV and simian immunodeficiency virus virions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*; 100:15812-7.
- 56 Stein BS, Gowda SD, Lifson JD, Penhallow RC, Bensch KG, Engleman EG. (1987) pH-independent HIV entry into CD4-positive T cells via virus envelope fusion to the plasma membrane. *Cell.*; 49:659-68.
- 57 Starcich ES, Hahn BH, Shaw GM, McNeely PD, Modrow S, Wolf H, Parks ES, Parks WP, Josephs SF, Gallo RC. (1986) Identification and characterization of conserved and variable regions in the envelope gene of HTLV-III/LAV, the retrovirus of AIDS. *Cell*; 45:637-48.
- 58 Leonard, C. K., M. W. Spellman, L. Riddle, R. J. Harris, J. N. Thomas, T. J. Gregory. (1990) Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 265:10373-82.
- 59 Lasky, L. A., G. Nakamura, D. H. Smith, C. Fennie, C. Shimasaki, E. Patzer, P. Berman, T. Gregory, D. J. Capon. (1987) Delineation of a region of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 glycoprotein critical for interaction with the CD4 receptor. *Cell*; 50:975-85.
- 60 Olshevsky, U., E. Helseth, C. Furman, J. Li, W. Haseltine, J. Sodroski. (1990) Identification of individual human immunodeficiency virus type 1 gp120 amino acids important for CD4 receptor binding. *J. Virol.* 64:5701-7.

- 
- 61 Poulin L, Evans LA, Tang SB, Barboza A, Legg H, Littman DR, Levy JA. (1991) Several CD4 domains can play a role in human immunodeficiency virus infection in cells. *J Virol.*; 65:4893–4901.
- 62 Arthos, J., K. C. Deen, M. A. Chaikin, J. A. Fornwald, G. Sathe, Q. J. Sattentau, P. R. Clapham, R. A. Weiss, J. S. McDougal, C. Pietropaolo, R. Axel, A. Truneh, P. J. Maddon, R. W. Sweet. (1989) Identification of the residues in human CD4 critical for the binding of HIV. *Cell*; 57:469-81.
- 63 Jameson, B. A., P. E. Rao, L. I. Kong, B. H. Hahn, G. M. Shaw, L. E. Hood, S. B. H. Kent. (1988) Location and chemical synthesis of a binding site for HIV-1 on the CD4 protein. *Science*; 240:1335-39.
- 64 Ryu, S. E., P. D. Kwong, A. Truneh, T. G. Porter, J. Arthos, M. Rosenberg, X. Dai, N. Xuong, R. Axel, R. W. Sweet, W. A. Hendrickson. (1990) Crystal structure of an HIV-binding recombinant fragment of human CD4. *Nature*; 348: 419-26.
- 65 Cormier, E. G., T. Dragic. (2002) The crown and stem of the V3 loop play distinct roles in human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein interactions with the CCR5 coreceptor. *J. Virol.*; 76:8953-7.
- 66 Sakaida H, Hori T, Yonezawa A, Sato A, Isaka Y, Yoshie O, Hattori T, Uchiyama T. (1998) T-tropic human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-derived V3 loop peptides directly bind to CXCR-4 and inhibit T-tropic HIV-1 infection. *J Virol.*; 72:9763–70.
- 67 Koito, A., G. Harrowe, J. A. Levy, C. Cheng-Mayer. (1994) Functional role of the V1/V2 region of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp120 in infection of primary macrophages and soluble CD4 neutralization. *J. Virol.*; 68:2253-9.
- 68 Shioda, T., J. A. Levy, C. Cheng-Mayer. (1992) Small amino acid changes in the V3 hypervariable region of gp120 can affect the T cell line and macrophage tropisms of human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 89:9434-8.
- 69 Koito, A., L. Stamatatos, C. Cheng-Mayer. (1995) Small amino acid sequence changes within the V2 domain can affect the function of a T-cell line-tropic human immunodeficiency virus type 1 envelope gp120. *Virology*; 206:878-84.
- 70 Lu, Z., J. F. Berson, Y. Chen, J. D. Turner, T. Zhang, M. Sharron, M. H. Jenks, Z. Wang, J. Kim, J. Rucker, J. A. Hoxie, S. C. Peiper, R. W. Doms. (1997) Evolution of HIV-1 coreceptor usage through interactions with distinct CCR5 and CXCR4 domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 94:6426-31.
- 71 Dragic, T., A. Trkola, S. W. Lin, K. A. Nagashima, F. Kajumo, L. Zhao, W. C. Olson, L. Wu, C. R. Mackay, G. P. Allaway, T. P. Sakmar, J. P. Moore, P. J. Maddon. (1998) Amino-terminal substitutions in the CCR5 coreceptor impair gp120 binding and human immunodeficiency virus type 1 entry. *J. Virol.*; 72:279-85

- 
- 72 Wu, L., G. LaRosa, N. Kassam, C. J. Gordon, H. Heath, N. Ruffing, H. Chen, J. Humblias, M. Samson, M. Parmentier, J. P. Moore, C. R. Mackay. (1997) Interaction of chemokine receptor CCR5 with its ligands: multiple domains for HIV-1 gp120 binding and a single domain for chemokine binding. *J. Exp. Med.*; 186:1373-81.
- 73 Samson M., Libert F., Doranz B.J., Rucker J., Liesnard C., Farber C.M., Saragosti S., Lapoumeroulie C., Cognaux J., Forceille C., Muyldermans G., Verhofstede C., Burtonboy G., Georges M., Imai T., Rana S., Yi Y., Smyth R.J., Collman R.G., Doms R.W., Vassart G., Parmentier M. (1996) Resistance to HIV-1 infection in Caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature*; 382:722-5.
- 74 Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk R, MacDonald ME, Stuhlmann H, Koup RA, Landau NR: (1996) Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell*, 86:367-77.
- 75 Murakami, T., E. O. Freed. 2000. The long cytoplasmic tail of gp41 is required in a cell type-dependent manner for HIV-1 envelope glycoprotein incorporation into virions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*; 97:343-8.
- 76 Freed E O, Martin M A. (1996) Domains of the human immunodeficiency virus type 1 matrix and gp41 cytoplasmic tail required for envelope incorporation into virions. *J Virol.*; 70:341-51.
- 77 Chan, D.C., D.Fass, J.M.Berger, P.S.Kim. (1997) Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell*. 89:263-73.
- 78 Jeang KT, Berkhout B, Dropulic B. (1993) Effects of integration and replication on transcription of the HIV-1 long terminal repeat. *J Biol Chem.*; 268:24940-9.
- 79 Karageorgos L, Li P, Burrell C. (1993) Characterization of HIV replication complexes early after cell-to-cell infection. *AIDS Res Hum Retroviruses*; 9:817-23.
- 80 Fassati, A., S. P. Goff. (2001) Characterization of intracellular reverse transcription complexes of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.*; 75:3626-35.
- 81 Bukrinskaya A, Brichacek B, Mann A, Stevenson M. (1998) Establishment of a functional human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcription complex involves the cytoskeleton. *J Exp Med.*; 188: 2113-25.
- 82 McDonald D, Vodicka MA, Lucero G, Svitkina TM, Borisy GG, Emerman M, Hope TJ (2002) Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells. *J Cell Biol.*; 159:441-52.



