



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIRRETROVIRAL
DE LA PROTEÍNA APOBEC3G EN PACIENTES QUE
CONTROLAN LA INFECCIÓN POR EL VIH-1 Y PACIENTES CON
PROGRESIÓN TÍPICA”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

YAZMÍN MORENO VALENCIA.



MÉXICO, D.F.

AÑO 2013.



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.



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: FELIPE CRUZ GARCÍA
VOCAL: Profesor: MARÍA BENITA LEONOR FERNÁNDEZ SALGADO
SECRETARIO: Profesor: JOEL ARMANDO VÁZQUEZ PÉREZ
1er. SUPLENTE: Profesor: TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA
2° SUPLENTE: Profesor: ROCÍO GABRIELA TIRADO MENDOZA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS (CIENI),
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS (INER)**

**DR. JOEL ARMANDO VÁZQUEZ PÉREZ
ASESOR DEL TEMA**

**YAZMÍN MORENO VALENCIA
SUSTENTANTE**

ÍNDICE

LISTADO DE ABREVIATURAS.....	5
ÍNDICE DE FIGURAS.....	7
RESUMEN.....	8
ANTECEDENTES.....	10
DESCUBRIMIENTO.....	10
PANORAMA EPIDEMIOLÓGICO DEL VIH/SIDA.....	11
BIOLOGÍA DEL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA.....	12
<i>CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA.....</i>	<i>12</i>
<i>ESTRUCTURA.....</i>	<i>12</i>
<i>ORGANIZACIÓN GENÓMICA.....</i>	<i>14</i>
<i>PROTEÍNAS VIRALES Y SUS FUNCIONES.....</i>	<i>15</i>
<i>CICLO DE REPLICACIÓN.....</i>	<i>18</i>
HISTORIA NATURAL DE LA ENFERMEDAD.....	23
<i>FASE AGUDA.....</i>	<i>23</i>
<i>FASE CRÓNICA.....</i>	<i>25</i>
<i>ETAPA FINAL: SÍNDROME DE INMUNODEFICIENCIA ADQUIRIDA (SIDA).....</i>	<i>27</i>
RESPUESTA INMUNOLÓGICA FRENTE AL VIH.....	27
<i>RESPUESTA INMUNE INNATA.....</i>	<i>27</i>
COMPONENTES CELULARES:.....	28
FACTORES SOLUBLES.....	30
<i>RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA.....</i>	<i>31</i>
RESPUESTA CELULAR.....	32
RESPUESTA HUMORAL.....	33
TRATAMIENTO Y OBTENCIÓN DE VACUNAS.....	34
<i>TRATAMIENTO.....</i>	<i>34</i>
<i>VACUNAS.....</i>	<i>34</i>
FACTORES CELULARES DE RESTRICCIÓN Y MECANISMOS DE EVASIÓN.....	35
<i>PROTEÍNAS APOBEC3.....</i>	<i>35</i>
APOBEC3G.....	36
* Estructura.....	36
* Mecanismo de Acción.....	37
* APOBEC3G y controladores.....	39
JUSTIFICACIÓN.....	40

HIPÓTESIS	41
OBJETIVOS.....	42
OBJETIVO GENERAL.....	42
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
MATERIALES Y MÉTODOS.....	43
POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	43
DESCONGELACIÓN DE CÉLULAS.....	44
EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR.....	44
ESTIMULACIÓN CELULAR.....	45
EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLÉICOS.....	46
CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLÉICOS.....	47
SÍNTESIS DE ADN COMPLEMENTARIO.....	47
DETECCIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA.....	49
CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA	54
AMPLIFICACIÓN DEL GEN DE LA PROTEÍNA ACCESORIA VIF.....	56
SECUENCIACIÓN DEL GEN DE LA PROTEÍNA ACCESORIA VIF	58
ANÁLISIS DE HIPERMUTACIÓN EN EL GEN VIF	61
CUANTIFICACIÓN DE CARGA PROVIRAL	61
DETERMINACIÓN DE LA PRESIÓN DE SELECCIÓN EVOLUTIVA EJERCIDA POR APOBECE3G EN EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA.....	64
RESULTADOS	66
CARACTERÍSTICAS DE LA COHORTE	66
CUANTIFICACIÓN DE ADN PROVIRAL	68
ANÁLISIS DE HIPERMUTACIÓN DEL FACTOR DE INFECTIVIDAD VIRAL.....	71
ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE LOS GENES APOBEC3.....	75
DETERMINACIÓN DE LA PRESIÓN DE SELECCIÓN EVOLUTIVA EN EL GEN <i>VIF</i> . ANÁLISIS POR MODELOS DE SUSTITUCIONES SINÓNIMAS Y NO SINÓNIMAS.....	78
DISCUSIÓN	85
CONCLUSIONES	93
BIBLIOGRAFÍA	94
ANEXO	103

LISTADO DE ABREVIATURAS

A3A	APOBEC3A, citidina deaminasa
A3B	APOBEC3B, citidina deaminasa
A3C	APOBEC3C, citidina deaminasa
A3D	APOBEC3D, citidina deaminasa
A3F	APOBEC3F, citidina deaminasa
A3G	APOBEC3G, citidina deaminasa
A3H	APOBEC3H, citidina deaminasa
ADNc	Ácido desoxiribonucleico complementario
APOBEC3	Complejo de edición similar al polipéptido catalítico de la enzima editora del ARNm de la apolipoproteína B-3
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
CA	Cápside
CCR5	Quimiocina receptora C-C tipo 5
CD4	Cúmulo de diferenciación 4
CD8	Cúmulo de diferenciación 8
CDC	Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos
CENSIDA	Centro Nacional para la Prevención y el Control del VIH y el SIDA
CIENI	Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas
CPA	Célula presentadora de antígeno
CT	Controlador
Ct	Ciclo umbral
CTLs	Linfocitos T citotóxicos
CXCR4	Quimiocina receptora C-X-C tipo 4
DCs	Células Dendríticas
dS	Sustituciones sinónimas
dNS	Sustituciones no sinónimas
dNTPs	Di nucleótidos trifosfato
dPCR	PCR digital

DS	Donadores sanos
Gag	Ántígeno grupo-específico
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
IFN	Interferón
IN	Integrasa
INER	Instituto Nacional en Enfermedades Respiratorias
LTR	Repeticiones terminales largas
MA	Matriz
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad, en inglés
NC	Nucleocápside
Nef	Factor negativo
NK	Células citolíticas naturales (Natural Killer)
PBMCs	Células mononucleares de sangre periferica, en inglés
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PIC	Complejo de pre-integración
Pol	Polimerasa
PR	Proteasa
PT	Progresor típico
RT	Retrotranscriptasa
qPCR	PCR en tiempo real
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Humana
STA	Amplificación de un blanco específico (Single Target Amplification)
TARGA	Tratamiento antirretroviral de gran actividad
Tat	Transactivador transcricional
Tm	Temperatura de fusión
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
TRIM5a	Motivo tripartita contenedor de 5a
UNAIDS	Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/sida, en inglés
Vif	Factor de Infectividad Viral
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
VIS	Virus de la Inmunodeficiencia Simia
Vpr	Proteína viral r
Vpu	Proteína viral u

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estimación mundial de adultos y niños que viven con VIH en el año 2012.	11
Figura 2. Virus de la inmunodeficiencia humana.....	13
Figura 3. Organización genómica del Virus de la Inmunodeficiencia Humana y los productos de la expresión de sus genes.	15
Figura 4. Ciclo de replicación del VIH: Entrada del virus y establecimiento del provirus.	20
Figura 5. Ciclo de replicación del VIH: Síntesis de proteínas virales y ensamblaje de viriones.	22
Figura 6. Evolución clínica de la enfermedad por VIH.	24
Figura 7. Progreso de la infección por VIH-1 en pacientes controladores.	26
Figura 8. Estructura cristalina de APOBEC3G.	37
Figura 9. Modelo de restricción del VIH-1 mediada por APOBEC3G.	38
Figura 10. Mecanismo de desaminación de APOBEC3G.	39
Figura 11. Válvulas NanoFlex®	50
Figura 12. Gráfico de amplificación en tiempo real de APOBEC3G.	55
Figura 13. Detección de los productos de amplificación.	58
Figura 14. Carga viral y Linfocitos T CD4 ⁺ de las cohortes estudiadas.	67
Figura 15. Correlación entre el recuento de linfocitos T CD4 ⁺ periféricos y cargas virales de los pacientes en estudio.	68
Figura 16. Carga proviral en las poblaciones estudiadas.	69
Figura 17. Carga proviral y su relación con las características clínicas de las cohortes, la expresión basal de APOBEC3G y el número de mutaciones G ⇌ A.	70
Figura 18. Posición relativa de las mutaciones identificadas en cada secuencia proviral del gen vif de pacientes controladores y progresores.	73
Figura 19. Cambios G ⇌A en CTs y PTs y su relación con la carga viral.	74
Figura 20. Correlación entre el número de mutaciones G ⇌A y el recuento de linfocitos T CD4 ⁺ periféricos.....	75
Figura 21. Expresión basal de A3G en CT, PT y DS y su relación con la carga viral.....	76
Figura 22. Cuantificación de la expresión génica de la familia APOBEC3.....	77
Figura 23. Sitios de Interacción y Cambios Sinónimos y no Sinónimos en la proteína Vif.	84
Figura A1. Cuantificación de carga viral por PCR en tiempo real.	104

RESUMEN

La tasa mundial de infección por VIH-1 ha aumentado considerablemente en los últimos años, actualmente se sabe que 35.3 millones de personas viven con VIH/SIDA y a pesar de los grandes adelantos en la investigación relacionada con la infección y los conocimientos obtenidos de la misma en los campos de la patogénesis viral, la biología del virus, la respuesta inmunológica contra VIH-1, así como el desarrollo de nuevos fármacos antirretrovirales y el estudio de posibles vacunas, aún no existe una cura o vacuna contra la infección.

En los últimos años se han desarrollado nuevas líneas de investigación relacionadas con el estudio de los factores de restricción o mecanismos naturales dentro de la célula que pueden limitar la replicación del VIH-1. El factor celular más promisorio caracterizado por su acción antirretroviral en la replicación del VIH-1 es la enzima citidina deaminasa APOBEC3G (A3G).

Estudios previos revelan que las personas infectadas con VIH-1 con una lenta progresión a SIDA en ausencia de tratamiento antirretroviral, presentan un aumento significativo en la cantidad de ARNm de APOBEC3G con respecto al resto de los individuos infectados en diferentes etapas de la infección, donde la expresión de la proteína está relacionada con la exposición al virus y se encuentra aumentada en etapas tempranas de la enfermedad.

El presente trabajo contribuye al esclarecimiento del papel de la proteína APOBEC3G en la regulación de la replicación del virus de la inmunodeficiencia humana en cohortes mexicanas, principalmente en individuos con lenta progresión a SIDA, denominados controladores (CTs). Se analizó el papel del factor de restricción APOBEC3G en la limitación de la replicación viral y la protección ante el VIH-1 mediante el estudio de diferentes atributos de la proteína, como su expresión, actividad de hipermutación, su relación con la carga proviral y la presión evolutiva ejercida en el genoma viral de dos cohortes de pacientes:

controladores (n=9), pacientes con una progresión típica de la infección (PTs; n=8) y empleando como control negativo individuos sanos (DS; n=5).

Al analizar la expresión de la familia de citidina deaminasas APOBEC3 se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en la expresión de los transcritos de las proteínas de la familia en los grupos controladores y progresores típicos donde APOBEC3A (A3A) y APOBEC3B incrementaron su expresión bajo la influencia de RNA40 y A3A con RNA41, asimismo se encontró que los pacientes controladores presentan una mayor tasa de cambios G→A dentro de un contexto de APOBEC3F/G, así como menor carga proviral que los pacientes progresores. Del mismo modo, la cantidad de codones seleccionados positiva y negativamente en la proteína viral Vif, sugieren una presión evolutiva de la enzima APOBEC3G en el VIH-1.

ANTECEDENTES

DESCUBRIMIENTO

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es el agente etiológico del síndrome de inmunodeficiencia adquirida o SIDA. El SIDA fue reconocido clínicamente en 1981; sin embargo, el primer caso conocido se remonta hasta 1959.

A finales de los 70's e inicio de los 80's diversos pacientes de Estados Unidos y Europa presentaron un síndrome caracterizado por linfadenopatía generalizada, infecciones oportunistas y una variedad de cánceres inusuales. Un hallazgo común en los estudios de laboratorio de dichos pacientes fue una marcada disminución de linfocitos T CD4⁺ en sangre periférica. Dicho síndrome se observaba inicialmente en hombres homosexuales y usuarios de drogas intravenosas. Posteriormente se observó en otros grupos como hemofílicos, receptores de transfusiones sanguíneas y parejas sexuales o hijos de miembros de varios grupos de riesgo. Este patrón epidemiológico sugirió que la nueva enfermedad era transmitida por un nuevo patógeno en sangre contaminada o después de relaciones sexuales con un individuo infectado. ¹

En 1983, Barré-Sinoussi, Montagnier y colegas en el Instituto Pasteur, reportaron el aislamiento de un agente con actividad de transcriptasa reversa de los nódulos linfáticos de un individuo con linfadenopatía persistente generalizada. Durante su replicación en cultivos celulares se observó una alta patogenicidad en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs), principalmente para los linfocitos T CD4⁺.² Posteriormente, en 1984, Gallo y colaboradores en el Instituto Nacional de la Salud de los EUA reportaron el aislamiento de un retrovirus de un paciente con SIDA. Fue hasta 1986 que el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) recomendó renombrar al agente causal del SIDA: Virus de la Inmunodeficiencia Humana.³

PANORAMA EPIDEMIOLÓGICO DEL VIH/SIDA

Hasta el 2012 la Organización Mundial de la Salud registró a nivel mundial 35.3 millones de personas viviendo con VIH/SIDA (Figura 1), de los cuales 32 millones corresponden a la población adulta, 1.5 millones a población latinoamericana, y donde un 49.1 % representa a la población de sexo femenino. Ese mismo año se registraron 1.6 millones de muertes en el mundo a causa del SIDA y se estima que alrededor de 7000 personas son infectadas diariamente.⁴



Figura 1. Estimación mundial de adultos y niños que viven con VIH en el año 2012. Imagen modificada de UNAIDS, fact sheets. (www.unaids.org)

En México, el Centro Nacional para la Prevención y el Control del VIH-1 y el SIDA (CENSIDA) registra al 30 de junio del 2013 un total de 179,478 personas viviendo con VIH, y 164,422 casos acumulados de SIDA, en los que la proporción masculina resulta más afectada con 73.6% y 82.1% hombres infectados respectivamente, mientras que el número de defunciones por SIDA en el 2012 correspondía a 4,737 personas.⁵

Si bien el número de nuevas infecciones y decesos sigue descendiendo globalmente, algunas epidemias nacionales continúan extendiéndose en diversas

partes del mundo, para México, las tendencias epidemiológicas son favorables: De acuerdo a las estimaciones realizadas por UNAIDS⁶, la infección por el VIH-1 en adultos entre 15 y 49 años ha disminuido un 26-49% desde el 2001.