- 
- 83 Arhel NJ, Genovesio G, Kim KA, Miko S, Perret E, Olivo-Marin JC, Shorte S, Charneau P. (2006) Quantitative 4D tracking of cytoplasmic and nuclear HIV-1 complexes. *Nat Meth* 3: 817–24.
- 84 Petit C, Giron ML, Tobaly-Tapiero J, Bittoun P, Real E, Jacob Y, Tordo N, De The H, Saib A. (2003) Targeting of incoming retroviral Gag to the centrosome involves a direct interaction with the dynein light chain 8. *J Cell Sci.*; 116: 3433-42.
- 85 Campbell EM, Nunez R, Hope TJ (2004) Disruption of the actin cytoskeleton can complement the ability of Nef to enhance HIV-1 infectivity. *J Virol* 78: 5745–55.
- 86 Zhang Y, Qian H, Love Z, Barklis E: (1998) Analysis of the assembly function of the human immunodeficiency virus type 1 Gag protein nucleocapsid domain. *J Virol.*; 72:1782-9.
- 87 Feng YX, Copeland TD, Henderson LE, Gorelick RJ, Bosche WJ, Levin JG, Rein A. (1996) HIV-1 nucleocapsid protein induces "maturation" of dimeric retroviral RNA in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA.*; 93:7577-81.
- 88 Cimarelli A, Sandin S, Höglund S, Luban J. (2000) Basic residues in human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid promote virion assembly via interaction with RNA. *J Virol*, 74:3046-57.
- 89 Amarasinghe GK, De Guzman RN, Turner RB, Chancellor KJ, Wu ZR, Summers MF. (2000) NMR structure of the HIV-1 nucleocapsid protein bound to stem-loop SL2 of the C-RNA packaging signal. Implications for genome recognition. *J Mol Biol*, 301:491-511.
- 90 De Guzman RN, Wu ZR, Stalling CC, Pappalardo L, Borer PN, Summers MF (1998) Structure of the HIV-1 nucleocapsid protein bound to the SL3 C-RNA recognition element. *Science*; 279:384-8.
- 91 D'Souza V, Summers MF. (2005) How retroviruses select their genomes. *Nat Rev Microbiol.*; 3:643-55.
- 92 Bampi C, Jacquenet S, Lener D, Décimo D, Darlix JL. (2004) The chaperoning and assistance roles of the HIV-1 nucleocapsid protein in proviral DNA synthesis and maintenance. *Curr. HIV Res.*; 2:79–92.
- 93 Levin JG, Mitra M, Mascarenhas A, Musier-Forsyth K. (2010) Role of HIV-1 nucleocapsid protein in HIV-1 reverse transcription. *RNA Biol.*; 7:754-74.
- 94 Arhel NJ, Souquere-Besse S, Munier S, Souque P, Guadagnini S, Rutherford S, Prévost MC, Allen TD, Charneau P. (2007) HIV-1 DNA Flap formation promotes uncoating of the pre-integration complex at the nuclear pore. *EMBO J.*; 26:3025-37.

- 
- 95 Cartier C, Sivard P, Tranchat C, Decimo D, Desgranges C, Boyer V. (1999) Identification of three major phosphorylation sites within HIV-1 capsid. Role of phosphorylation during the early steps of infection. *J Biol Chem.*; 274: 19434-40.
- 96 Bosco DA, Eisenmesser EZ, Pochapsky S, Sundquist WI, Kern D. (2002) Catalysis of cis/trans isomerization in native HIV-1 capsid by human cyclophilin A. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 99:5247-52.
- 97 Gamble TR, Vajdos FF, Yoo S, Worthylake DK, Houseweart M, Sundquist WI, Hill CP. (1996) Crystal structure of human cyclophilin A bound to the amino-terminal domain of HIV-1 capsid. *Cell*; 87:1285-94.
- 98 Luban J. (1996) Absconding with the chaperone: essential cyclophilin-Gag interaction in HIV-1 virions. *Cell*; 87:1157-9.
- 99 Towers GJ, Hatzioannou T, Cowan S, Goff SP, Luban J, Bieniasz PD. (2003) Cyclophilin A modulates the sensitivity of HIV-1 to host restriction factors. *Nat Med.*; 9 (9):1138-43.
- 100 Wu X, Anderson JL, Campbell EM, Joseph AM, Hope TJ. (2006) Proteasome inhibitors uncouple rhesus TRIM5a restriction of HIV-1 reverse transcription and infection. *Proc Natl Acad Sci USA*; 103:7465-70.
- 101 Perron MJ, Stremlau M, Lee M, Javanbakht H, Song B, Sodroski J. (2007) The human TRIM5a restriction factor mediates accelerated uncoating of the N-tropic murine leukemia virus capsid. *J Virol.*; 81:2138-48.
- 102 Zhang H, Yang B, Pomerantz RJ, Zhang C, Arunachalam SC, Gao L. (2003) The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA. *Nature*; 424:94-8.
- 103 Khan MA, Kao S, Miyagi E, Takeuchi H, Goila-Gaur R, Opi S, Gipson CL, Parslow TG, Ly H, Strebel K. (2005) Viral RNA is required for the association of APOBEC3G with human immunodeficiency virus type 1 nucleoprotein complexes. *J Virol.*; 79:5870-4.
- 104 Lecossier D, Bouchonnet F, Clavel F, Hance AJ. (2003) Hypermutation of HIV-1 DNA in the absence of the Vif protein. *Science*; 300:1112.
- 105 Mehle A, Strack B, Ancuta P, Zhang C, McPike M, Gabuzda D. (2004) Vif overcomes the innate antiviral activity of APOBEC3G by promoting its degradation in the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem.*; 279:7792-8.
- 106 Yu X, Yu Y, Liu B, Luo K, Kong W, Mao P, Yu XF. (2003) Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex. *Science*; 302:1056-60.

- 
- 107 Dismuke DJ, Aiken C. (2006) Evidence for a functional link between uncoating of the human immunodeficiency virus type 1 core and nuclear import of the viral preintegration complex. *J Virol.*; 80:3712-20.
- 108 Miller MD, Farnet CM, Bushman FD. (1997) Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. *J Virol.*; 71:5382-90.
- 109 Haffar OK, Popov S, Dubrovsky L, Agostini I, Tang H, Pushkarsky T, Nadler SG, Bukrinsky M. (2000) Two nuclear localization signals in the HIV-1 matrix protein regulate nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex. *J Mol Biol.*; 299:359-68.
- 110 Yamashita, M., O. Perez, T. J. Hope, M. Emerman. (2007) Evidence for direct involvement of the capsid protein in HIV infection of nondividing cells. *PLoS Pathog.*; 3:1502-10.
- 111 Bouyac-Bertoia M, Dvorin JD, Fouchier RA, Jenkins Y, Meyer BE, Wu LI, Emerman M, Malim MH. (2001) HIV-1 infection requires a functional integrase NLS. *Mol Cell*; 7:1025-35.
- 112 Haffar, O. K., S. Popov, L. Dubrovsky, I. Agostini, H. Tang, T. Pushkarsky, S. G. Nadler, M. Bukrinsky. (2000) Two nuclear localization signals in the HIV-1 matrix protein regulate nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex. *J. Mol. Biol.*; 299:359-68.
- 113 Kamata, M., Y. Aida. (2000) Two putative alpha-helical domains of human immunodeficiency virus type 1 Vpr mediate nuclear localization by at least two mechanisms. *J. Virol.*; 74:7179-86.
- 114 Sherman, M. P., C. M. de Noronha, M. I. Heusch, S. Greene, W. C. Greene. (2001) Nucleocytoplasmic shuttling by human immunodeficiency virus type 1 Vpr. *J. Virol.*; 75:1522-32.
- 115 Heinzinger, N. K., M. I. Bukinsky, S. A. Haggerty, A. M. Ragland, V. Kewalramani, M. A. Lee, H. E. Gendelman, L. Ratner, M. Stevenson, M. Emerman. (1994) The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*; 91:7311-5.
- 116 Lijima, S., Y. Nitahara-Kasahara, K. Kimata, W. Zhong Zhuang, M. Kamata, M. Isogai, M. Miwa, Y. Tsunetsugu-Yokota, Y. Aida. (2004) Nuclear localization of Vpr is crucial for the efficient replication of HIV-1 in primary CD4+ T cells. *Virology*; 327:249-61.