BIOLOGÍA DEL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA

CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA.

El Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) es un miembro de la familia *Retroviridae* perteneciente al género *Lentivirus*. Existen dos principales especies, el virus tipo I (VIH-I) y el tipo II (VIH-II). El virus tipo I es el principal responsable de la pandemia de SIDA, mientras que VIH-II es menos patogénico y su distribución geográfica es limitada. Ambas especies están relacionadas con el virus de inmunodeficiencia en primates. Chimpancés y algunos monos del viejo mundo son los hospederos naturales de estos lentivirus (VIS), y se ha sugerido que ambas epidemias son el resultado de transmisiones del simio al humano.

Con base en el genoma viral completo, el VIH-1 se subdivide en tres grupos genéticos, llamados M (principal), O (extremo) y N (no M u O), por su significado en inglés. El grupo M se divide en 9 subtipos (o clados): A, B, C, D, F, G, H, J, y K. Se han identificado algunos subtipos para el grupo O y muy pocos para el grupo N. La epidemia inicial a principios de los 80's en Norte América y Europa fue causada por el VIH-1 subtipo B, actualmente el subtipo C domina la epidemia mundial, aunque el subtipo B mantiene su predominancia en los Estados Unidos, México, Europa y Australia.⁷

ESTRUCTURA.

Las partículas virales maduras tienen un diámetro de 100 a 150nm y como otros miembros de la familia, es un virus envuelto. La superficie del virión es una bicapa lipídica adquirida por el virus al gemar de la célula infectada y contiene espículas compuestas por la proteína transmembranal gp41 y la proteína de superficie gp120 que interaccionan por medio de puentes disulfuro para la formación de una estructura de carácter trimérico; ambas proteínas son el resultado del

procesamiento de la proteína precursora Env. A continuación se encuentra la matriz, compuesta de la proteína p17 que sujeta la cara interna de la membrana lipídica, proporcionando estabilidad. Dentro de la matriz, la proteína p24 forma una estructura cónica o cápside que contiene el material genético viral: dos cadenas simples positivas de ARN cubiertas casi en su totalidad de la proteína de nucleocápside (NC), así como las enzimas proteasa (PR), integrasa (IN), reverso transcriptasa (RT) y ARN de transferencia derivado del hospedero que funciona como iniciador en la replicación viral (Figura 2).^{8,9}

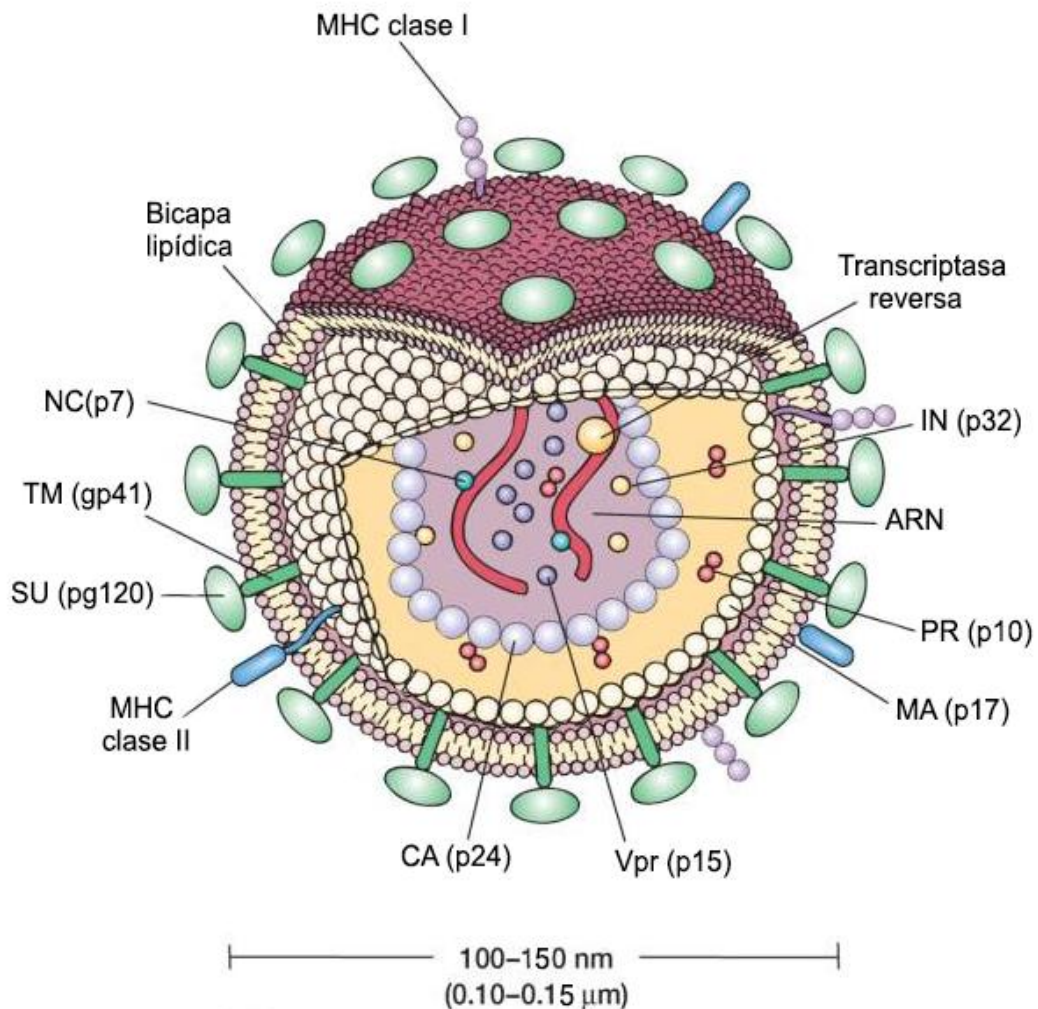


Figura 2. Virus de la inmunodeficiencia humana. El VIH-1 es un virus envuelto, además de espículas, la membrana lipídica puede contener proteínas del hospedero como moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I y clase II, así como proteínas de adhesión que pueden facilitar la infección de nuevas células. Imagen modificada de Prescott et. al., Microbiology, Mc Graw-Hill, 2002.⁸

ORGANIZACIÓN GENÓMICA.

El VIH-1 es un virus que presenta una amplia variabilidad genética como resultado de baja fidelidad de la enzima reverso transcriptasa pues ocurren cerca de 3×10^5 mutaciones/ciclo de replicación, asimismo la alta tasa de recombinación genética y la elevada capacidad replicativa del virus *in vivo* (10^9 partículas virales/día) contribuyen a su rápida evolución y gran variabilidad genética.^{1,9,10}

El genoma del Virus de la Inmunodeficiencia Humana tiene una longitud de aproximadamente 10 Kb, se encuentra flanqueado por repeticiones terminales largas o LTRs y codifica 9 proteínas distintas.¹¹ El transcrito primario del VIH-1 es un ARNm con tres principales genes: *gag* (del inglés group-specific antigen), *pol* (polimerasa) y *env* (envoltura) que codifican poliproteínas cuyos productos son factores estructurales y enzimáticos clásicos, requeridos por todos los retrovirus. La poliproteína Pol (pr160) es auto escindida en su región PR para dar origen a las enzimas virales reverso transcriptasa (RT), proteasa (PR; p10) e integrasa (IN; p32). Por medio de escisión proteolítica, el precursor Gag (pr55) da lugar a proteínas más pequeñas, como CA (p24), MA (p17), NC (p7) y p6. La glicoproteína de superficie (SU) gp120 y la glicoproteína transmembranal (TM) gp41 de la envoltura se producen del precursor Env (gp160), que es un mensajero único cuyo corte proteolítico es llevado a cabo por la furina, una endoproteasa (Figura 3).¹²

Asimismo, el VIH-1 codifica dos proteínas reguladoras, el transactivador transcripcional (Tat; p14) y el regulador de la expresión genética viral (Rev; p19). En último lugar, el virus contiene cuatro genes que codifican para proteínas accesorias: el factor negativo (Nef; p27), el factor de infectividad viral (Vif; p23) y las proteínas virales r (Vpr; p15) y u (Vpu; p16).¹¹

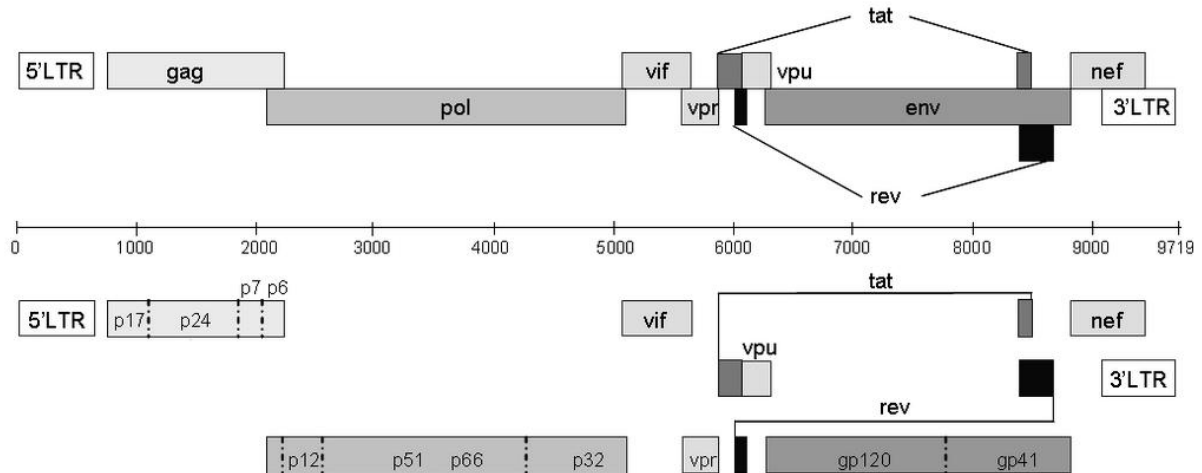


Figura 3. Organización genómica del Virus de la Inmunodeficiencia Humana y los productos de la expresión de sus genes. El VIH-1 posee un genoma de ARN flanqueado por dos repeticiones terminales largas (LTRs) involucradas en la integración y la regulación de la transcripción del genoma viral. Las secuencias codificadoras de algunos genes (*tat* y *rev*) están separadas en el genoma y requieren procesamiento del ARN para producir ARNm funcional. Adaptado de IMGT®, the international ImMunoGeneTics information system®, E. Gemrot, 2008.¹³

PROTEÍNAS VIRALES Y SUS FUNCIONES.

Proteínas Estructurales

Gag: Proteína de 55 kD (también llamada pr55 con base a los kD de peso), es codificada por el gen *gag* (antígeno grupo-específico). Es un precursor que al ser procesado por la proteasa viral (un producto del gen *pol*) durante el proceso de maduración viral, da origen a la proteína de matriz p17 (MA), a la proteína de cápside p24 (CA), a la proteína de nucleocápside p7 (NC), y a la proteínas p6.

En el virión maduro p24 forma la cápside, la cual es una estructura distintiva de cada miembro de la familia Retroviridae.

El dominio carboxilo terminal corresponde a la nucleocápside (p7), una proteína con al menos un motivo de dedos de zinc tipo CCHC, indispensable para el empaquetamiento del ARN viral en las nuevas partículas. Las propiedades

altamente básicas de esta proteína le permiten una unión no específica al genoma viral, por lo que participa en diversas etapas del ciclo de replicación como la ubicación del iniciador de ARNt y la formación del ARN dimérico a una forma más compacta y termoestable.¹⁴

Pol. Es codificada por la región genómica *pol* y es precursor de las enzimas virales proteasa (PR), reverso transcriptasa (RT) e integrasa (IN) (Figura 3). El precursor principal: la poliproteína Gag-Pol es producida por un desplazamiento de ribosoma en un motivo cercano al extremo 3' de *gag*, (que ocasiona el cambio al marco de lectura del gen *pol* sin interrupción alguna) y es procesada por la proteasa viral.

La p10 (PR) es una aspartil proteasa¹⁵ que actúa como un dímero, su actividad es requerida para escisión del precursor Gag-Pol, es responsable del procesamiento de los polipéptidos durante la salida de los viriones de la célula y de completar el proceso de maduración viral. La p50 (RT) es una enzima multifuncional compuesta por dos subunidades: p66 y p51 (Figura 3),¹⁶ posee actividad dependiente de ARN al sintetizar ADN de doble cadena a partir del ARN viral, actividad de polimerasa dependiente de ADN y actividad de RNasa H para degradar el ARN posterior a la transcripción reversa.¹⁷ La p32 (IN) cataliza la integración de ADN viral en el cromosoma del hospedero por medio de sus funciones de exonucleasa para la escisión de dos nucleótidos terminales del extremo 3' del ADN viral, actividad de endonucleasa de doble cadena para cortar el ADN del hospedero y actividad de ligasa para la unión covalente de los extremos del ADN proviral con el ADN de la célula hospedera.^{1,18}

Env. La proteína gp160 es codificada por el gen *env*, una proteasa celular escinde a gp160 para producir a gp41, el dominio transmembranal de Env y gp120, el dominio de superficie, ambos localizados en la superficie de la célula infectada, los dominios específicos de gp120 son esenciales para la interacción con el receptor CD4 en la célula hospedera.¹⁹

Proteínas Reguladoras

Tat. El transactivador transcripcional (Tat) es esencial para la replicación del VIH-1: promueve la fase de elongación en la transcripción viral para favorecer la producción de transcritos completos.²⁰

Rev. Proteína de 13 kD, induce la transición de la fase temprana a la fase tardía de la expresión genética del VIH-1 y favorece la exportación de ARN viral del núcleo al citoplasma.²¹

Proteínas Accesorias

Nef. El factor negativo es una proteína de 25 kD, posee funciones múltiples como la disminución de la expresión de las moléculas de superficie CD4 y MHC de clase I evitando el reconocimiento de las células infectadas por el sistema inmune, alteración de la activación de las células T y la estimulación de la infectividad viral.²²

Vpr. La proteína Vpr de 14 kD, es incorporada en las partículas virales, juega un papel en la habilidad del VIH-1 para infectar células en reposo, bloqueo de la división celular por un arresto en la fase G2 del ciclo celular,²³ estimular expresión genética e inducir apoptosis.²⁴

Vpu. La proteína viral U, es una fosfoproteína de 16 kD localizada en la membrana interna de la célula, sus funciones son inducir la degradación de CD4 y favorecer la liberación de viriones de una célula infectada al interferir con la actividad de la proteína celular teterina, la cual evita la liberación de los viriones al funcionar como un puente entre la membrana viral y la membrana celular.²⁵

Vif. El factor de infectividad viral es un polipéptido citoplasmático de 23 kD, se ha observado que viriones mutantes en esta proteína presentan defectos en su habilidad para la síntesis de ADN viral.²⁶ Contrarresta la actividad antiviral de APOBEC3F y APOBEC3G, (factores de restricción presentes en células humanas); Vif forma un complejo con estas enzimas para evitar su entrada a la

progenie viral e inhibir su actividad de hipermutación. De la misma forma, recluta el complejo E3 de ubiquitina ligasas compuesto por la elonguina BC, CUL5, y RXB2 para inducir la poliubiquitinación y degradación de APOBEC3G y APOBEC3F.²⁷

CICLO DE REPLICACIÓN.