- 
- 117 Connor, R. I., B. K. Chen, S. Choe, N. R. Landau. (1995) Vpr is required for efficient replication of human immunodeficiency virus type-1 in mononuclear phagocytes. *Virology*; 206:935-44.
- 118 Popov, S., M. Rexach, L. Ratner, G. Blobel, M. Bukrinsky. (1998) Viral protein R regulates docking of the HIV-1 preintegration complex to the nuclear pore complex. *J. Biol. Chem.*; 273:13347-52.
- 119 Popov, S., M. Rexach, G. Zybarth, N. Reiling, M. A. Lee, L. Ratner, C. M. Lane, M. S. Moore, G. Blobel, M. Bukrinsky. (1998) Viral protein R regulates nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex. *EMBO J.*; 17:909-17.
- 120 Kamata, M., Y. Nitahara-Kasahara, Y. Miyamoto, Y. Yoneda, Y. Aida. (2005) Importin-alpha promotes passage through the nuclear pore complex of human immunodeficiency virus type 1 Vpr. *J. Virol.*; 79:3557-64.
- 121 Le Rouzic, E., A. Mousnier, C. Rustum, F. Stutz, E. Hallberg, C. Dargemont, S. Benichou. (2002) Docking of HIV-1 Vpr to the nuclear envelope is mediated by the interaction with the nucleoporin hCG1. *J. Biol. Chem.*; 277:45091-8.
- 122 de Noronha CM, Sherman MP, Lin HW, Cavrois MV, Moir RD, Goldman RD, Greene WC. (2001) Dynamic disruptions in nuclear envelope architecture and integrity induced by HIV-1 Vpr. *Science*; 294:1105-8.
- 123 Hearps, A. C., D. A. Jans. (2006) HIV-1 integrase is capable of targeting DNA to the nucleus via an importin alpha/beta-dependent mechanism. *Biochem. J.*; 398:475-84.
- 124 Gallay, P., V. Stitt, C. Mundy, M. Oettinger, D. Trono. (1996) Role of the karyopherin pathway in human immunodeficiency virus type 1 nuclear import. *J. Virol.*; 70:1027-32.
- 125 Ao, Z., G. Huang, H. Yao, Z. Xu, M. Labine, A. W. Cochrane, X. Yao. (2007) Interaction of human immunodeficiency virus type 1 integrase with cellular nuclear import receptor importin 7 and its impact on viral replication. *J. Biol. Chem.* 282:13456-67.
- 126 Fassati, A., D. Gorlich, I. Harrison, L. Zaytseva, J. M. Mingot. (2003) Nuclear import of HIV-1 intracellular reverse transcription complexes is mediated by importin 7. *EMBO J.*; 22:3675-85.
- 127 Zaitseva, L., P. Cherepanov, L. Leyens, S. J. Wilson, J. Rasaiyaah, A. Fassati. 2009. HIV-1 exploits importin 7 to maximize nuclear import of its DNA genome. *Retrovirology*; 6:11.

- 
- 128 Christ, F., W. Thys, J. De Rijck, R. Gijssbers, A. Albanese, D. Arosio, S. Emiliani, J. C. Rain, R. Benarous, A. Cereseto, Z. Debysier. 2008. Transportin-SR2 imports HIV into the nucleus. *Curr. Biol.*; 18:1192-202.
- 129 Levin A, Hayouka Z, Friedler A, Loyter A. (2010) Transportin 3 and importin  $\alpha$  are required for effective nuclear import of HIV-1 integrase in virus-infected cells. *Nucleus*; 1:422-31.
- 130 Ebina, H., J. Aoki, S. Hatta, T. Yoshida, Y. Koyanagi. (2004) Role of Nup98 in nuclear entry of human immunodeficiency virus type 1 cDNA. *Microbes Infect.* 6:715–24.
- 131 Ocwieja KE, Brady TL, Ronen K, Huegel A, Roth SL, Schaller T, James LC, Towers GJ, Young JA, Chanda SK, König R, Malani N, Berry CC, Bushman FD. (2011) HIV integration targeting: a pathway involving Transportin-3 and the nuclear pore protein RanBP2. *PLoS Pathog.*; 7:e1001313.
- 132 Woodward CL, Prakobwanakit S, Mosessian S, Chow SA. (2009) Integrase interacts with nucleoporin NUP153 to mediate the nuclear import of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.*; 83:6522-33.
- 133 Schröder AR, Shinn P, Chen H, Berry C, Ecker JR, Bushman F. (2002) HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell*; 110:521-9.
- 134 Shun MC, Raghavendra NK, Vandegraaff N, Daigle JE, Hughes S, Kellam P, Cherepanov P, Engelman A. (2007) LEDGF/p75 functions downstream from preintegration complex formation to effect gene-specific HIV-1 integration. *Genes Dev.*; 21:1767–78.
- 135 Llano M, Saenz DT, Meehan A, Wongthida P, Peretz M, Walker WH, Teo W, Poeschla EM. (2006) An essential role for LEDGF/p75 in HIV integration. *Science*; 314:461–4.
- 136 Ciuffi A, Llano M, Poeschla E, Hoffmann C, Leipzig J, Shinn P, Ecker JR, Bushman F. (2005) A role for LEDGF/p75 in targeting HIV DNA integration. *Nat Med.*; 11:1287-9.
- 137 Farnet CM, Bushman FD. (1997) HIV-1 cDNA integration: requirement of HMG I(Y) protein for function of preintegration complexes in vitro. *Cell*; 88:483-92.
- 138 Hindmarsh P, Ridky T, Reeves R, Andrade M, Skalka AM, Leis J. (1999) HMG protein family members stimulate human immunodeficiency virus type 1 and avian sarcoma virus concerted DNA integration in vitro. *J Virol.*; 73:2994-3003.
- 139 Reeves R, Beckerbauer L. (Jun 2001) HMGI/Y proteins: flexible regulators of transcription and chromatin structure. *Biochim Biophys Acta*; 1519: 13–29.

- 
- 140 Kulkarni A, Pavithra L, Rampalli S, Mogare D, Babu K, Shiekh G, Ghosh S, Chattopadhyay S. (2004) HIV-1 integration sites are flanked by potential MARs that alone can act as promoters. *Biochem Biophys Res Commun.*; 322:672-7.
- 141 Jacque JM, Stevenson M. (2006) The inner-nuclear-envelope protein emerlin regulates HIV-1 infectivity. *Nature*; 441:641-5.
- 142 Chen H, Engelman A. (1998) The barrier-to-autointegration protein is a host factor for HIV type 1 integration. *Proc Natl Acad Sci USA.*; 95:15270-4.
- 143 Lin CW, Engelman A. (2003) The barrier-to-autointegration factor is a component of functional human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes. *J Virol.*; 77:5030-6.
- 144 Williams SA, Greene WC: (2007) Regulation of HIV-1 latency by T-cell activation. *Cytokine.*; 39:63-74
- 145 Coiras M, López-Huertas MR, Pérez-Olmeda M, Alcamí J. (2009) Understanding HIV-1 latency provides clues for the eradication of long-term reservoirs. *Nat Rev Microbiol.*; 7:798–812.
- 146 Pereira L, Bentley K, Peeters A, Churchill M, Deacon N. (1999) A compilation of cellular transcription factor interactions with the HIV-1 LTR promoter. *Nucleic Acids Res*; 28:663-8.
- 147 Nota: El significado de estas abreviaciones son: **U3**: unica 3'; **R**: repetida; **U5**: unica 5'.
- 148 Battistini A, Marsili G, Sgarbanti M, Ensoli B, Hiscott J. (2002) IRF Regulation of HIV-1 long terminal repeat activity. *J Interferon Cytokine Res*; 22:27-37.
- 149 Vant Lint C, Amella C, Emiliani S, John M, Jie T, Verdin E. (1997) Transcription factor binding sites downstream of the HIV-1 transcription start site are important for virus infectivity. *J Virol*; 71:6113-27
- 150 Ramírez E. A., Soriano V., Holguín A. (2005) Regulación de la transcripción en los diferentes subtipos del VIH-1. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*; 23:156-62.
- 151 Verdin E. (1991) DNase I-hypersensitive sites are associated with both long terminal repeats and with the intragenic enhancer of integrated human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.*; 65:6790-9.
- 152 Verdin E, Paras PJ, Van Lint C.; (1993) Chromatin disruption in the promoter of human immunodeficiency virus type 1 during transcriptional activation. *Embo. J.*; 12:3249-59.

- 
- 153 Van Lint C, Ghysdael J, Paras P, Jr, Burny A, Verdin E. (1994) A transcriptional regulatory element is associated with a nuclease-hypersensitive site in the pol gene of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.*; 68:2632–48.
- 154 Lewinski MK, Bisgrove D, Shinn P, Chen H, Hoffmann C, Hannenhalli S, Verdin E, Berry CC, Ecker JR, Bushman FD. (2005) Genome-wide analysis of chromosomal features repressing human immunodeficiency virus transcription. *J Virol.*; 79:6610–9.
- 155 Van Lint C, Emiliani S, Ott M, Verdin E. (1996) Transcriptional activation and chromatin remodeling of the HIV-1 promoter in response to histone acetylation. *Embo J.*;15:1112–20.
- 156 Lehrman G, Hogue IB, Palmer S, Jennings C, Spina CA, Wiegand A, Landay AL, Coombs RW, Richman DD, Mellors JW, Coffin JM, Bosch RJ, Margolis DM. (2005) Depletion of latent HIV-1 infection in vivo: a proof-of-concept study. *Lancet*; 366:549–55.
- 157 Schulze-Forster K, Gotz F, Wagner H, Kroger H, Simon D. (1990) Transcription of HIV1 is inhibited by DNA methylation. *Biochem Biophys Res Commun.*;168:141–7.
- 158 Bird AP, Wolffe AP. (1999) Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin. *Cell.*; 99:451–4.
- 159 Henderson A, Holloway A, Reeves R, Tremethick DJ. (2004) Recruitment of SWI/SNF to the human immunodeficiency virus type 1 promoter. *Mol Cell Biol.*; 24:389–97.
- 160 Sune C, Garcia-Blanco MA. (1995) Sp1 transcription factor is required for in vitro basal and Tat-activated transcription from the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat. *J Virol*; 69:6572–6.
- 161 Emili A, Greenblatt J, Ingles CJ. (1994) Species-specific interaction of the glutamine-rich activation domains of Sp1 with the TATA boxbinding protein. *Mol Cell Biol*;14:1582–93.
- 162 Perkins ND, Edwards NL, Duckett CS, Agranoff AB, Schmid RM, Nabel GJ. (1993) A cooperative interaction between NF-kappa B and Sp1 is required for HIV-1 enhancer activation. *EMBO J.*; 12:3551–8.
- 163 West MJ, Lowe AD, Karn J. (2001) Activation of human immunodeficiency virus transcription in T cells revisited: NF-kappaB p65 stimulates transcriptional elongation. *J Virol*; 75:8524–37.
- 164 Williams SA, Chen LF, Kwon H, Ruiz-Jarabo CM, Verdin E, Greene WC. (2006) NF-kappaB p50 promotes HIV latency through HDAC recruitment and repression of transcriptional initiation. *EMBO J.*; 25:139–49.

- 
- 165 Barboric M, Nissen RM, Kanazawa S, Jabrane-Ferrat N, Peterlin BM. (2001) NF-kappaB binds P-TEFb to stimulate transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Mol. Cell*; 8:327–37.
- 166 Gerritsen ME, Williams AJ, Neish AS, Moore S, Shi Y, Collins T. (1997) CREB-binding protein/p300 are transcriptional coactivators of p65. *Proc Natl Acad Sci USA*.; 94:2927–32.
- 167 Nabel G, Baltimore D. (1987) An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T cells. *Nature*;326:711–3.
- 168 Williams SA, Kwon H, Chen LF, Greene WC. (2007) Sustained induction of NF-kB is required for efficient expression of latent HIV-1. *J Virol*;81:6043–56.
- 169 Kim YK, Bourgeois CF, Pearson R, Tyagi M, West MJ, Wong J, Wu SY, Chiang CM, Karn J. (2006) Recruitment of TFIID to the HIV LTR is a rate-limiting step in the emergence of HIV from latency. *EMBO J.*; 25:3596–604.
- 170 Kinoshita S, Su L, Amano M, Timmerman LA, Kaneshima H, Nolan GP. (1997) The T cell activation factor NF-ATc positively regulates HIV-1 replication and gene expression in T cells. *Immunity*;6:235–44.
- 171 Johnson BV, Bert AG, Ryan GR, Condina A, Cockerill PN. (2004) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhancer activation requires cooperation between NFAT and AP-1 elements and is associated with extensive nucleosome reorganization. *Mol. Cell Biol.*; 24:7914–30.
- 172 Managlia EZ, Landay A, Al-Harhi L. (2006) Interleukin-7 induces HIV replication in primary naive T cells through a nuclear factor of activated T cell (NFAT)-dependent pathway. *Virology*; 350: 443–52.
- 173 Garcia-Rodriguez C, Rao A. (1998) Nuclear factor of activated T cells (NFAT)-dependent transactivation regulated by the coactivators p300/CREB-binding protein (CBP). *J. Exp. Med.*; 187:2031–6.
- 174 Steger DJ, Workman JL. (1997) Stable co-occupancy of transcription factors and histones at the HIV-1 enhancer. *EMBO J.*; 16:2463–72.
- 175 Sieweke MH, Tekotte H, Jarosch U, Graf T. (1998) Cooperative interaction of Ets-1 with USF-1 required for HIV-1 enhancer activity in T cells. *EMBO J.*; 17:1728–39.
- 176 Bell B, Sadowski I. (1996) Ras-responsiveness of the HIV-1 LTR requires RBF-1 and RBF-2 binding sites. *Oncogene*;13:2687-97.