El VIH-1 entra al organismo mediante el intercambio de fluidos corporales, e ingresa a las células por medio de fusión y endocitosis; sin embargo, la infección productiva solo ocurre después de la fusión.²⁸ La fusión se lleva a cabo entre la proteína trimérica de superficie, gp120 del VIH-1 y el cúmulo de diferenciación 4 (CD4) presente en los linfocitos T CD4⁺, macrófagos y células dendríticas (CDs). El tropismo es determinado por el receptor de entrada del virus, pues emplea la molécula CD4 como receptor primario y moléculas co-receptoras cepa y blanco específicas. La cepa R5 del VIH-1 usa la quimiocina receptora C-C tipo 5 (CCR5) como co-receptor por lo que puede infectar macrófagos, células dendríticas y células T, mientras que la cepa X4 del VIH-1 emplea la quimiocina receptora C-X-C tipo 4 (CXCR4) como co-receptora y puede infectar únicamente a células T.¹¹

Estos receptores de quimiocinas se localizan en las balsas lipídicas de la membrana plasmática, tales microdominios facilitan la fusión del virus a la célula del hospedero a la membrana lipídica del virus y ofrecen un ambiente óptimo para la fusión.²⁹ La interacción entre gp120, CD4 y los co-receptores ocasiona un cambio conformacional en gp41, para la exposición de un dominio de fusión que se ancla a la bicapa lipídica de la célula blanco, logrando la fusión del virión con la membrana celular y la liberación de la nucleocápside viral al interior de la célula.

Una vez dentro de la célula, se lleva a cabo el desnudamiento del virus, un proceso que involucra la fosforilación de la matriz (MA) mediada por las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAP), ciclofilina A, y las proteínas virales Nef (por su asociación con la bomba de protones V-ATPasa para la inducción de un cambio local en el pH) y Vif. Cuando el desnudamiento termina, el complejo de transcripción reversa viral se forma, este complejo comprende: el genoma viral de

ARN diploide, el primer ARN^{t^{Lys}}, la enzima transcriptasa reversa, la integrasa, la proteína MA, NC, Vpr y diversas proteínas del hospedero, todos estabilizados por Vif. Una vez conformado el complejo, es liberado de la membrana plasmática para anclarse a los microfilamentos de actina, acción mediada por la proteína MA fosforilada.

La transcripción reversa ocurre bajo la acción de la RT que emplea el extremo 3' del primer ARN^t para la síntesis de la cadena negativa del ADN, el ARN del heterodúplex ARN-ADN es digerido por la actividad RNasa H de la RT y posteriormente la actividad ADN polimerasa completa el ADN de doble cadena.

En el momento que la transcripción reversa concluye, se forma el complejo de pre integración (PIC) que se compone de ADN^c viral de doble cadena, IN, MA, Vpr, RT y las proteínas de alta movilidad de unión a ADN: HMGI (Y). El radio de dicho complejo es de 28 nm y se ancla a microtúbulos para su transporte al núcleo. En el interior del núcleo el PIC se somete a cuatro destinos distintos y solo uno de ellos establece el provirus funcional: la integración del ADN viral de doble cadena en el cromosoma del hospedero es mediada por la integrasa (IN), que remueve nucleótidos de los extremos del ADN viral con bordes desiguales generados por la actividad de la RT. Asimismo, IN cataliza la inserción del VIH-1 proviral en el cromosoma. De forma alternativa, el ADN viral puede someterse a una auto-integración resultando en una estructura circular, recombinarse homológamente produciendo una estructura circular con un LTR único o en un círculo con dos LTRs, ninguna de estas formas circulares es capaz de producir formas infecciosas (Figura 4).²⁸

El provirus del VIH-1 puede integrarse en muchos sitios del cromosoma, por lo que puede conducir a formas de infección latentes o transcripcionalmente activas, dentro de estas últimas, el LTR 5' proviral funciona como cualquier unidad transcripcional eucariota: contiene elementos promotores río abajo y río arriba, que incluyen un iniciador, una caja TATA y tres sitios Sp1. Estas regiones ayudan a posicionar a la ARN polimerasa II (RNAPII) en el sitio de iniciación de la

transcripción y formar el complejo de pre iniciación. La transcripción es favorecida por el elemento de respuesta de transactivación, TAR que proporciona estabilidad a los transcritos recién sintetizados.³⁰ El reclutamiento de factores transcripcionales como NF- κ B, NFAT y algunos miembros de la familia ETS, se atribuyen al potenciador transcripcional río arriba del promotor.³¹

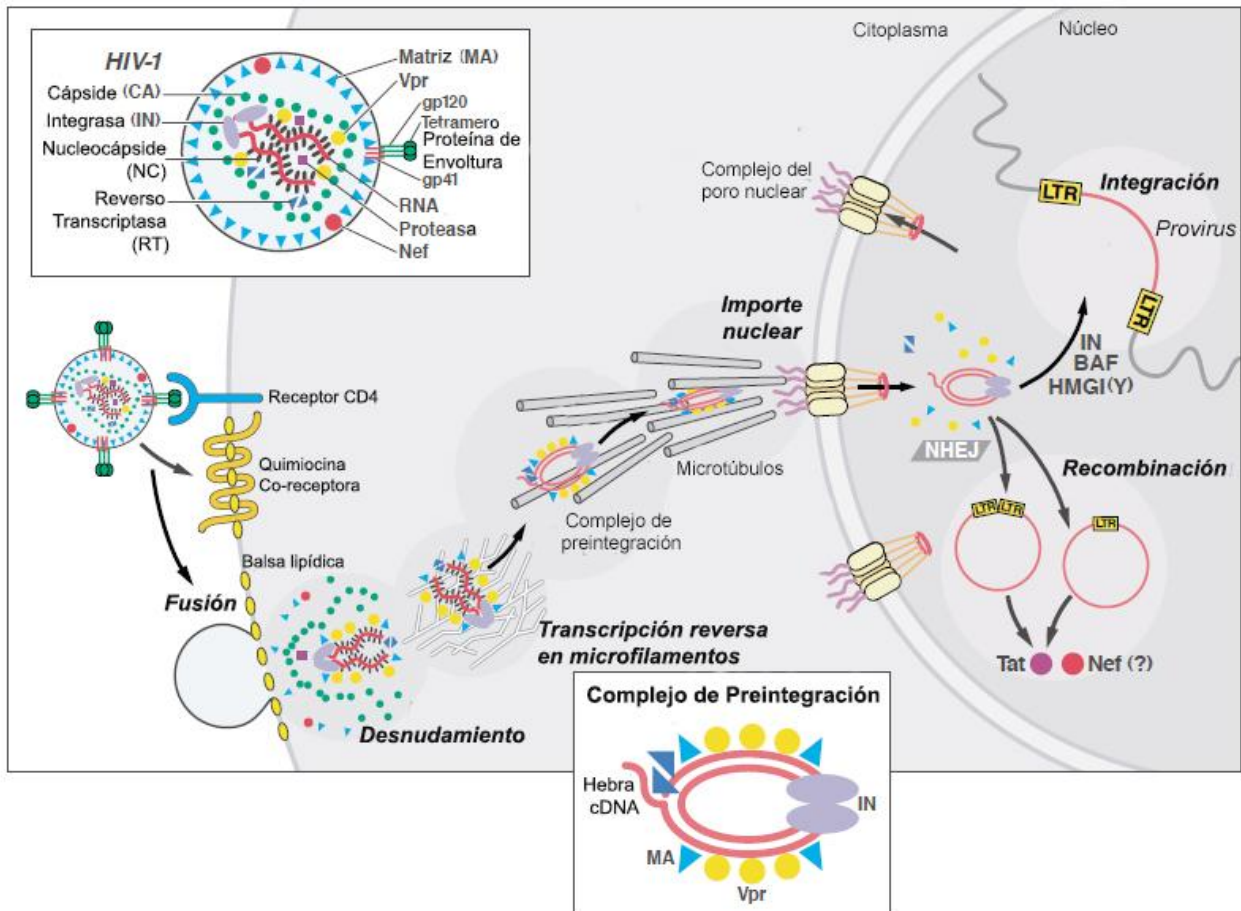


Figura 4. Ciclo de replicación del VIH: Entrada del virus y establecimiento del provirus. Se muestra la fusión del virus mediada por las interacciones entre gp120, CD4 y el receptor de quimiocinas correspondiente (CCR5 o CXCR4) dando lugar a la fusión mediada por gp41; seguido del desnudamiento del virión, la retrotranscripción del genoma viral, formación del complejo de preintegración (PIC), importe nuclear del complejo de pre integración y el establecimiento del provirus. Adaptado de Greene, W. C. & Peterlin, B. M. Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy. *Nature Medicine*, 8, 673–680 (2002).

El aumento en la expresión genética viral ocurre por la participación de Tat, que al asociarse con TAR, incorporan los elementos necesarios para que la RNAPII realice la transición de iniciación a elongación en la transcripción.³²

Al finalizar la transcripción del genoma viral los transcritos que codificarán para proteínas estructurales, enzimáticas, accesorias y ARN viral son transportados al citoplasma para su traducción y posterior ensamble de los viriones, su transporte depende de Rev, una proteína que se ancla al elemento de respuesta a Rev (RRE) en el gen *env* del ARN.³³ Por otra parte, Nef optimiza el ambiente de la célula infectada para favorecer la replicación viral a través de alteración de cascadas de señalización, entre ellas la activación y disminución de la expresión del receptor CD4 en la superficie celular de los linfocitos T.³⁴ Asimismo promueve la producción y liberación de viriones infecciosos, afecta la respuesta inmune al VIH-1 e inhibe apoptosis, prolongando así la vida de la célula hospedera y optimizando la replicación viral.

Por otro lado, la expresión de Vpr dependiente de Rev induce la detención de células proliferantes infectadas en la fase G2/M del ciclo celular, beneficiando así, la expresión genética viral pues el LTR viral es más activo durante esta fase.³⁵

Las nuevas partículas virales son ensambladas en la membrana plasmática (Figura 5), cada virión consiste de aproximadamente 1500 moléculas de la poliproteína Gag y 100 de Gag-Pol,³⁶ dos copias del ARN viral y Vpr. La proteína de unión a ATP, HP68, actúa como chaperona, facilitando los cambios conformacionales necesarios en Gag para el ensamblaje de la cápside viral.³⁷ La proteína Vif juega un papel importante en la infectividad de los viriones producidos, se ha observado que los viriones que carecen de tal proteína son no infecciosos, y muestran alteraciones a nivel de la transcripción reversa en la siguiente célula infectada, pues Vif aniquila el efecto de un inhibidor natural de la replicación del VIH-1, el factor celular APOBEC3G.³⁸

Para la gemación o liberación del virus la poliproteína Gag se somete a miristilación³⁹ para su asociación con las balsas lipídicas, microdominios

membranales ricos en colesterol o glicolípidos, que favorecen la liberación, estabilidad y fusión de los viriones en la siguiente célula infectada.²⁹

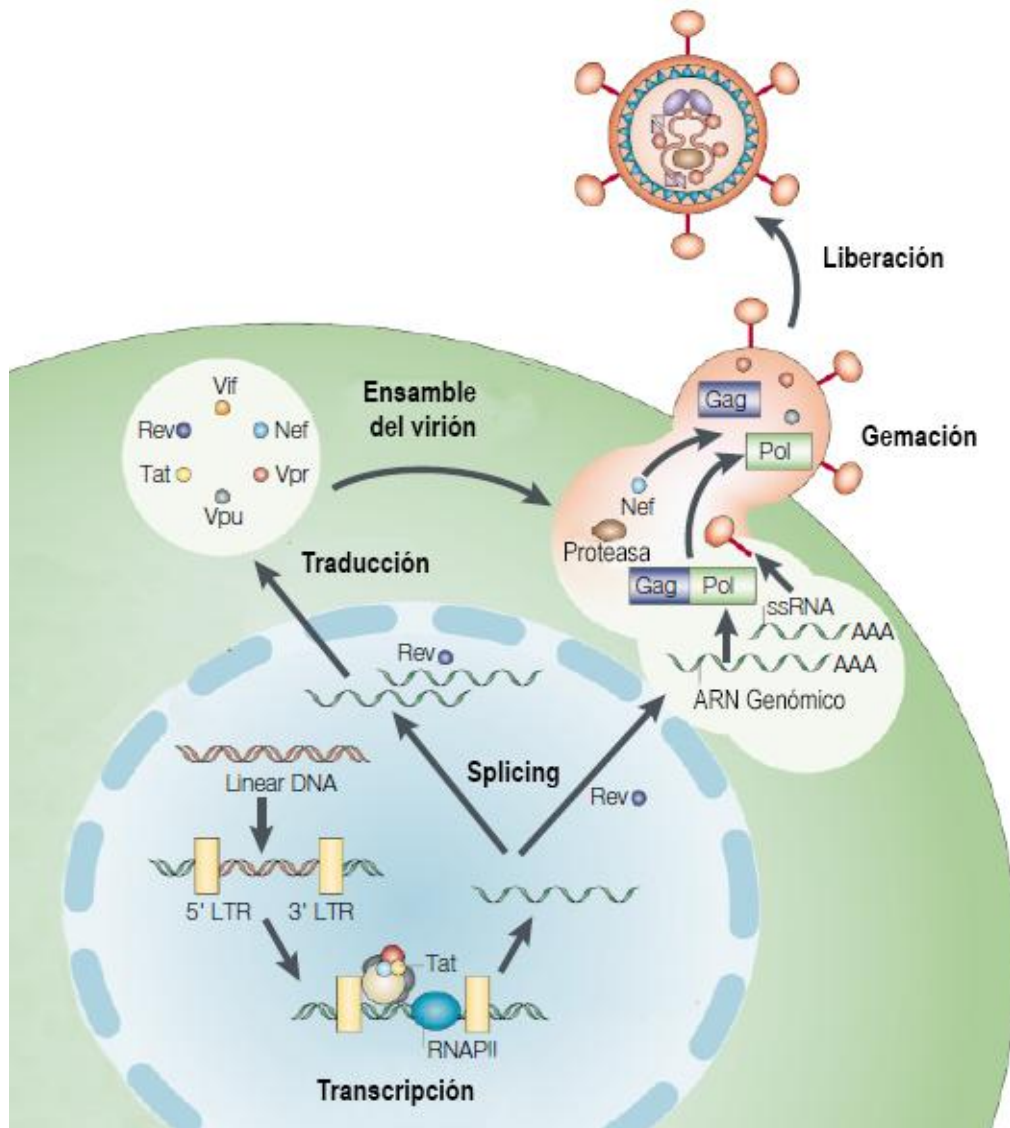


Figura 5. Ciclo de replicación del VIH: Síntesis de proteínas virales y ensamblaje de viriones. Al inicio de la transcripción se generan las proteínas reguladoras y accesorias, seguidas de las proteínas estructurales y el genoma de ARN viral que formarán parte de la progenie viral. El ensamblaje de las nuevas partículas virales ocurre en la membrana plasmática, las partículas son liberadas por gemación, adquiriendo así su envoltura de la membrana del hospedero. Adaptado de Peterlin M., & Trono D., Hide, shield and strike back: How HIV-infected cells avoid immune eradication, *Nature Reviews*, 3, 97-107 (2003).