- 
- 177 Yang Y, Tesmer V, Bina M. (2002) Regulation of HIV-1 transcription in activated monocyte-macrophages. *Virology*; 299:256-65.
- 178 Bassuk A, Anandappa R, Leiden J. (1997) Physical interactions between Ets and NF- $\kappa$ B/NFAT protein play an important role in their cooperative activation of the HIV enhancer in T cells. *J Virol.*; 71:3563-73.
- 179 Desai-Yajnik V, Samuels HH. (1993) The NF-kappa B and Sp1 motifs of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat function as novel thyroid hormone response elements. *Mol Cell Biol.*; 13:5057-69.
- 180 Hsia SC, Shi YB. (2002) Chromatin disruption and histone acetylation in regulation of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat by thyroid hormone receptor. *Mol Cell Biol.*; 22:4043-52.
- 181 Desai-Yajnik V, Hadzic E, Modlinger P, Malhotra S, Gechlik G, Samuels HH. (1995) Interactions of thyroid hormone receptor with the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) long terminal repeat and the HIV-1 Tat transactivator. *J Virol.*; 69:5103-12.
- 182 Parada CA, Roeder RG. (1996) Enhanced processivity of RNA polymerase II triggered by Tat-induced phosphorylation of its carboxy-terminal domain. *Nature*; 384:375-8.
- 183 Marzio G, Tyagi M, Gutierrez MI, Giacca M. (1998) HIV-1 tat transactivator recruits p300 and CREB-binding protein histone acetyltransferases to the viral promoter. *Proc Natl Acad Sci USA.*; 95:13519-24.
- 184 Benkirane M, Chun RF, Xiao H, Ogryzko VV, Howard BH, Nakatani Y, Jeang KT. (1998) Activation of integrated provirus requires histone acetyltransferase. p300 and P/CAF are coactivators for HIV-1 Tat. *J. Biol. Chem.*; 273:24898-905.
- 185 Furia B, Deng L, Wu K, Baylor S, Kehn K, Li H, Donnelly R, Coleman T, Kashanchi F. (2002) Enhancement of nuclear factor-kappa B acetylation by coactivator p300 and HIV-1 Tat proteins. *J. Biol. Chem.*; 277:4973-80.
- 186 Dandekar DH, Ganesh KN, Mitra D. (2004) HIV-1 Tat directly binds to NFkappaB enhancer sequence: role in viral and cellular gene expression. *Nucleic Acids Res.*; 32:1270-8.
- 187 Treand C, du Chene I, Bres V, Kiernan R, Benarous R, Benkirane M, Emiliani S. (2006) Requirement for SWI/SNF chromatin-remodeling complex in Tat-mediated activation of the HIV-1 promoter. *Embo J.*; 25:1690-9.
- 188 Mahmoudi T, Parra M, Vries RG, Kauder SE, Verrijzer CP, Ott M, Verdin E. (2006) The SWI/SNF chromatin-remodeling complex is a cofactor for Tat transactivation of the HIV promoter. *J Biol Chem.*; 281:19960-8.

- 
- 189 Bres V, Gomes N, Pickle L, Jones KA. (2005) A human splicing factor, SKIP, associates with P-TEFb and enhances transcription elongation by HIV-1 Tat. *Genes Dev.*; 19:1211–26.
- 190 Chiu YL, Coronel E, Ho CK, Shuman S, Rana TM. (2001) HIV-1 Tat protein interacts with mammalian capping enzyme and stimulates capping of TAR RNA. *J Biol Chem*; 276:12959–66.
- 191 Chiu YL, Ho CK, Saha N, Schwer B, Shuman S, Rana TM. (2002) Tat stimulates cotranscriptional capping of HIV mRNA. *Mol. Cell*; 10:585–97.
- 192 Cullen BR. (1991) Regulation of HIV-1 gene expression. *Faseb J.*; 5:2361-8.
- 193 Kirchhoff, F., Easterbrook, P. J., Douglas, N., Troop, M., Greenough, T. C., Weber, J., Carl, S., Sullivan, J. L. & Daniels, R. S. (1999) Sequence variations in human immunodeficiency virus type 1 Nef are associated with different stages of disease. *J Virol*; 73, 5497–5508.
- 194 Tsunetsugu-Yokota Y, Matsuda S, Maekawa M, Saito T, Takemori T, Takebe Y. (1992) Constitutive expression of the nef gene suppresses human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication in monocytic cell lines. *Virology.*; 191:960-3.
- 195 Niederman TM, Thielan BJ, Ratner L. (1989) Human immunodeficiency virus type 1 negative factor is a transcriptional silencer. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 86:1128-32.
- 196 Schragar JA, Marsh JW. (1999) HIV-1 Nef increases T cell activation in a stimulus-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 96:8167-72.
- 197 Simmons A, Aluvihare V, McMichael A. (2001) Nef triggers a transcriptional program in T cells imitating single-signal T cell activation and inducing HIV virulence mediators. *Immunity*; 14:763–77
- 198 Baur AS, Sawai ET, Dazin P, Fantl WJ, Cheng-Mayer C, Peterlin BM. (1994) HIV-1 Nef leads to inhibition or activation of T cells depending on its intracellular localization. *Immunity.*; 1:373–84.
- 199 Anderson SJ, Lenburg M, Landau NR, Garcia JV. (1994) The cytoplasmic domain of CD4 is sufficient for its down-regulation from the cell surface by human immunodeficiency virus type 1 Nef. *J Virol.*; 68:3092-101.
- 200 Greenberg ME, Bronson S, Lock M, Neumann M, Pavlakis GN, Skowronski J. (1997) Co-localization of HIV-1 Nef with the AP-2 adaptor protein complex correlates with Nef-induced CD4 down-regulation. *EMBO J.*; 16:6964-76.