HISTORIA NATURAL DE LA ENFERMEDAD

La transmisión sexual del virus de la inmunodeficiencia humana, en su forma libre o asociada a células por medio de semen o mucosas, representa la principal ruta de infección del virus, otras vías como el contagio por el uso de drogas intravenosas, la transfusión de sangre infectada o la exposición de un feto al virus de una madre infectada son menos comunes.

La historia natural de la infección por el VIH-1 puede dividirse en tres fases: un síndrome agudo, un periodo de latencia clínica y finalmente la progresión a SIDA, cada una de estas etapas se asocia con cambios específicos en parámetros tanto virológicos como inmunológicos.⁷

FASE AGUDA

Involucra los primeros eventos posteriores a la primoinfección, la habilidad del VIH-1 de establecer una infección productiva, se ve determinada por la disponibilidad de las células blanco CD4⁺ que expresen el correceptor de quimiocinas CCR5, y que puedan estar presentes en el sitio de entrada, como linfocitos T CD4⁺, células de Langerhans (LCs), células dendríticas (DCs), monocitos o macrófagos.

Una vez llevada a cabo la transmisión, en ausencia de terapia antirretroviral (TARV) y de una respuesta inmune específica al VIH, el virus se disemina rápidamente. Aproximadamente dos o cuatro semanas después, la mayoría de los individuos experimenta un síndrome agudo, caracterizado por manifestaciones clínicas similares a las presentes en una gripe, asociadas con una carga viral plasmática elevada y una disminución notable de linfocitos T CD4⁺ circulantes (Figura 6). Otros síntomas comprenden mialgias, exantema, dolor de cabeza, anorexia y diarrea, con severidades altamente variables.⁷ En esta etapa el virus posee una tasa de replicación elevada, logrando alcanzar niveles plasmáticos de hasta 100 millones de copias de ARN viral por mililitro de sangre.⁴⁰ La viremia aguda se acompaña de la activación de la respuesta inmune específica contra el

virus, en la que se producen anticuerpos anti-VIH-1 y se activan los linfocitos T citotóxicos para destruir las células infectadas. Esta respuesta reduce la carga viral y un aumento en el número de linfocitos T circulantes. Cuando es posible la detección de anticuerpos anti-VIH-1 en suero se dice que el paciente ha sufrido seroconversión.⁴¹ El punto en el que la viremia disminuye hasta alcanzar un nivel constante se denomina “set point” viral, el cual sirve como indicador de la progresión de la enfermedad (Figura 6).⁴²

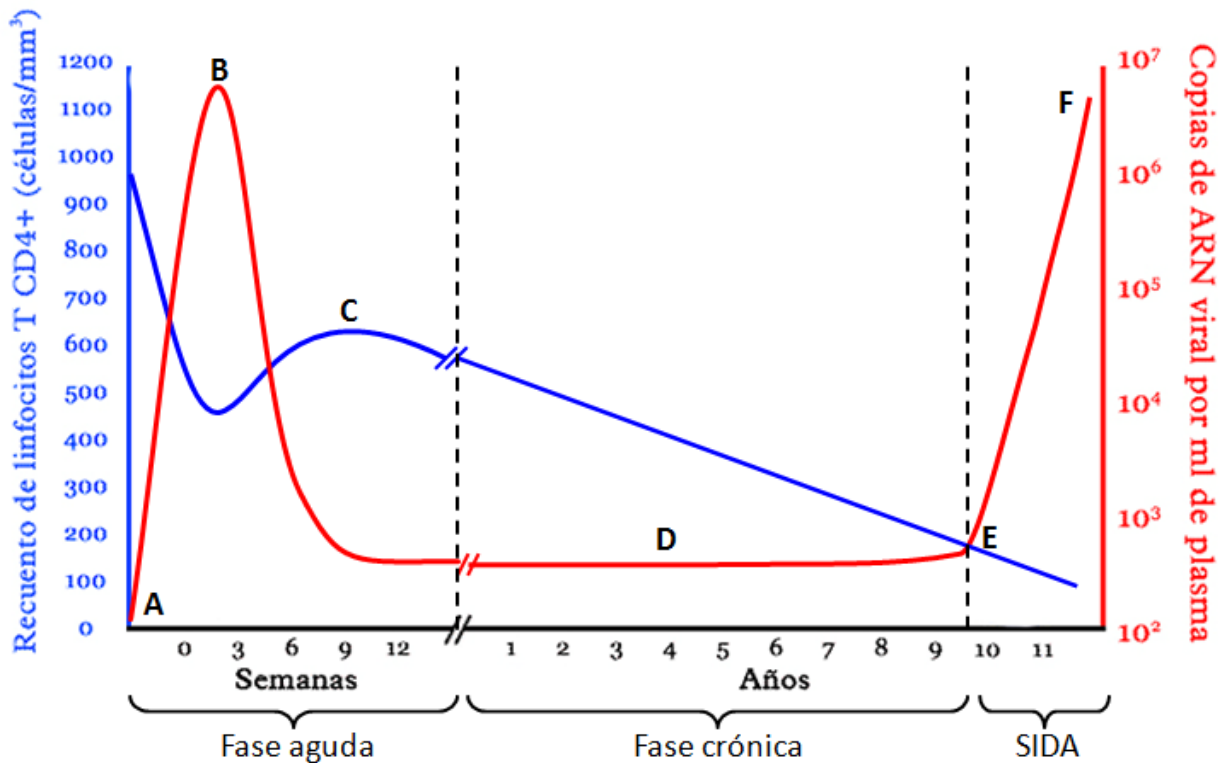


Figura 6. Evolución clínica de la enfermedad por VIH. **A.** Infección primaria. **B.** síndrome agudo, existe una diseminación rápida y generalizada del virus, muerte de linfocitos T CD4⁺ de memoria, la infección se establece en tejidos linfáticos y un cuadro clínico con síntomas similares a gripe. **C.** Seroconversión: producción de anticuerpos específicos anti-VIH, y recuperación parcial de los niveles plasmáticos de linfocitos T CD4⁺. **D.** La carga viral residual permanece constante en un parámetro conocido como “set point”, los niveles de linfocitos T CD4⁺ disminuyen gradualmente. **E.** Cuando el nivel de células T circulantes disminuyen hasta un nivel crítico (200 células/mm³) el sistema inmune sucumbe ante infecciones oportunistas y enfermedades neoplásicas que caracterizan al síndrome de la inmunodeficiencia humana. **F.** Muerte

FASE CRÓNICA

Es el tiempo que transcurre desde la infección hasta el desarrollo de SIDA, denominado también periodo de latencia clínica, en este periodo el número de linfocitos T CD4⁺ disminuye lentamente y el virus continúa replicándose, no obstante, a un nivel relativamente estable. En órganos linfoides la replicación es mayor, y pueden detectarse títulos elevados. La duración de este periodo es variable, actualmente la tasa de progresión de la infección por VIH-1 se clasifica en los siguientes grupos:

- * Progresores típicos: representan a la mayoría de los individuos infectados (70-80%), evolucionan a SIDA en una mediana de tiempo de 7 a 10 años después de haber adquirido la infección por VIH-1.
- * Progresores rápidos (10-15%): presentan una disminución rápida de linfocitos T CD4⁺ y una progresión rápida a SIDA a pocos años después de haber adquirido la infección (<3 años).
- * Lentos progresores (5%): pueden permanecer asintomáticos por al menos 5 o incluso 10 años en ausencia de tratamiento antirretroviral. Algunos permanecen relativamente sanos sin cambios significativos en su recuento linfocitario y con respuestas inmunológicas fuertes, aún frente a cargas virales elevadas, en ausencia de tratamiento antirretroviral.^{43,44}

En la última clasificación se incluye también una serie de individuos denominados controladores, un grupo que representa alrededor de 2% de los pacientes infectados, caracterizado por no presentar una progresión de la enfermedad: poseen niveles de viremia plasmática bajos o indetectables (<2000 copias de ARN/mL de plasma)⁴⁵ y conteo de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ elevados o normales (500-1200 células/mm³), respuestas inmunes fuertes, y baja carga de ADN proviral (Figura 7).^{46,47} En otras palabras, muestran una infección viral persistente, la cual son capaces de controlar de forma natural en ausencia de terapia antirretroviral, comprende individuos que no han desarrollado SIDA por

más de 13 años y en algunos casos han permanecido asintomáticos hasta 23 años.⁴⁸ Hoy en día únicamente 1 de cada 300 personas infectadas es un controlador de VIH-1.⁴⁵

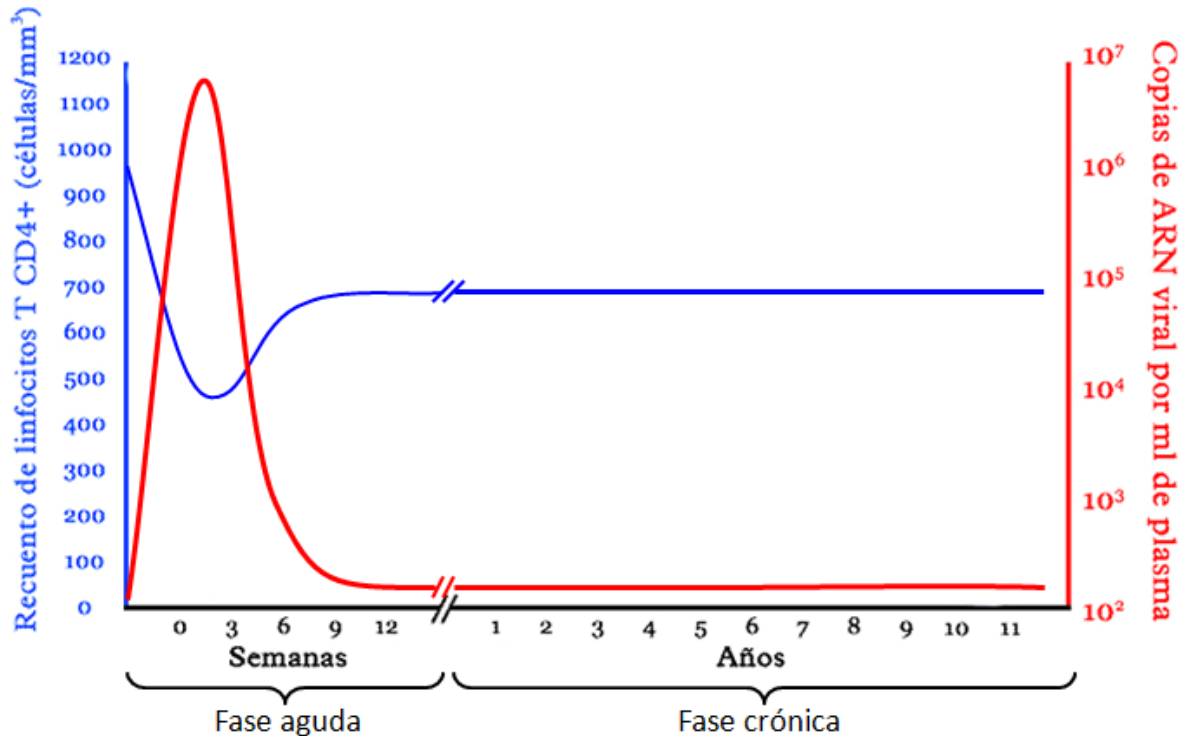


Figura 7. Progreso de la infección por VIH-1 en pacientes controladores. A diferencia de un progresor típico los individuos controladores son capaces de mantener los niveles de carga viral relativamente bajos con una respuesta inmune elevada, sin necesidad de terapia antirretroviral.

La definición de estos dos grupos aún no es clara y se usa no sólo el tiempo mencionado, sino éste combinado con el recuento de células CD4⁺ que generalmente se mantienen constantes (≥ 500 células/mm³) aunque en niveles por debajo de los normales y los niveles de carga viral, que generalmente son bajos (<10,000 copias/mL). Por esta razón, el aislamiento viral en los controladores es únicamente posible en 65% de los casos.³⁷.

ETAPA FINAL: SÍNDROME DE INMUNODEFICIENCIA ADQUIRIDA (SIDA)

La replicación continua del VIH-1, aunado a la eliminación de las células hospederas y una activación inmune crónica resulta, con el paso de los años, en el deterioro del sistema inmune. Esto ocasiona un descenso importante en la actividad citotóxica anti VIH-1, la depleción de células T CD4⁺ con una acumulación de linfocitos T CD4⁺ de memoria con provirus integrados, que funcionan como reservorios perdurables del virus. Esta destrucción del sistema inmune se manifiesta clínicamente por la presencia de infecciones oportunistas causadas por virus, bacterias, hongos y parásitos, complicaciones que a menudo son la causa de muerte del paciente con SIDA.⁷ Un parámetro empleado para el monitoreo de la infección es el conteo de CD4 en los pacientes, que de acuerdo con la CDC⁴⁹, debajo de 500 células/mm³ las infecciones oportunistas aparecen, principalmente tuberculosis, candidiasis oral, varicela zoster y herpes simplex. Cuando la cuenta es menor a 200 células/mm³, las complicaciones que ponen en riesgo la vida del paciente como neumonía por *Pneumocystis jirovecii*, histoplasmosis diseminada, encefalitis por toxoplasma, meningitis criptococcica, etc., son inminentes (Figura 6).⁵⁰

RESPUESTA INMUNOLÓGICA FRENTE AL VIH

La infección por el virus de la inmunodeficiencia humana conlleva a una pérdida gradual de la competencia inmune, permitiendo la infección con organismos que en condiciones ordinarias no son patogénicos.⁵¹ Después de la infección se producen respuestas inmunitarias humorales y celulares específicas del VIH-1, aunque generalmente la protección que proporcionan es escasa.⁵²

RESPUESTA INMUNE INNATA

El sistema inmune innato representa la primera línea de defensa contra organismos infecciosos, sus componentes responden rápidamente (en cuestión de horas o días) ante un patógeno y pueden actuar sin restricción del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), son capaces de discriminar entre el patrón conformacional de un patógeno y células del hospedero, además de contribuir a la

inducción de la respuesta inmune adaptativa. Esta respuesta se constituye de mecanismos de defensa celulares y bioquímicos.^{53,54}

El sistema inmune innato reconoce microorganismos entrantes vía patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) evolutivamente conservados y responde por medio de una señalización intracelular y una producción subsecuente de citocinas. El reconocimiento se lleva a cabo por los receptores de reconocimiento de patrones (PRR), dentro de los que se incluyen receptores tipo Toll (TLR) y los receptores semejantes a proteínas (NLR). La señalización a través de PRRs activa factores de transcripción tales como NF- κ B y factores de regulación de IFN-3 y 7 (IRF-3 e IRF-7), que inducen respuestas inflamatorias y estimulan el sistema inmune. NF- κ B produce citocinas proinflamatorias como IL-1 β y TNF- α , mientras que IRF-3 conduce a la producción de IFN, así como una variedad de quimiocinas.¹²

COMPONENTES CELULARES:

Las células efectoras más abundantes del sistema inmunitario innato son las que proceden de la médula ósea, circulan por la sangre y emigran hacia los tejidos. Entre ellas figuran las pertenecientes a la estirpe mielocítica, como los neutrófilos, los fagocitos mononucleares y las células dendríticas así como las de la estirpe linfocítica, como los linfocitos citolíticos naturales, los linfocitos T $\gamma\delta$ y los linfocitos B B-1.

La activación de células NK y la producción de interferón tipo I (IFN- α/β) por células dendríticas plasmacitoides (pDCs) son el principal mecanismo antiviral de la respuesta inmune innata.

*** Células citolíticas naturales (NK).**

Las células NK son linfocitos granulares de gran tamaño con habilidades citolíticas. Contribuyen a la eliminación de células infectadas y producen factores inmunoestimuladores que favorecen la generación de respuestas antígeno-específicas adaptativas. Su activación se regula por un balance entre señales de

activación e inhibición recibidas a través de complejos ligando-receptor. Los receptores inhibidores de las células NK (iNKR) reconocen las moléculas de clase I del MHC que se expresan en las células blanco, previniendo así, la citólisis mediada por estas células. El VIH-1 ocasiona la regulación a la baja del MHC de clase I en las células infectadas, no obstante, estas células presentan resistencia a la citólisis mediada por células NK. Aunque los motivos de esta disfunción no están claramente elucidados, probablemente se derivan de la combinación de una expresión acrecentada de iNKR y una simultánea disminución en la expresión de receptores de activación de las NK.^{55,56}

*** Células dendríticas.**

Las células dendríticas (DCs) son un grupo importante de células presentadoras de antígeno, poseen prolongaciones citoplasmáticas largas y derivan de precursores situados en la médula ósea. Dos poblaciones de células dendríticas pueden identificarse en sangre: las de origen mieloide (caracterizadas por la expresión de CD11c) y las plasmacitoides (CD123⁺).⁵³

Las DCs presentes en mucosas son las encargadas del procesamiento y la presentación de antígeno a células efectoras del sistema inmune, desempeñan un rol importante en los eventos tempranos a la infección por el VIH-1, pues se encuentran entre las primeras células que convergen con el virus al captarlo en mucosas cervicales, vaginales o rectales por medio del receptor DC-SIGN, (dominio proteico con capacidad de unión a carbohidratos o lectina tipo C). Tal interacción no ocasiona la fusión de la membrana viral con la celular, como ocurriría en la interacción con el receptor CD4, por lo que los viriones son internalizados y posteriormente presentados en la superficie cuando la DC ha madurado y migrado a los nódulos linfáticos donde interactúa con células T, facilitando así, la diseminación del virus desde las mucosas hasta los órganos linfoides donde puede infectar a los linfocitos T CD4⁺ ahí presentes.²⁸

Las células dendríticas plasmacitoides (pDCs) son importantes productoras de interferón tipo I (IFN- α/β), su activación ocurre posterior al reconocimiento de

patrones estructurales virales, principalmente ARN. El IFN tipo I crea un ambiente celular hostil para el virus, limitando la entrada de nutrientes del medio extracelular, favoreciendo la degradación de ARN, deteniendo el ciclo celular y eventualmente promoviendo la apoptosis de la célula blanco. ^{55,57}

*** Macrófagos.**

Los macrófagos expresan menores concentraciones de CD4 en su superficie que los linfocitos T pero expresan los correceptores CCR5 por lo que son susceptibles a la infección por VIH-1. Esto puede ocurrir por una vía independiente de gp120/gp41, como la fagocitosis de células infectadas o la endocitosis mediada por el receptor de Fc de los viriones del VIH-1 recubiertos de anticuerpos. Sin embargo, estas células son relativamente resistentes a los efectos citopáticos del VIH-1, y por consiguiente, pueden convertirse en un reservorio del virus. En tejidos, los macrófagos infectados pueden servir como una fuente de proteínas virales y de mediadores de inflamación, como citocinas, TNF, IL-1, IL-6, IL-10 y quimiocinas quimiotácticas. Los macrófagos infectados por el VIH-1 pueden presentar alteración de las funciones de presentación de antígenos y de la secreción de citocinas.

FACTORES SOLUBLES

Además de las moléculas asociadas a las células, en el plasma y en los líquidos extracelulares existen varias proteínas solubles diferentes, que también reconocen patrones moleculares vinculados a los patógenos y sirven como elementos efectores del sistema inmunitario innato. ⁵⁴

El sistema del complemento consta de varias proteínas plasmáticas que se ven activadas por los patógenos y favorecen su destrucción, así como la inflamación. La activación del complemento por la vía alternativa, se pone en marcha por el reconocimiento directo de ciertas estructuras presentes en la superficie microbiana y, por tanto, constituye un componente de la inmunidad innata. ⁵⁴ En la infección por VIH-1 la activación se ve reflejada por la presencia de subproductos del

complemento que se encuentran elevados en los individuos infectados. Tales componentes pueden llevar a la destrucción del virus o a la muerte de células infectadas. Durante la infección, las moléculas que inhiben la activación del complemento son producidas en concentraciones menores.

La lectina de unión a manosa (MBL) es una lectina de tipo C que se une a carbohidratos en la gp120, sus niveles incrementan en la fase aguda y su capacidad para activar al complemento se ven incrementados en individuos infectados por VIH-1 en etapas avanzadas.¹²

Las citocinas de la inmunidad innata atraen a leucocitos y logran su activación, producen modificaciones sistémicas, como el aumento en la síntesis de células efectoras y de las proteínas que potencian las respuestas antimicrobianas. En la inmunidad innata, las principales fuentes de citocinas son los macrófagos, los neutrofilos y las células NK.¹⁰

Los interferones (IFN) de tipo I son una extensa familia de citocinas relacionadas estructuralmente que median la respuesta inmunitaria innata temprana frente a las infecciones virales. Existen dos clases de interferones tipo I: IFN- α , la cual es una familia de proteínas e IFN- β , producto de un solo gen. Las células dendríticas plasmacitoides y los fagocitos mononucleares c+son las principales fuentes de IFN- α . El IFN hace que las células sinteticen diversas enzimas que interfieren con la transcripción del ARN o del ADN viral y con la replicación.⁵⁴ La acción antivírica del IFN de tipo I es principalmente una acción paracrina, en la que una célula infectada por un virus secreta IFN para proteger a las células vecinas que todavía no están infectadas.^{53,54}

RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA

El sistema inmunitario adaptativo tiene la capacidad de reconocer una gran cantidad de sustancias microbianas, no microbianas y de reaccionar frente a ellas. Los principales componentes de la inmunidad adaptativa son los linfocitos y sus productos de secreción, como los anticuerpos.⁵⁴

RESPUESTA CELULAR

*** Linfocitos T CD8.**

Los linfocitos T citotóxicos (CTLs) portan la molécula CD8 y reconocen proteínas ajenas presentadas por moléculas MHC de clase I en la superficie de la célula infectada. Dicha señal es un indicio de peligro y resulta en la lisis mediada por células T CD8⁺ de la célula afectada. Se cree que la disminución de la carga viral presente en las primeras semanas posteriores a la infección por VIH, es gracias a la acción citotóxica de las células T CD8⁺.⁵⁰ Dentro de la amplia diversidad de respuesta de estas células se encuentra su habilidad para la inducción de apoptosis de la célula blanco mediante la unión a Fas (CD95), la secreción de IFN- γ , quimiocinas beta MIP-1 α (proteína inflamadora de macrófagos-1 α), MIP-1 β y RANTES⁵⁸ que se unen al correceptor CCR5 promoviendo su internalización y reduciendo la habilidad del VIH-1 para lograr su entrada en células, de otro modo, susceptibles.

*** Linfocitos T CD4**

Linfocitos T cooperadores expresan la molécula CD4 y reconocen proteínas virales que han sido captadas por células presentadoras de antígeno (CPAs). Son responsables de coordinar y asistir la respuesta inmune, promueven la actividad citotóxica de las células T CD8 y colaboran con las células B para la producción de anticuerpos. Posterior a la infección por VIH-1 se observa una depleción progresiva de linfocitos CD4 circulantes. El número de linfocitos T CD4⁺ circulantes es un parámetro empleado como una medida de competencia inmune y funciona como indicador de riesgo para el padecimiento de infecciones oportunistas.⁵⁹ En la etapa aguda de la infección, las células T CD4⁺ de memoria son eliminadas selectivamente de la circulación. En etapas finales de la enfermedad, todas las poblaciones de células CD4 son depletadas tanto de circulación como de tejidos linfoides.

Dentro de las anomalías funcionales ocasionadas por la infección se encuentran: fracaso para llevar a cabo división celular, pérdida de capacidad de respuesta contra patógenos ya conocidos por el sistema inmune, disminución en la expresión de IL-2, (que puede estar relacionada con los defectos en su proliferación), deficiencia en la regulación a la alta del marcador de activación el ligando de CD40, regulación a la alta de moléculas inhibitoras de antígenos de linfocitos T citotóxicos y muerte celular programada-1 (PD-1), incremento en la expresión de marcadores de apoptosis y señalización irregular inducida por comunicación cruzada del TCR.⁵⁵

RESPUESTA HUMORAL

La infección del virus de la inmunodeficiencia humana está asociada con el desarrollo de anticuerpos que aparecen dentro de semanas después de la primoinfección. Aunque la mayoría de estos anticuerpos están dirigidos hacia detritos virales, un conjunto de estos puede neutralizar el virus. Ya sea mediante la unión directa a las glicoproteínas de envoltura de los viriones libres o posterior a la unión CD4-gp120 previniendo el cambio conformacional que permite la fusión de la membrana viral con la membrana celular y con ello la entrada del virus. El efecto neutralizante de estos anticuerpos es mínimo, en parte a causa de la alta glicosilación de la membrana viral que evita la unión de los anticuerpos, aunado a la rápida evolución de los viriones para escapar del efecto neutralizante.⁵⁰ Eventualmente, la respuesta humoral se altera, caracterizándose por hiperactivación e hipersensibilidad. La hiperactivación se refleja por hiperglobulinemia policlonal, donde solo una porción de los anticuerpos está dirigida contra los antígenos del VIH, mientras que la hipersensibilidad se caracteriza por una expresión intensificada de moléculas de activación en linfocitos B y la presencia de anticuerpos autoreactivos en plasma.⁶⁰

TRATAMIENTO Y OBTENCIÓN DE VACUNAS

TRATAMIENTO

En la actualidad, el objetivo de la terapia antirretroviral es reducir y mantener la carga viral a niveles indetectables, restaurar y resguardar la respuesta inmune, reducir la morbilidad, la mortalidad y mejorar la calidad de vida. Existen cinco clases de agentes antivirales para el tratamiento de la infección por VIH-1: (i) los nucleósidos inhibidores de la RT, (ii) los inhibidores de la RT no-nucleósidos, (iii) los inhibidores de PT, (iv) inhibidores de fusión e (v) inhibidores de integrasa.⁶¹ El tratamiento de la infección por el VIH-1 incluye la administración de tres clases de fármacos antivirales que se emplean de forma combinada y actúan sobre moléculas virales para las cuales no existen homólogos humanos. Este tratamiento es denominado TARGA (tratamiento antirretroviral de gran actividad). Aunque se ha observado una disminución importante de los títulos virales, se sabe que este tratamiento no elimina el virus de todos los reservorios, y que, a causa de la alta tasa de mutación de este virus puede presentarse resistencia.⁵²

VACUNAS

La obtención de una vacuna eficaz frente al VIH-1 se ha visto complicada por la capacidad del virus de mutar y modificar muchos de sus antígenos inmunogénicos. Otro obstáculo es la naturaleza misma de la infección, pues el virus debilita directamente el componente central de la inmunidad adaptativa, (el linfocito T CD4). Aunado a la rápida proliferación y establecimiento de reservorios virales aún frente a las respuestas de las células citotóxicas y los anticuerpos del sistema inmune.⁵¹

Una vacuna eficaz debe estimular las respuestas humorales y celulares frente a los antígenos virales que son fundamentales para el ciclo de replicación del virus. Actualmente las principales estrategias para el desarrollo de vacunas contra el VIH-1 incluyen el empleo de vectores virales distintos al VIH-1 que sean portadores de genes del genoma viral y vacunas de ADN donde genes estructurales y reguladores del VIH-1 son insertados en plásmidos para la

producción de las proteínas virales en el hospedero. Las vacunas de subunidades de proteínas o péptidos virales tienen poca utilidad pues los anticuerpos producidos no neutralizan las especies clínicas del VIH-1.^{52,62}

Otras estrategias de vacunación incluyen la administración conjunta de proteínas virales y citocinas, como IL-12, que estimulen la respuesta inmune, o la producción de anticuerpos anti-CCR5 en la mucosa genital.¹²

FACTORES CELULARES DE RESTRICCIÓN Y MECANISMOS DE EVASIÓN

Las células de mamíferos expresan ampliamente diversas proteínas que funcionan de una manera autónoma para suprimir la replicación de diferentes virus incluyendo el VIH-1. Estas proteínas reciben el nombre de factores celulares de restricción o factores intrínsecos de resistencia. Constituyen una línea primaria de defensa contra infecciones, como un componente de las respuestas antivirales innatas. Algunos de estos factores son el complejo de edición similar al polipéptido catalítico de la enzima editora del ARNm de la apolipoproteína B-3 (APOBEC3), teterina o antígeno celular 2 del estroma de la médula ósea (BST2 o CD317) y el motivo tripartita contenedor de 5 α (TRIM5 α).⁶³

PROTEÍNAS APOBEC3

La interacción entre las proteínas APOBEC3 (A3) y el VIH-1 fue descubierta al observar la síntesis de viriones defectuosos a partir de la infección con un VIH-1 mutado que careciera de la proteína Vif (Δ Vif VIH-1). Experimentos con la infección de células “permissivas” (susceptibles a la infección con Δ Vif VIH-1) y células “no permissivas” (no susceptibles a dicha infección) sugirieron la existencia de un factor celular que inhibía la replicación de Δ Vif VIH-1. Sheehy et al. 2002 empleó transcriptómica comparativa donde al expresar las bibliotecas de ADNc de células no permissivas en las células susceptibles permitió la selección y aislamiento del gen que confería resistencia a la infección por Δ Vif VIH-1.^{63,64}

APOBEC3G

APOBEC3G (apolipoprotein B messenger RNA (mRNA)-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3) es un miembro de la familia de citidina deaminasas APOBEC3. Son únicas en mamíferos y están involucradas en la edición de ADN y su mutación.⁶⁵ Se expresan ampliamente en tejidos y células humanas, principalmente en células hematopoyéticas. Los genes que codifican estas proteínas se localizan en tándem en el cromosoma 22. En humanos existe un total de 7 genes (APOBEC3A, APOBEC3B, APOBEC3C, APOBEC3DE, APOBEC3F, APOBEC3G, y APOBEC3H).⁶⁴ De estos miembros se ha reportado que APOBEC3G seguido de APOBEC3F son los inhibidores más potentes de la replicación de VIH-1.⁶⁶ APOBEC3G (A3G) realiza la edición post-sintética de los residuos de citidina a uridinas y con ello altera la secuencia de nucleótidos al introducir una base no natural. APOBEC3G es inducida transcripcionalmente por IFNs tipo 1, particularmente en células mieloides, un rasgo que caracteriza a muchas proteínas celulares involucradas en el control innato de una infección viral.⁶³

*** Estructura**

Todas las proteínas de la familia APOBEC3 contienen una o dos copias de un dominio característico de desaminasa coordinado por zinc (dominio Z) que comprende una plataforma de cinco hebras β que envuelven α hélices y bucles conectores, tres residuos de histidina o cisteína que coordinan un ion de Zn^{2+} y un residuo catalítico de ácido glutámico involucrado en el intercambio de protones (Figura 8). A3G posee dos de estos dominios: el dominio carboxilo terminal media la desaminación, mientras que el dominio amino terminal Z, no posee actividad catalítica pero regula su incorporación a las partículas de VIH-1 y es reconocido por Vif.^{63,64}



Figura 8. Estructura cristalina de APOBEC3G. Se observan las α hélices en color morado, rodeando las cinco hebras β . El ión de zinc es representado en rojo. Imagen tomada de Holden et al., Crystal structure of the anti-viral APOBEC3G catalytic domain and functional implications, Nature, 2008 November 6; 456(7218): 121–124.