- 
- 201 Piguet V, Chen YL, Mangasarian A, Foti M, Carpentier JL, Trono D. (1998) Mechanism of Nef-induced CD4 endocytosis: Nef connects CD4 with the mu chain of adaptor complexes. *EMBO J.*; 17:2472-81.
- 202 Janvier K, Craig H, Le Gall S, Benarous R, Guatelli J, Schwartz O, Benichou S. (2001) Nef-induced CD4 downregulation: a diacidic sequence in human immunodeficiency virus type 1 Nef does not function as a protein sorting motif through direct binding to beta-COP. *J Virol.*; 75:3971-6.
- 203 Piguet V, Gu F, Foti M, Demaurex N, Gruenberg J, Carpentier JL, Trono D. (1999) Nef-induced CD4 degradation: a diacidic-based motif in Nef functions as a lysosomal targeting signal through the binding of beta-COP in endosomes. *Cell.*; 97:63-73.
- 204 Roeth JF, Williams M, Kasper MR, Filzen TM, Collins KL. (2004) HIV-1 Nef disrupts MHC-I trafficking by recruiting AP-1 to the MHC-I cytoplasmic tail. *J. Cell Biol.*; 167:903-13.
- 205 Schaefer MR, Wonderlich ER, Roeth JF, Leonard JA, Collins KL. (2008) HIV-1 Nef targets MHC-I and CD4 for degradation via a final common beta-COP-dependent pathway in T cells. *PLoS Pathog.*; 4:e1000131.
- 206 Schwartz O, Maréchal V, Le Gall S, Lemonnier F, Heard JM. (1996) Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nat. Med.*; 2:338-42.
- 207 Sawai ET, Baur A, Struble H, Peterlin BM, Levy JA, Cheng-Mayer C. (1994) Human immunodeficiency virus type 1 Nef associates with a cellular serine kinase in T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 9:1539-43.
- 208 Fackler, O. T., X. Lu, J. A. Frost, M. Geyer, B. Jiang, W. Luo, A. Abo, A. S. Alberts, B. M. Peterlin. (2000) p21-activated kinase 1 plays a critical role in cellular activation by Nef. *Mol. Cell. Biol.* 20:2619-27.
- 209 Krautkrämer E, Giese SI, Gasteier JE, Muranyi W, Fackler OT. (2004) Human immunodeficiency virus type 1 Nef activates p21-activated kinase via recruitment into lipid rafts. *J Virol.*; 78:4085-97.
- 210 Rauch S, Pulkkinen K, Saksela K, Fackler OT. (2008) Human immunodeficiency virus type 1 Nef recruits the guanine exchange factor Vav1 via an unexpected interface into plasma membrane microdomains for association with p21-activated kinase 2 activity. *J Virol.*; 82:2918-29.
- 211 Pulkkinen, K., G. H. Renkema, F. Kirchhoff, K. Saksela. (2004) Nef associates with p21-activated kinase 2 in a p21-GTPase-dependent dynamic activation complex within lipid rafts. *J. Virol.*; 78:12773-80.

- 
- 212 Linnemann, T., Y. H. Zheng, R. Mandic, B. M. Peterlin. (2002) Interaction between Nef and phosphatidylinositol-3-kinase leads to activation of p21-activated kinase and increased production of HIV. *Virology*; 294:246-55.
- 213 Lu X, Wu X, Plemenitas A, Yu H, Sawai ET, Abo A, Peterlin BM. (1996) CDC42 and Rac1 are implicated in the activation of the Nef-associated kinase and replication of HIV-1. *Curr Biol.*; 6:1677-84.
- 214 Manninen A, Saksela K. (2002) HIV-1 Nef interacts with inositol trisphosphate receptor to activate calcium signaling in T cells. *J Exp Med.*; 195:1023-32.
- 215 Manninen A, Renkema GH, Saksela K. (2000) Synergistic activation of NFAT by HIV-1 nef and the Ras/MAPK pathway. *J Biol Chem.*; 275:16513-7.
- 216 Brügger B, Krautkrämer E, Tibroni N, Munte CE, Rauch S, Leibrecht I, Glass B, Breuer S, Geyer M, Kräusslich HG, Kalbitzer HR, Wieland FT, Fackler OT. (2007) Human immunodeficiency virus type 1 Nef protein modulates the lipid composition of virions and host cell membrane microdomains. *Retrovirology.*; 4:70.
- 217 van 't Wout AB, Swain JV, Schindler M, Rao U, Pathmajeyan MS, Mullins JI, Kirchhoff F. (2005) Nef induces multiple genes involved in cholesterol synthesis and uptake in human immunodeficiency virus type 1-infected T cells. *J Virol.*; 79:10053-8.
- 218 Ahmad N, Venkatesan S. (1988) Nef protein of HIV-1 is a transcriptional repressor of HIV-1 LTR. *Science*; 241:1481-5.
- 219 Ludvigsen A, Werner T, Gimbel W, Erfle V, Brack-Werner R. (1996) Down-modulation of HIV-1 LTR activity by an extra-LTR nef gene fragment. *Virology.*; 216:245-51.
- 220 Niederman TM, Hastings WR, Luria S, Bandres JC, Ratner L. (1993) HIV-1 Nef protein inhibits the recruitment of AP-1 DNA-binding activity in human T-cells. *Virology*; 194:338-44.
- 221 Niederman TM, Garcia JV, Hastings WR, Luria S, Ratner L. (1992) Human immunodeficiency virus type 1 Nef protein inhibits NF-kappa B induction in human T cells. *J Virol.*; 66:6213-9.
- 222 Yoon K, Kim S. (1999) Lack of negative influence on the cellular transcription factors NF-kappaB and AP-1 by the nef protein of human immunodeficiency virus type 1. *J Gen Virol.*; 80:2951-6.
- 223 Kewalramani V N, Emerman M. (1996) Vpx association with mature core structures of HIV-2. *Virology.*; 218:159-68.

- 
- 224 Selig L, Pages J-C, Tanchou V, Preveral S, Berlioz-Torrent C, Liu L X, Erdtmann L, Darlix J-L, Benarous R, Benichou S. (1999) Interaction with the p6 domain of the Gag precursor mediates incorporation into virions of Vpr and Vpx proteins from primate lentiviruses. *J Virol.*; 73:592–600.
- 225 Jowett JB, Planelles V, Poon B, Shah NP, Chen ML, Chen IS. (1995) The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene arrests infected T cells in the G2 + M phase of the cell cycle. *J. Virol.*; 69:6304–13.
- 226 Goh WC, Rogel ME, Kinsey CM, Michael SF, Fultz PN, Nowak MA, Hahn BH, Emerman M. (1998) HIV-1 Vpr increases viral expression by manipulation of the cell cycle: a mechanism for selection of Vpr in vivo. *Nat. Med.*; 4:65–71.
- 227 Brasey A, Lopez-Lastra M, Ohlmann T, Beerens N, Berkhout B, Darlix JL, Sonenberg N. (2003) The leader of human immunodeficiency virus type 1 genomic RNA harbors an internal ribosome entry segment that is active during the G2/M phase of the cell cycle. *J. Virol.*; 77:3939–49.
- 228 Conti L, Matarrese P, Varano B, Gauzzi MC, Sato A, Malorni W, Belardelli F, Gessani S. (2000) Dual role of the HIV-1 vpr protein in the modulation of the apoptotic response of T cells. *J Immunol.*; 165:3293-300.
- 229 Bergamaschi A, Ayinde D, David A, Le Rouzic E, Morel M, Collin G, Descamps D, Damond F, Brun-Vezinet F, Nisole S, Margottin-Goguet F, Pancino G, Transy C. (2009) The human immunodeficiency virus type 2 Vpx protein usurps the CUL4A-DDB1 DCAF1 ubiquitin ligase to overcome a postentry block in macrophage infection. *J Virol.*; 83:4854-60.
- 230 Maldarelli F, Chen MY, Willey RL, Strebel K. (1993) Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein is an oligomeric type I integral membrane protein. *J Virol.*;67:5056–61.
- 231 Hsu K, Seharaseyon J, Dong P, Bour S, Marban E. (2004) Mutual functional destruction of HIV-1 Vpu and host TASK-1 channel. *Mol Cell.*; 14:259–67.
- 232 Varthakavi V, Smith RM, Bour SP, Strebel K, Spearman P. (2003) Viral protein U counteracts a human host cell restriction that inhibits HIV-1 particle production. *Proc Natl Acad Sci USA.*; 100: 15154-9.
- 233 Neil SJ, Zang T, Bieniasz PD. (2008) Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature* ; 451:425-30.
- 234 Piller SC, Ewart GD, Premkumar A, Cox GB, Gage PW. (1996) Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 forms cation-selective channels in planar lipid bilayers. *Proc Natl Acad Sci USA.*; 93:111–5.