* Mecanismo de Acción

En ausencia de Vif, A3G es incorporado a los nuevos viriones mediante la unión al ARN e interacciones del dominio amino terminal Z con la nucleocápside. Una vez que el virus infecta una nueva célula e inicia su replicación, A3G se asocia con el complejo de retrotranscripción y desamina residuos específicos de citidina en la cadena molde de ADN.⁶⁷ La citidina blanco para desaminación hidrolítica es 5'-CCCA, donde la base subrayada es desaminada.⁶⁸ Estas ediciones resultan en cambios de guanosina a adenosina (G→A) en el genoma del VIH-1 que derivan en mutaciones, y en el caso del codón triptófano, el resultado son codones de paro fatales para el virus. Así mismo se ha observado una disminución en los niveles de ADNc que son acumulados durante la infección, una posible explicación para este último evento es que las proteínas celulares degradan el material viral hipermutado mediante una N-glicosilación de los uracilos. (Figura 9)

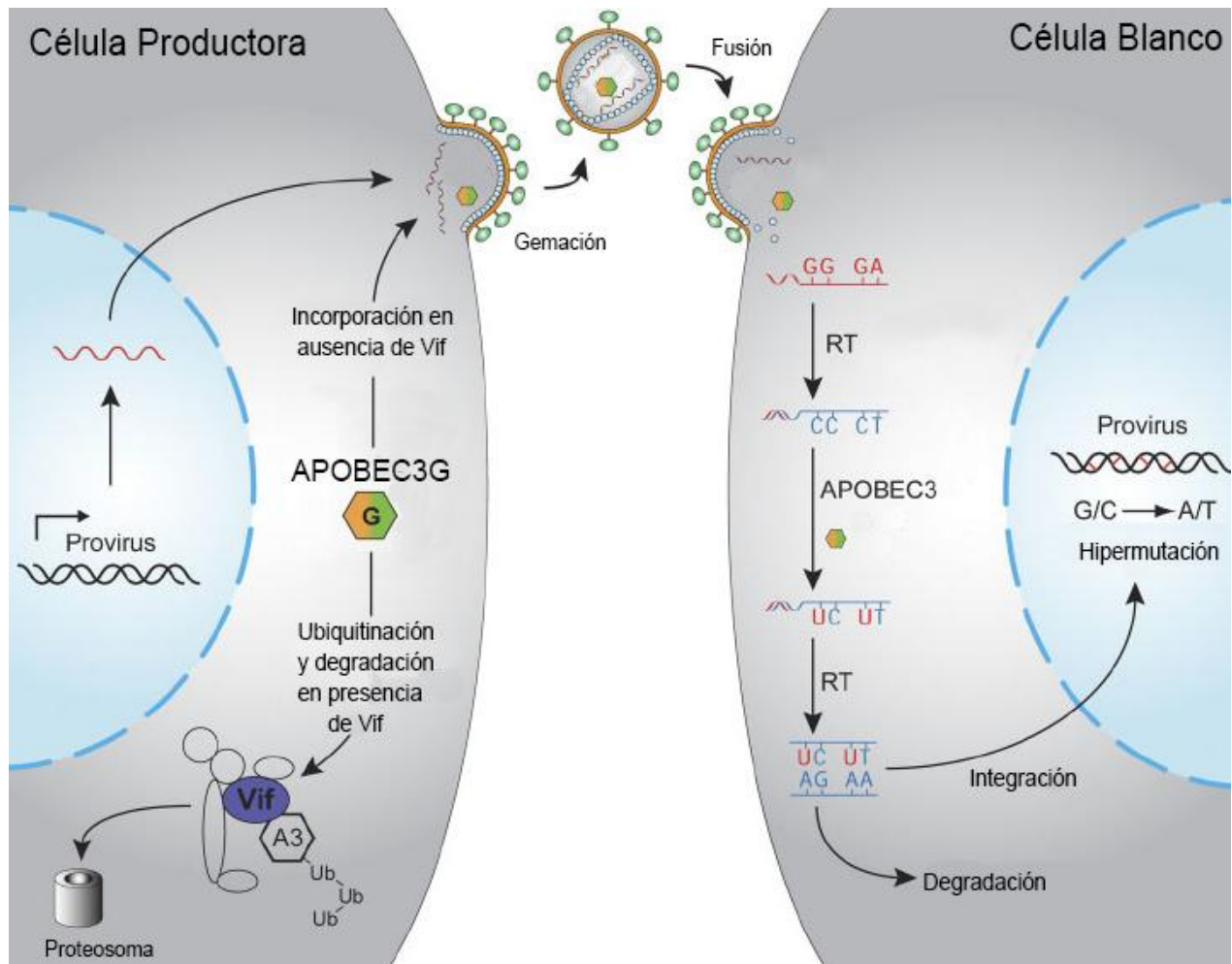


Figura 9. Modelo de restricción del VIH-1 mediada por APOBEC3G. En una célula infectada la ausencia de Vif permite la integración de la proteína APOBEC3G en la progenie viral. Después de la fusión de estos virus con una nueva célula blanco y el inicio de la transcripción reversa, A3G desamina citosinas a uracilos en la cadena molde del ADNc viral resultando en hipermutación que puede generar provirus no funcionales o la degradación del material genético previo a su integración. Mientras que la presencia de Vif ocasiona la degradación de APOBEC3G al actuar como un adaptador entre el factor celular y las proteínas del complejo de ubiquitin ligasas, causando la degradación de A3G por vía proteosomal. Imagen modificada de Hultquist, J. F. et al. Human and Rhesus APOBEC3D, APOBEC3F, APOBEC3G, and APOBEC3H Demonstrate a Conserved Capacity To Restrict Vif-Deficient HIV-1. *J. Virol.* 85, 11220–11234 (2011).

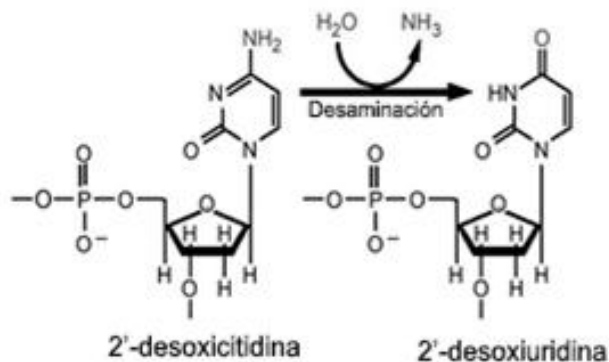


Figura 10. Mecanismo de desaminación de APOBEC3G. La desaminación hidrolítica ocurre en la posición 4 del anillo pirimidina de la citidina. El agua es necesaria tanto como donadora de protones para el funcionamiento de la enzima como para la donación del grupo hidroxilo que es adicionado por ataque nucleofílico para la síntesis del grupo carboxilo y la oxidación resultante en uridina. Imagen tomada de Program in Genomics of Differentiation - Judith Levin Lab en 68

Se ha demostrado que Vif protege al virus de una inactivación debida a A3G al prevenir su incorporación en la progenie viral favoreciendo así su replicación. Vif también es el encargado de eliminar a A3G de la célula productora de viriones al reclutar un complejo de ubiquitin ligasas que comprende a la proteína de andamiaje Cullin5, las elonginas B y C, Rxb2 y la enzima conjugante E2. Esto resulta en la poliubiquitinación y la subsecuente degradación proteosomal de A3G (Figura 9).^{63,69}

* APOBEC3G y controladores

Se han observado una correlación inversa entre los niveles de ARNm de APOBEC3G y el progreso de la enfermedad en pacientes controladores, pero no en progresores.⁷⁰ Diversos estudios reportan la presencia de ARNm defectuoso de la proteína viral Vif en pacientes controladores, sugiriendo que la proteína APOBEC3G podría controlar la replicación viral *in vivo*.⁷¹ Otros eventos que soportan esta teoría es descubrimiento de hipermutaciones características de A3G en secuencias de VIH-1 de estos pacientes.⁷²

JUSTIFICACIÓN

En la actualidad existen 35.3 millones de personas que viven con VIH/SIDA en todo el mundo ⁶ y a pesar de los grandes adelantos en la investigación relacionada con la infección y los conocimientos derivados de la misma en los campos de la patogenia viral, la biología del virus, la respuesta inmunológica contra el VIH, así como el desarrollo de fármacos antirretrovirales y el estudio de posibles vacunas, aún no existe una cura contra la infección.

La infección por VIH-1 es una epidemia que no solo afecta la salud de los individuos que la padecen, de la misma forma afecta a familiares, comunidades y el desarrollo y economía de las naciones. Sin embargo, existen señales prometedoras, nuevos esfuerzos a lo largo de todo el mundo se están integrando para abordar esta epidemia. Uno de ellos, es la investigación relacionada con el estudio de mecanismos de defensa intrínsecos de las células del hospedero que puedan limitar la replicación del virus. Dentro de estos, el factor celular más promisorio es la enzima citidina deaminasa APOBEC3G. Se ha observado que personas con ausencia de los síntomas característicos de la infección o con una progresión lenta a las etapas más avanzadas de la enfermedad presentan cargas virales bajas y mayores niveles de expresión de esta proteína, con respecto a las personas infectadas con VIH-1 en diferentes etapas de la infección.

Considerando el escenario anteriormente descrito, en este estudio, pretendemos caracterizar la actividad antirretroviral de la proteína APOBEC3G. Esto mediante el análisis de su expresión bajo distintos estímulos en diferentes cohortes de pacientes mexicanos, que incluyan individuos controladores, personas con una progresión típica de la infección y sujetos clínicamente sanos. Así como su papel en la hipermutación inducida en la secuencia del genoma del VIH-1 y su relación con una protección a la infección o con una progresión a la etapa de SIDA, ofreciendo así, nuevas perspectivas en el entendimiento de la infección y en el diseño de novedosas estrategias terapéuticas contra el VIH.

HIPÓTESIS

Se espera que exista una relación entre la actividad citidin deaminasa de la proteína intracelular APOBEC3G y el incremento de la expresión de esta proteína así como con la hipermutación en el genoma del Virus de la Inmunodeficiencia Humana. Es probable que estas hipermutaciones generen mutaciones en el genoma viral que afecten la capacidad replicativa del VIH-1 y sean indicadores de una presión evolutiva ejercida por APOBEC3G. Lo que se reflejará en un control de la replicación viral.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Estudiar y caracterizar *in vitro* la función de la proteína APOBEC3G (A3G) en individuos controladores de la infección, como factor antirretroviral que limite la replicación viral y confiera protección ante la infección del VIH-1.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cuantificar *in vitro* la expresión de A3G en células mononucleares de sangre periférica en estado basal, así como bajo el estímulo de INF- α y antígenos de VIH-1.
- Evaluar la actividad antirretroviral de la proteína A3G de forma indirecta mediante el análisis de hipermutación del genoma viral.
- Determinar si existen mutaciones en el gen la proteína Vif en pacientes controladores de la replicación que indiquen una menor limitación de la actividad antirretroviral de A3G.
- Analizar la posible presión de selección evolutiva que confiera A3G al genoma viral empleando como modelo de estudio del uso de codones y cambios sinónimos y no sinónimos en el genoma del VIH.

MATERIALES Y MÉTODOS

POBLACIÓN DE ESTUDIO.

Se emplearon diversas cohortes de pacientes:

* **Donadores sanos (DS, n=5):**

A partir de paquetes leucocitarios provenientes del banco de sangre del Instituto Nacional en Enfermedades Respiratorias (INER). Dichas muestras resultaron negativas a las pruebas para la detección de agentes infecciosos como hepatitis B, C y VIH.

* **Progresores típicos (PT, n=8):**

Se seleccionaron personas infectadas con VIH-1 con niveles de linfocitos T CD4⁺ mayores a 300 células/mL pero menores a 500 células/mm³ y cargas virales elevadas ($\geq 10,000$ copias/mL). Los pacientes formaban parte de la cohorte de pacientes del Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIENI) del INER y no contaban con tratamiento antirretroviral previo.

* **Controladores (CT, n=9)**

Son individuos que a pesar de haber sido infectados por VIH-1 han mantenido niveles de carga viral bajos y no presentan la evolución típica de esta infección aún en ausencia de un tratamiento antirretroviral. Todos estos pacientes poseen un conteo de linfocitos T CD4⁺ mayor a 500 células/mm³.

Todas las muestras empleadas (sangre periférica) fueron obtenidas bajo la participación voluntaria de los pacientes o donadores, previa firma de carta de consentimiento informado. Posteriormente, dichas muestras fueron procesadas para la obtención de las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs, siglas en inglés) mediante su separación por un gradiente densidad empleando ficoll y congeladas a -180°C con ayuda de medio de congelación (90% suero fetal bovino, 10% DMSO).

DESCONGELACIÓN DE CÉLULAS.

Para la descongelación se requiere dejar los viales a temperatura ambiente el tiempo necesario hasta que se observe que la mayoría del medio de congelación se ha licuado. Una vez llegado este punto, el medio se transfiere a un tubo falcon con 10 mL de medio HUT a 37°C. El medio HUT se compone de medio RPMI 1640 (Biowhittaker, Lonza, Walkersville, MD) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1% de L-Glutamina y 1% de penicilina/estreptomicina. Homogenizar suavemente y centrifugar a 1500 rpm durante 10 minutos para lavar las células y eliminar componentes del medio de congelación que puedan dañar la viabilidad celular. Desechar el sobrenadante y realizar un lavado más con 10 mL de medio HUT a 37°C. Al terminar los lavados, las células son resuspendidas en 10 mL de medio HUT a 37°C para la determinación de la viabilidad celular.

EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR.

Las células son teñidas con el colorante azul de tripano al 0.4% (Lonza, Walkersville, MD) en una razón 1:1 con la suspensión celular. La viabilidad celular se cuantifica mediante la determinación del porcentaje de células dañadas en una cámara de Neubauer. Las células afectadas se diferencian de las células viables por presentar una coloración azul como consecuencia de daño a su membrana celular y la incorporación del azul de tripano. El cálculo del porcentaje de viabilidad celular se realiza mediante la siguiente ecuación:

$$\% Viabilidad\ celular = \frac{Células\ vivas}{Células\ totales} * 100$$

Seleccionar las células cuya viabilidad sea mayor a 70%. Resuspender en medio HUT a 37°C en una relación de 3,000,000 células/mL de medio HUT e incubar toda la noche a 37°C con una concentración de 5% de CO₂, 85% de humedad y 10U de ADNasa (Invitrogen, USA) por mililitro de medio.

ESTIMULACIÓN CELULAR.

Se emplean los siguientes compuestos estimulantes:

* **Interferón alfa (IFN α , PBL Interferonsource, Piscataway, NJ).**

Es una glicoproteína de la clase de las citocinas, producida por una variedad de células en respuesta a una infección viral, inmunoestimuladores e inductores químicos, posee actividades antivirales, antiproliferativas e inmunomoduladoras. Al interactuar con su receptor la principal cascada de señalización activada es la vía JAK1-STAT, dicha activación conduce al aumento en la expresión de un amplio número de genes cuyos productos protegen a la célula de una infección viral.⁷³

* **ssRNA40 (InvivoGen, San Diego, CA).**

Es un oligonucleótido de cadena sencilla con una secuencia rica en Guanina y Uracilo, que al estar complementado con el lípido catiónico LyoVec puede mimetizar el efecto de los ARNs virales en la producción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α , siglas en inglés) e INF α por las células mononucleares periféricas.

* **ssRNA41 (InvivoGen, San Diego, CA).**

Oligonucleótido de cadena sencilla derivado de ssRNA40 al reemplazar todas sus bases uracilo por adenosina, lo que inhibe su función estimuladora en la producción de IFN α , por lo que puede ser empleado como control negativo de ssRNA40.

Se cosechan las células descongeladas el día anterior y se lavan con medio HUT a 37°C. Se colocan en placas de cultivo de 24 pozos, a una densidad de 1,000,000 de células en 1 mL de medio de cultivo HUT para cada estímulo. Las concentraciones empleadas de cada estímulo fueron las siguientes:

Tabla 1. Concentraciones empleadas de cada estímulo.

Estímulo	Concentración
IFN-α	500 U/mL
ssRNA40	1.25 μ g/mL
ssRNA41	1.25 μ g/mL

Como control de reactivos y para estudiar la síntesis de APOBEC3G a niveles basales, se coloca el mismo número de células a iguales condiciones, sin ningún estímulo. Se incuban las células durante 6 horas, una vez transcurrido este tiempo las células son cosechadas y colocadas en tubos eppendorf de 1.5 mL, se centrifugan a 1500rpm por 10 minutos y se descarta el sobrenadante para la extracción de ARN.

De forma paralela las células remanentes, que no se emplearon para la estimulación, fueron centrifugadas y se les retiró el medio. El pellet fue almacenado para la posterior extracción de DNA genómico.

EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS.

ARN

El ARN de cada paciente se extrajo mediante el kit RNeasy® Mini Kit (QIAGEN, México) con el que las células son lisadas mediante la adición de un amortiguador altamente desnaturizante que contiene guanidina y tiocianato y que se suplementa con 1% de β -mercaptoetanol, se añade etanol para favorecer la unión selectiva del ARN a la columna de sílica gel a la que se transfiere posteriormente para la eliminación de contaminantes como iones y proteínas que puedan interferir en ensayos posteriores. La tecnología utilizada por este kit permite la obtención de moléculas de ARN mayores a 200 nucleótidos y por ende un enriquecimiento de ARN mensajero.

ADN

El ADN total de los pacientes se extrajo empleado el kit QIAamp® DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, México), al igual que la extracción de ARN, el fundamento de este kit es la unión específica del ADN a la membrana de sílica gel mientras los contaminantes son eliminados con ayuda de diversas soluciones amortiguadoras.

CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLÉICOS.

Los ácidos nucleicos purificados (ADN y ARN) se cuantificaron por espectrofotometría a 260nm, empleando el equipo NanoDrop® ND-1000. La presencia de contaminantes se determinó mediante el cociente de absorción de luz UV a 260nm vs. 280nm dado que las proteínas (especialmente los aminoácidos aromáticos), absorben la luz ultravioleta en esta última longitud de onda. Se consideraron como puros los ácidos nucleicos con valores de dicho cociente mayores a 1.8.

SÍNTESIS DE ADN COMPLEMENTARIO.

Una vez obtenido el RNA de las PBMC's es necesaria la síntesis del ADN complementario o ADNc, que es un ADN de doble cadena sintetizado a partir de una hebra simple de ARNm, y que por lo tanto, carece de intrones. Dicha síntesis se llevó a cabo por RT-PCR empleando una ADN polimerasa dependiente de ARN o transcriptasa reversa, y un cebador, en este caso hexámeros iniciadores aleatorios que son secuencias de oligonucleótidos de 6 bases, sintetizadas completamente al azar para generar un amplio rango de secuencias con la capacidad de alinearse en varios puntos aleatorios del ARNm, incrementando así, la probabilidad de copiar por completo la secuencia blanco al generar una amplia variedad de transcritos de corta longitud.

Se empleó una concentración definida de ARN de cada muestra: 100ng, y se utilizó el kit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (ROCHE, Mannheim, Alemania). Se utilizan los componentes y cantidades indicados en la Tabla 2 para favorecer la desnaturalización de las estructuras secundarias de ARN que pudieran estar presentes y el alineamiento de los iniciadores. Esta mezcla de reacción es calentada a 65°C durante 10 minutos, terminado este tiempo, se colocan los tubos en hielo y se añade la mezcla de reacción para la transcripción reversa (Tabla 3) y se usan las condiciones de reacción del Gráfico 1.

Tabla 2. Mezcla de reacción para la desnaturalización de estructuras secundarias de ARN y el alineamiento de los iniciadores.

Componente	Volumen/reacción	Concentración final
Hexámeros iniciadores aleatorios	2.0 μL	60 μM
ARN muestra	Variable	100 ng
Agua grado PCR	cbp	--
Volumen total	13.0 μL	--

Tabla 3. Mezcla de reacción para la transcripción reversa.

Componente	Volumen/reacción	Concentración final
Amortiguador de reacción	4.0 μL	8mM MgCl_2
Inhibidor del protector de ARNasa	0.5 μL	20 U
Deoxynucleótidos	2.0 μL	1 mM c/u
Transcriptasa reversa	0.5 μL	10 U
Volumen Final	7.0 μL	---

Una vez mezclados los reactivos la reacción se somete a las siguientes condiciones de ciclado en un termociclador:

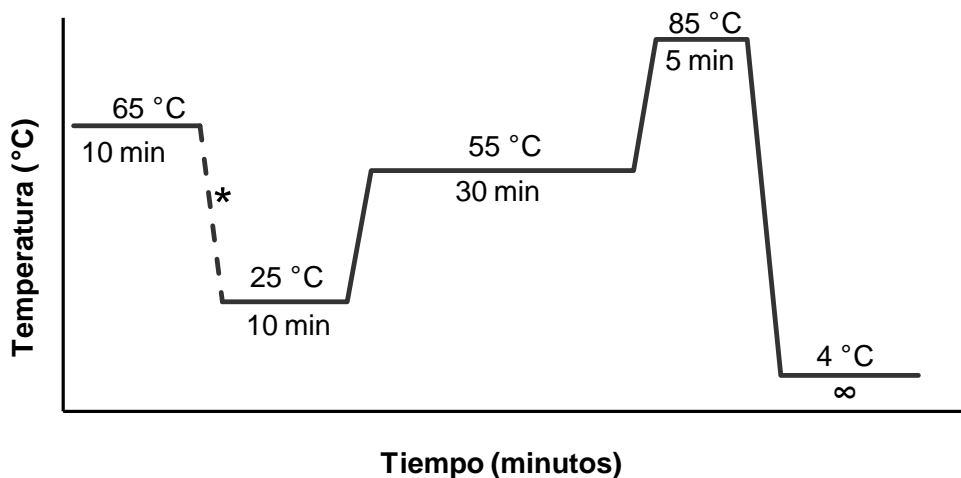


Gráfico 1. Condiciones de reacción para la síntesis de ADN complementario. * = Incorporación de la enzima.

DETECCIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA.

La detección de la expresión de los genes estimulados se realizó mediante PCR en tiempo real (RT-qPCR) dentro de un arreglo dinámico de nanofluidos.

La PCR en tiempo real permite la cuantificación de ARN o ADN en una muestra al emplear iniciadores específicos para definir el número de copias de una secuencia de ARN, ADNc o ADN determinados. Se cuantifica la cantidad de ácido nucleico amplificado en cada ciclo de la PCR, si una secuencia particular es abundante en una muestra se observará amplificación en los primeros ciclos de la reacción, si la secuencia es escasa, amplificará en ciclos tardíos. Esta cuantificación se realiza por medio de sondas fluorescentes o colorantes de unión a ADN. Un gráfico de amplificación muestra la fluorescencia detectada en relación al número de ciclos efectuados. El ciclo umbral (Ct) es el número de ciclo en el que se observa un aumento estadísticamente significativo de amplificación (fluorescencia).⁷⁴

En este método se empleó el colorante de unión a ADN: EvaGreen®, un colorante que en ausencia de ADN posee una conformación circular, una vez el ADN está disponible, el tinte sufre un cambio conformacional que le permite unirse al ácido nucleico y emitir fluorescencia.⁷⁵

Los protocolos de ciclado térmico de la PCR cuantitativa son seguidos de un análisis de temperatura de fusión para permitir la evaluación de la calidad de la reacción.

ANÁLISIS DE LA TEMPERATURA DE FUSIÓN.

Una curva de disociación grafica el cambio observado en la fluorescencia cuando ADN de doble cadena (dsDNA) con moléculas de tinte incorporadas se disocia en ADN de cadena sencilla con el aumento de la temperatura. Esta disociación ocasiona una disminución en la fluorescencia por la liberación de las moléculas del colorante previamente incorporadas. La fluorescencia es graficada contra la temperatura, posteriormente el cambio de ambos parámetros ($-\Delta F/\Delta T$) es

graficado contra la temperatura en una doble diferencial para obtener la temperatura de fusión (T_m) del fragmento específico. Este análisis permite verificar la especificidad de la reacción, descartar artefactos como dímeros de iniciadores y eliminar el empleo de técnicas electroforéticas para la visualización de resultados.⁷⁴

La temperatura de fusión (T_m), es específica para cada fragmento amplificado pues depende de la longitud, contenido de guanina-citocina, y una posible falta de complementariedad en las bases del fragmento.

CIRCUITOS INTEGRADOS DE FLUIDOS.

Para el análisis de expresión genética se emplearon circuitos integrados (CI) o *chips* que regulan soluciones de reacción a nano escala, permitiendo reacciones individuales simultáneas en cámaras individuales. Los chips están conformados por válvulas NanoFlex™ consistentes de una membrana operada bajo presión para modular el paso de fluidos en un microcanal. La válvula se compone de dos capas individuales de un polímero elastomérico colocadas en un molde micro mecanizado. Al aplicar gas a presión a los canales en una capa del chip, las capas se fusionan en la intersección de estos canales, creando una densa red de canales y cámaras en un chip elástico. En la Figura 11 se muestra una válvula en su estado abierto y en su estado cerrado.⁷⁶

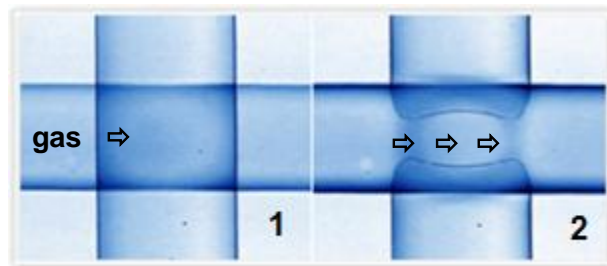


Figura 11. Válvulas NanoFlex® en su estado abierto (1) y su estado cerrado (2). Imagen tomada de Fluidigm Corporation. Fluidigm technology - Nanoflex valves, Integrated Fluidic Circuits.

Previo a la PCR en tiempo real, esta metodología requiere una la optimización de las muestras a analizar y de los ensayos empleados:

AMPLIFICACIÓN DE UN BLANCO ESPECÍFICO (STA).

Permite enriquecer las muestras para los genes de interés mediante una pre amplificación multiplex, manteniendo así, una abundancia relativa entre los genes. Se emplean las siguientes cantidades de reactivos y condiciones de amplificación:

Tabla 4. Mezcla de reacción para la amplificación de un blanco específico.

Componente	Volumen /Reacción	Volumen para 96 reacciones + incremento 10%
2X TaqMan® PreAmp Master Mix^a	2.5 µL	264 µL
Mezcla de iniciadores (500nM)	0.5 µL	52.8 µL
Agua	0.75 µL	79.2 µL
ADNc	1.25 µL	---
Volumen Total	5.0 µL	----

^a. Applied BioSystems, San Francisco, CA

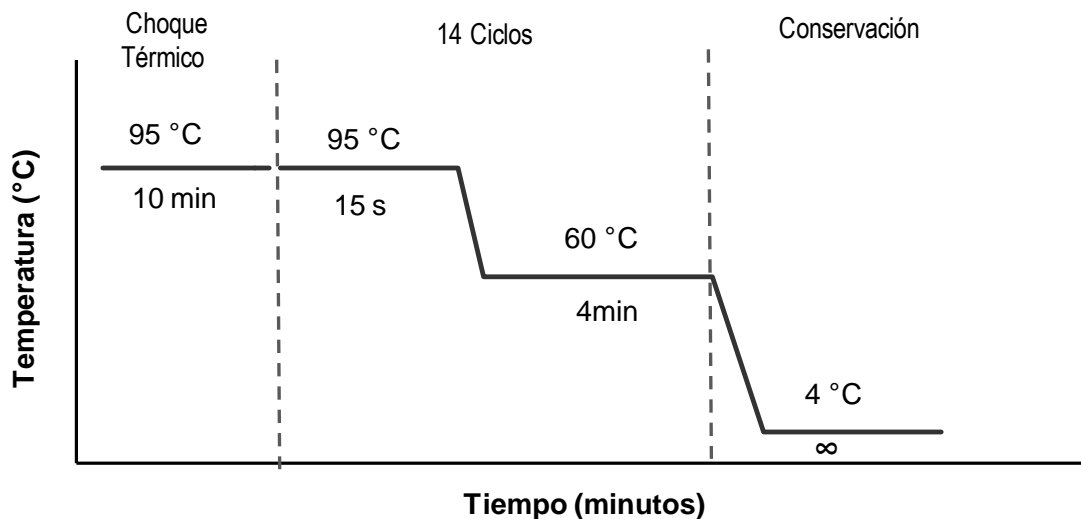


Gráfico 2. Condiciones de reacción durante la amplificación de un blanco específico.