- 
- 235 Park SH, Mrse AA, Nevzorov AA, Mesleh MF, Oblatt-Montal M, Montal M, Opella SJ. (2003) Three-dimensional structure of the channel-forming trans-membrane domain of virus protein "u" (Vpu) from HIV-1. *J Mol Biol.*; 333:409–24.
- 236 Bour S, Schubert U, Peden K, Strebel K. (1996) The envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 2 enhances viral particle release: a Vpu-like factor? *J Virol.*; 70:820-9.
- 237 Lama J, Mangasarian A, Trono D: (1999) Cell-surface expression of CD4 reduces HIV-1 infectivity by blocking Env incorporation in a Nef- and Vpu-inhibitable manner. *Curr. Biol.*; 9:622-31.
- 238 Willey RL, Maldarelli F, Martin MA, Strebel K. (1992) Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4. *J Virol.*; 66:7193–200.
- 239 Lenburg ME, Landau NR. (1993) Vpu-induced degradation of CD4: requirement for specific amino acid residues in the cytoplasmic domain of CD4. *J Virol.*; 67:7238-45.
- 240 Resh MD. (2005) Intracellular trafficking of HIV-1 Gag: how Gag interacts with cell membranes and makes viral particles. *AIDS Rev*, 7:84-91.
- 241 Dalton AK, Ako-Adjei D, Murray PS, Murray D, Vogt VM. (2007) Electrostatic interactions drive membrane association of the human immunodeficiency virus type 1 Gag MA domain. *J Virol*, 81:6434-45.
- 242 Ono A, Ablan SD, Lockett SJ, Nagashima K, Freed EO. (2004) Phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate regulates HIV-1 Gag targeting to the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101:14889-94.
- 243 Göttlinger HG, Sodroski JG, Haseltine WA. (1989) Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 86:5781-5.
- 244 Lopez-Verges S, Camus G, Blot G, Beauvoir R, Benarous R, Berlioz-Torrent C: (2006) Tail-interacting protein TIP47 is a connector between Gag and Env and is required for Env incorporation into HIV-1 virions. *Proc Natl Acad Sci USA.*; 103:14947-52.
- 245 Lingappa JR, Dooher JE, Newman MA, Kiser PK, Klein KC. (2006) Basic residues in the nucleocapsid domain of Gag are required for interaction of HIV-1 gag with ABCE1 (HP68), a cellular protein important for HIV-1 capsid assembly. *J Biol Chem.*; 281:3773-84.
- 246 Mouland AJ, Mercier J, Luo M, Bernier L, DesGroseillers L, Cohen EA. (2000) The double-stranded RNA-binding protein Staufen is incorporated in human immunodeficiency virus type 1: evidence for a role in genomic RNA encapsidation. *J Virol.*; 74:5441-51.

- 
- 247 Ueno T, Tokunaga K, Sawa H, Maeda M, Chiba J, Kojima A, Hasegawa H, Shoya Y, Sata T, Kurata T, Takahashi H. (2004) Nucleolin and the packaging signal, psi, promote the budding of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1). *Microbiol. Immunol.*; 48:111-8.
- 248 Chatel-Chaix L, Boulay K, Mouland AJ, Desgroseillers L. (2008) The host protein Stauf1 interacts with the Pr55Gag zinc fingers and regulates HIV-1 assembly via its N-terminus. *Retrovirology*; 5:41.
- 249 Dong X, Li H, Derdowski A, Ding L, Burnett A, Chen X, Peters TR, Dermody TS, Woodruff E, Wang JJ, Spearman P. (2005) AP-3 directs the intracellular trafficking of HIV-1 Gag and plays a key role in particle assembly. *Cell*; 120:663-74.
- 250 Garrus JE, von Schwedler UK, Pornillos OW, Morham SG, Zavitz KH, Wang HE, Wettstein DA, Stray KM, Cote M, Rich RL, Myszka DG, Sundquist WI. (2001) Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell*; 107:55-65.
- 251 Amit I, Yakir L, Katz M, Zwang Y, Marmor MD, Citri A, Shtiegman K, Alroy I, Tuvia S, Reiss Y, Roubini E, Cohen M, Wides R, Bacharach E, Schubert U, Yarden Y. (2004) Tal, a Tsg101-specific E3 ubiquitin ligase, regulates receptor endocytosis and retrovirus budding. *Genes Dev.*; 18:1737-52.
- 252 Stuchell MD, Garrus JE, Muller B, Stray KM, Ghaffarian S, McKinnon R, Krausslich HG, Morham SG, Sundquist WI: (2004) The human endosomal sorting complex required for transport (ESCRT-I) and its role in HIV-1 budding. *J Biol Chem*; 279:36059-71.
- 253 Eastman SW, Martin-Serrano J, Chung W, Zang T, Bieniasz PD. (2005) Identification of human VPS37C, a component of endosomal sorting complex required for transport-I important for viral budding. *J Biol. Chem.*; 280:628-36.
- 254 Strack B, Calistri A, Craig S, Popova E, Gottlinger HG: (2003) AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. *Cell*; 114:689-99.
- 255 Jolly C, Sattentau QJ. (2007) Human immunodeficiency virus type 1 assembly, budding, and cell-cell spread in T cells take place in tetraspanin-enriched plasma membrane domains. *J Virol.*; 81:7873-84.
- 256 Lorès P, Boucher V, Mackay C, Pla M, Von Boehmer H, Jami J, Barré-Sinoussi F, Weill JC. (1992) Expression of human CD4 in transgenic mice does not confer sensitivity to human immunodeficiency virus infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*; 8:2063-71.

- 
- 257 Tersmette M, van Dongen JJ, Clapham PR, de Goede RE, Wolvers-Tettero IL, Geurts van Kessel A, Huisman JG, Weiss RA, Miedema F. (1989) Human immunodeficiency virus infection studied in CD4-expressing human-murine T-cell hybrids. *Virology*; 168:267-73.
- 258 Shibata R, Sakai H, Kawamura M, Tokunaga K, Adachi A. (1995) Early replication block of human immunodeficiency virus type 1 in monkey cells. *J Gen Virol*; 76:2723-30.
- 259 Himathongkham S, Luciw PA. (1996) Restriction of HIV-1 (subtype B) replication at the entry step in rhesus macaque cells. *Virology*; 219:485-8.
- 260 Sheehy AM, Gaddis NC, Choi JD, Malim MH. (2002) Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature*; 418:646-50.
- 261 Paxton WA, Liu R, Kang S, Wu LJ, Gingeras TR, Landau NR, Mackay CR, Koup RA. (1998) Reduced HIV-1 infectability of CD4+ lymphocytes from exposed-uninfected individuals: association with low expression of CCR5 and high production of beta-chemokines. *Virology*; 244:66-73.
- 262 Iqbal, S. M., T. B. Ball, J. Kimani, P. Kiama, P. Thottingal, J. E. Embree, K. R. Fowke, F. A. Plummer. (2005) Elevated T cell counts and RANTES expression in the genital mucosa of HIV-1-resistant Kenyan commercial sex workers. *J Infect. Dis*; 192:728-38.
- 263 Koning FA, Otto SA, Hazenberg MD, Dekker L, Prins M, Miedema F, Schuitemaker H. (2005) Low-level CD4+ T cell activation is associated with low susceptibility to HIV-1 infection. *J Immunol*; 175:6117-22.
- 264 Bégaud E, Chartier L, Marechal V, Ipero J, Léal J, Versmisse P, Breton G, Fontanet A, Capoulade-Metay C, Fleury H, Barré-Sinoussi F, Scott-Algara D, Pancino G. (2006) Reduced CD4 T cell activation and in vitro susceptibility to HIV-1 infection in exposed uninfected Central Africans. *Retrovirology*; 3:35.
- 265 Geffin, R., Wolf, D., Muller, R., Hill, M. D., Stellwag, E., Freitag, M., Sass, G., Scott, G. B. & Baur, A. S. (2000) Functional and structural defects in HIV type 1 nef genes derived from pediatric long-term survivors. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 16:1855-68.
- 266 Iversen, A. K., Shpaer, E. G., Rodrigo, A. G., Hirsch, M. S., Walker, B. D., Sheppard, H. W., Merigan, T. C. & Mullins, J. I. (1995) Persistence of attenuated rev genes in a human immunodeficiency virus type 1-infected asymptomatic individual. *J Virol*; 69:5743-53.
- 267 Rangel HR, Garzaro D, Rodríguez AK, Ramírez AH, Ameli G, Del Rosario Gutiérrez C, Pujol FH. (2009) Deletion, insertion and stop codon mutations in vif genes of HIV-1 infecting slow progressor patients. *J Infect Dev Ctries*; 3:531-8.



- 
- 268 Piacentini L, Biasin M, Fenizia C, Clerici M. (2009) Genetic correlates of protection against HIV infection: the ally within. *J Intern. Med.*; 265:110-24.
- 269 Davey RT Jr, Bhat N, Yoder C, Chun TW, Metcalf JA, Dewar R, Natarajan V, Lempicki RA, Adelsberger JW, Miller KD, Kovacs JA, Polis MA, Walker RE, Falloon J, Masur H, Gee D, Baseler M, Dimitrov DS, Fauci AS, Lane HC. (1999) HIV-1 and T cell dynamics after interruption of highly active antiretroviral therapy (HAART) in patients with a history of sustained viral suppression. *Proc Natl Acad Sci USA.*; 96:15109-14.
- 270 Finzi D, Hermankova M, Pierson T, Carruth LM, Buck C, Chaisson RE, Quinn TC, Chadwick K, Margolick J, Brookmeyer R, Gallant J, Markowitz M, Ho DD, Richman DD, Siliciano RF. (1997) Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science*; 278:1295-300.
- 271 Schnittman SM, Lane HC, Greenhouse J, Justement JS, Baseler M, Fauci AS. (1990) Preferential infection of CD4+ memory T cells by human immunodeficiency virus type 1: evidence for a role in the selective T-cell functional defects observed in infected individuals. *Proc Natl Acad Sci USA.*; 87:6058-62.
- 272 Llano A, Barretina J, Gutiérrez A, Blanco J, Cabrera C, Clotet B, Esté JA. (2001) Interleukin-7 in plasma correlates with CD4 T-cell depletion and may be associated with emergence of syncytium-inducing variants in human immunodeficiency virus type 1-positive individuals. *J Virol.*; 75:10319-25.
- 273 Chiu YL, Soros VB, Kreisberg JF, Stopak K, Yonemoto W, Greene WC. (2005) Cellular APOBEC3G restricts HIV-1 infection in resting CD4+ T cells. *Nature*; 435:108–14.
- 274 Meyerhans A, Vartanian JP, Hultgren C, Plikat U, Karlsson A, Wang L, Eriksson S, Wain-Hobson S. (1994) Restriction and enhancement of human immunodeficiency virus type 1 replication by modulation of intracellular deoxynucleoside triphosphate pools. *J Virol.*; 68:535-40.
- 275 Zhou Y, Zhang H, Siliciano JD, Siliciano RF. (2005) Kinetics of human immunodeficiency virus type 1 decay following entry into resting CD4+ T cells. *J Virol.*; 79:2199–210.
- 276 Zack JA, Arrigo SJ, Weitsman SR, Go AS, Haislip A, Chen IS. (1990) HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes: molecular analysis reveals a labile, latent viral structure. *Cell*; 61:213–22.
- 277 Zack JA, Haislip AM, Krogstad P, Chen IS. (1992) Incompletely reversetranscribed human immunodeficiency virus type 1 genomes in quiescent cells can function as intermediates in the retroviral life cycle, *J Virol.*; 66:1717–25.

- 
- 278 Jordan A, Defechereux P, Verdin E. (2001) The site of HIV-1 integration in the human genome determines basal transcriptional activity and response to Tat transactivation. *EMBO J.*; 20:1726–38.
- 279 Finzi D, Blankson J, Siliciano JD, Margolick JB, Chadwick K, Pierson T, Smith K, Lisziewicz J, Lori F, Flexner C, Quinn TC, Chaisson RE, Rosenberg E, Walker B, Gange S, Gallant J, Siliciano RF. (1999) Latent infection of CD4+T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat. Med.*; 5:512–7.
- 280 Siliciano JD, Kajdas J, Finzi D, Quinn TC, Chadwick K, Margolick JB, Kovacs C, Gange SJ, Siliciano RF. (2003) Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells. *Nat. Med.*; 9:727–8.
- 281 Grossman Z, Meier-Schellersheim M, Paul WE, Picker LJ. (2006) Pathogenesis of HIV infection: what the virus spares is as important as what it destroys. *Nat Med.*; 12:289-95.
- 282 Sodora DL, Silvestri G. (2008) Immune activation and AIDS pathogenesis. *AIDS.*; 22:439-46.
- 283 Gray RH, Wawer MJ, Sewankambo N, Serwadda D. (1997) HIV-1 infection associated with abnormal vaginal flora morphology and bacterial vaginosis. *Lancet.*; 350:1780.
- 284 Douek DC, Brenchley JM, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, Okamoto Y, Casazza JP, Kuruppu J, Kunstman K, Wolinsky S, Grossman Z, Dybul M, Oxenius A, Price DA, Connors M, Koup RA. (2002) HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells. *Nature.*; 417:95-8.
- 285 Arhel NJ, Kirchhoff F (2009) Implications of Nef: host cell interactions in viral persistence and progression to AIDS.. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*; 339:147-75.
- 286 Mehandru S, Poles MA, Tenner-Racz K, Horowitz A, Hurley A, Hogan C, Boden D, Racz P, Markowitz M. (2004) Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. *J Exp. Med.*; 200:761-70.
- 287 Brass AL, Dykxhoorn DM, Benita Y, Yan N, Engelman A, Xavier RJ, Lieberman J, Elledge SJ. (2008) Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen. *Science*; 319:921-6.