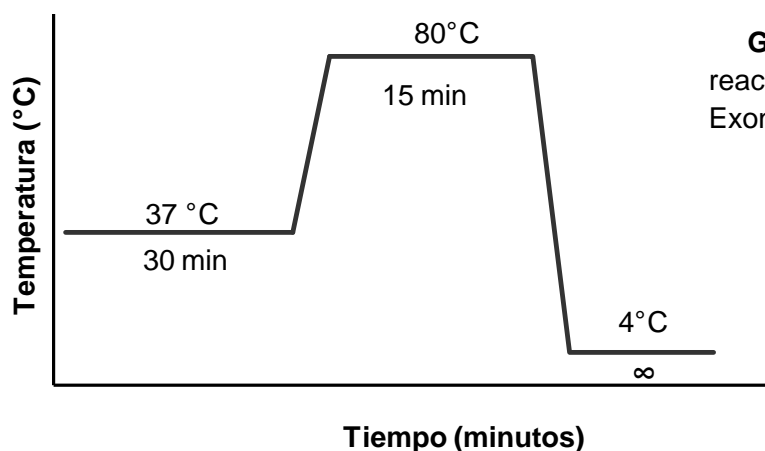
TRATAMIENTO CON EXONUCLEASA I

Para remover los iniciadores que no se incorporaron a la reacción se realiza un tratamiento con Exonucleasa I a las muestras de acuerdo a las cantidades y condiciones de la Tabla 5 y el Gráfico 3. La Exonucleasa I degrada las hebras de ADN monocatenario, como los iniciadores que no se alinearon en la reacción.

Tabla 5. Mezcla de reacción para el tratamiento con Exonucleasa I.

Componente	Volumen para muestra de 5 μL	Volumen para 96 reacciones (con exceso)
Agua	1.4 μL	168 μL
Amortiguador de Reacción para Exonucleasa I*	0.2 μL	24 μL
Exonucleasa I (20U/ μL)*	0.4 μL	48 μL
Volumen Total	2.0 μL	240 μL

* Exonucleasa I (New England BioLabs, USA)



El producto final se diluye a una relación 1:5 con buffer TE (10mM Tris, pH 8.0, 1.0mM EDTA) para proporcionar una concentración adecuada de amplificado para la cuantificación de la expresión génica. Se adicionan 18 μL de buffer considerando que el volumen de la reacción STA tratado con Exonucleasa (EXO I) es de 7 μL .

Las muestras previamente tratadas con Exonucleasa y diluidas con TE (Tabla 6) así como los ensayos (iniciadores; Tabla 7) se preparan con los colorantes y reactivos necesarios para su procesamiento en el circuito integrado de fluidos con las condiciones del Gráfico 4.

PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Tabla 6. Mezcla de reacción para la preparación de las muestras.

Componente	Volumen por pozo	Volumen por pozo con exceso	Volumen para un arreglo dinámico IFC 96.96 (con exceso)
2X Master Mix^a	2.5 µL	3.5 µL	390 µL
Reactivo de Carga para muestras, colorante de unión a ADN (20X)^b	0.25 µL	0.35 µL	39 µL
Muestra STA con tratamiento EXO-1, diluida	2.25 µL	3.15 µL	---
Volumen Total	5.0 µL	7.0 µL	---

^{a.} SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad Laboratories, San Francisco, CA)

^{b.} 20X DNA Binding Dye Sample Loading Reagent (Fluidigm, San Francisco, CA)

PREPARACIÓN DE ENSAYOS

Tabla 7. Mezcla de reacción para el tratamiento de los ensayos.

Componente	Volumen por pozo	Volumen por pozo con exceso	Volumen para un stock de 50 µL
Reactivo de carga para ensayos (2X)^c	2.5 µL	3.0 µL	25 µL
Buffer TE	2.25 µL	2.7 µL	22.5 µL
Mezcla de iniciadores: Forward y Reverse (100 µM c/u)	0.25 µL	0.3 µL	2.5 µL
Volumen Total	5.0 µL	6.0 µL	50 µL

^{c.} 2X Assay Loading Reagent (Fluidigm, San Francisco, CA)

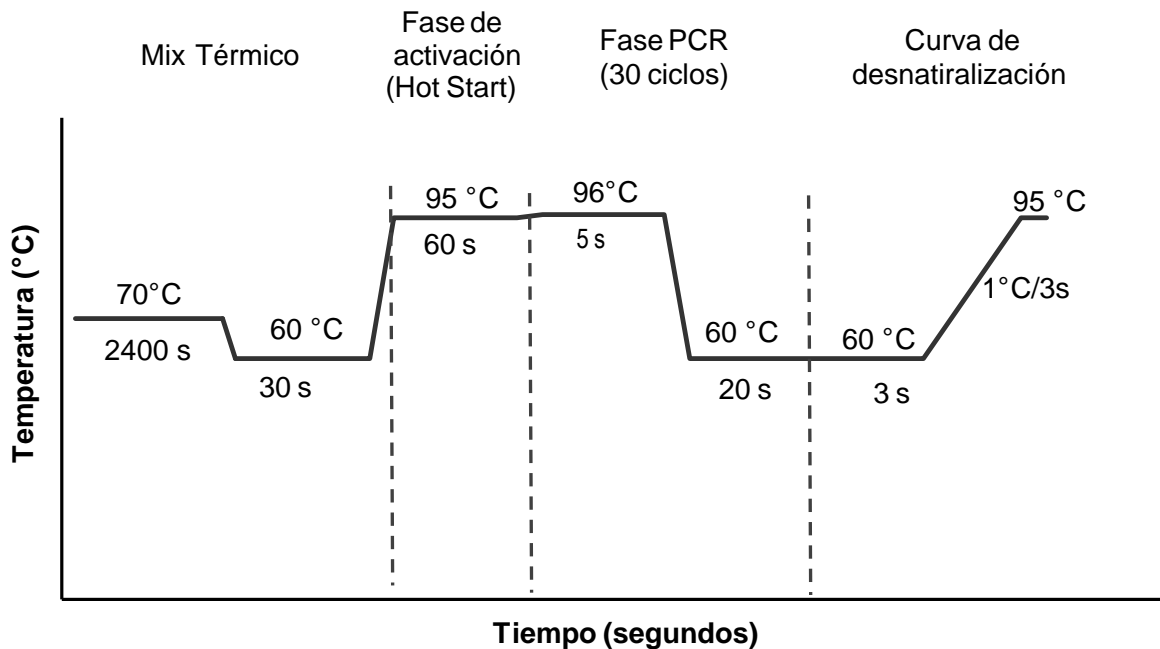


Gráfico 4. Condiciones de reacción para la detección de la expresión génica.

La PCR en tiempo real se realiza en el equipo Biomark™, previa preparación del chip en el equipo IFC Controller HX (Fluidigm, San Francisco, CA).

CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

La cuantificación de la expresión génica se realiza de forma relativa, es decir, la expresión de un gen de interés en determinada muestra es comparada con la expresión de un normalizador (un gen de constitutivo, p.e., la Glicerilaldehído-3-fosfato deshidrogenasa o GAPDH) en la misma célula bajo las mismas condiciones y con un control (en este caso, el promedio de la expresión del gen de interés en muestras sin estimular). Los resultados de esta comparación se expresan como *fold change* o unidades de expresión, e indican un cambio en los niveles de expresión del ARNm (tanto de incremento como de disminución) de las muestras tratadas en relación con las que no recibieron tratamiento. El gen constitutivo o *housekeeping* se emplea como control interno de variabilidad experimental.⁷⁴

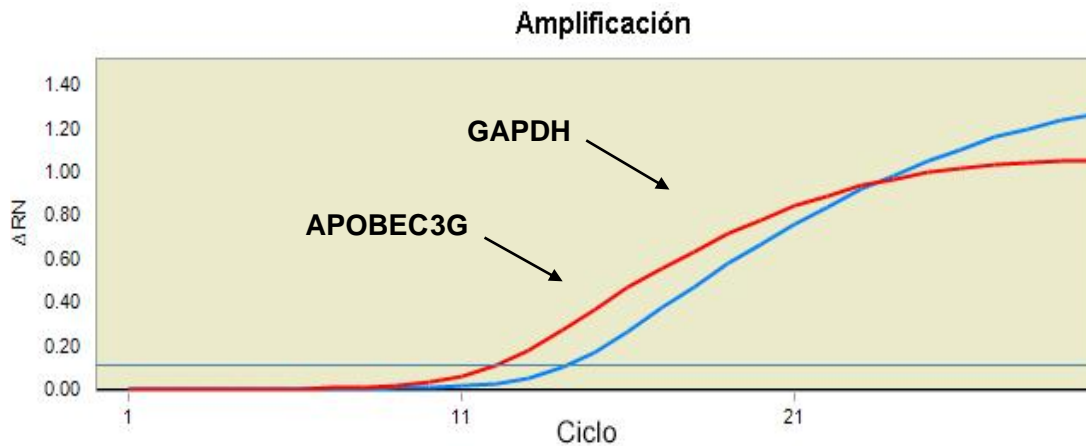


Figura 12. Gráfico de amplificación en tiempo real de APOBEC3G. Al realizarse una cuantificación relativa, se cuantificó la expresión de un gen constitutivo o de referencia, en este caso la Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa o GAPDH

El método de cuantificación empleado es $\Delta\Delta Ct$, donde se comparan directamente los Cts del gen analizado y gen constitutivo (ΔCt) en cada muestra, y posteriormente se comparan los ΔCt de la muestras experimental con respecto a la muestra control ($\Delta\Delta Ct$) La fórmula empleada para el cálculo del aumento de expresión es la siguiente:

$$\text{Fold change ó Unidades de expresión} = 2^{- (\Delta\Delta Ct)}$$

$$\text{Con } \Delta\Delta Ct = [(Ct_{i_XY}) - (Ct_{hk_XY})] - [(\bar{x}Ct_{i_Ctrl}) - (\bar{x}Ct_{hk_Ctrl})]$$

Donde:

* Ct_{i_XY} es el Ct del gen de interés de la población de estudio X con el estímulo Y

* Ct_{hk_XY} es el Ct del gen constitutivo (housekeeping) de la población de estudio X con el estímulo Y

* $\bar{x}Ct_{i_Ctrl}$ es el promedio de Cts del gen de interés en la condición sin estimular de los donadores sanos

* $\bar{x}Ct_{hk_Ctrl}$ es el promedio de Cts del gen constitutivo (hk) en la condición sin estimular de los donadores sanos

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos del aumento de expresión para cada gen en los diversos estímulos fueron analizados y comparados entre cada población de estudio con la ayuda de la página <http://elegans.som.vcu.edu/~leon/stats/utest.html> mediante la prueba estadística de Mann-Whitney y con el programa GraphPad Prism versión 6.00 para Windows, GraphPad Software, (La Jolla California, USA, www.graphpad.com.)

AMPLIFICACIÓN DEL GEN DE LA PROTEÍNA ACCESORIA VIF

Para la amplificación del gen *vif* se recurre a una PCR anidada, una modificación de la PCR convencional donde se utilizan dos pares de iniciadores con la finalidad de incrementar la sensibilidad y especificidad de la reacción. En la primera reacción se usa un grupo de iniciadores para una secuencia diana determinada (Tabla 8). A continuación se utiliza el amplicon obtenido como secuencia diana para la segunda reacción en la que se usan iniciadores que hibriden con las regiones internas del primer amplicon (Tabla 9).⁷⁷ Se utilizó el kit Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen, CA, USA) para ambas reacciones así como las condiciones de termociclado del gráfico 5.

Tabla 8. Mezcla para la primera reacción de amplificación de Vif.

Componente	Volumen/Reacción	Concentración Final
Amortiguador PCR 10X	2.5 µL	1X
dNTPs (10mM c/u)	0.5 µL	0.2 mM c/u
MgCl ₂ (50mM)	0.9 µL	1.5 mM
Primer Forward (20µM)	0.5 µL	0.4 µM
Primer Reverse (20 µM)	0.5 µL	0.4 µM
Enzima Taq Polimerasa Platinum	0.25 µL	1 U
H ₂ O	cbp	NA
ADNc	cbp	100 ng
Total	25.0 µL	---

Tabla 9. Mezcla para la segunda reacción de amplificación de Vif

Componente	Volumen/Reacción	Concentración Final
Amortiguador PCR 10X	2.5 µL	1X
dNTPs (10mM c/u)	0.5 µL	0.2 mM c/u
MgCl ₂ (50mM)	0.9 µL	1.5 mM
Primer Forward (20µM)	0.5 µL	0.4 µM
Primer Reverse (20 µM)	0.5 µL	0.4 µM
Enzima Taq Polimerasa Platinum	0.25 µL	1 U
H ₂ O	17.35 µL	NA
Producto de primera ronda de PCR	2.5 µL	100 ng
Total	25.0 µL	---

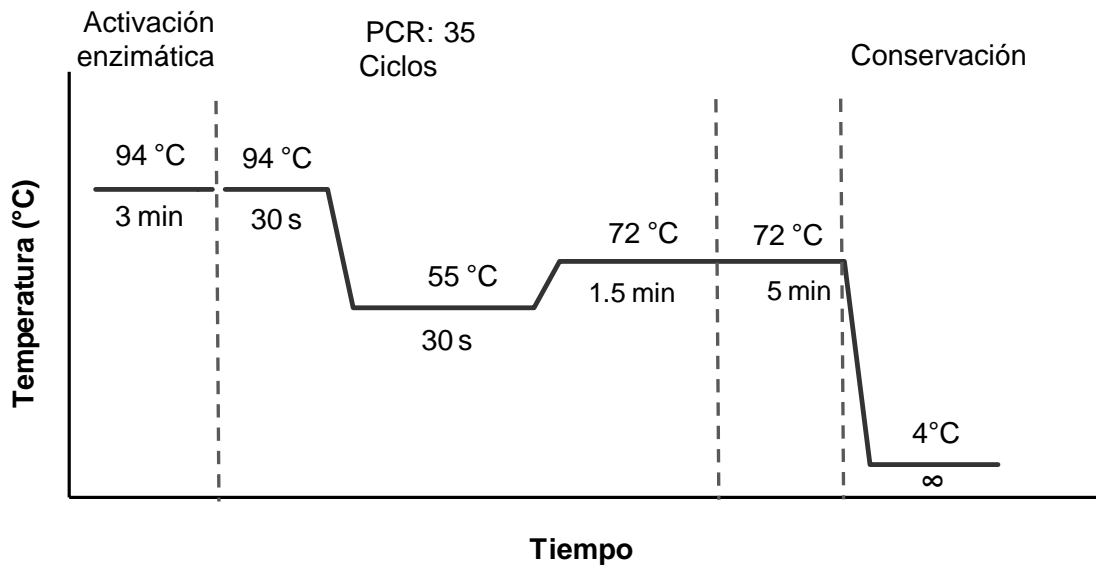


Gráfico 5. Condiciones de termociclado para la amplificación de Vif (ambas reacciones).

DETECCIÓN DE LOS PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN

Se analizan los productos de PCR por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con el marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, CA, USA) y bromuro de etidio como marcador de ácidos nucleicos.

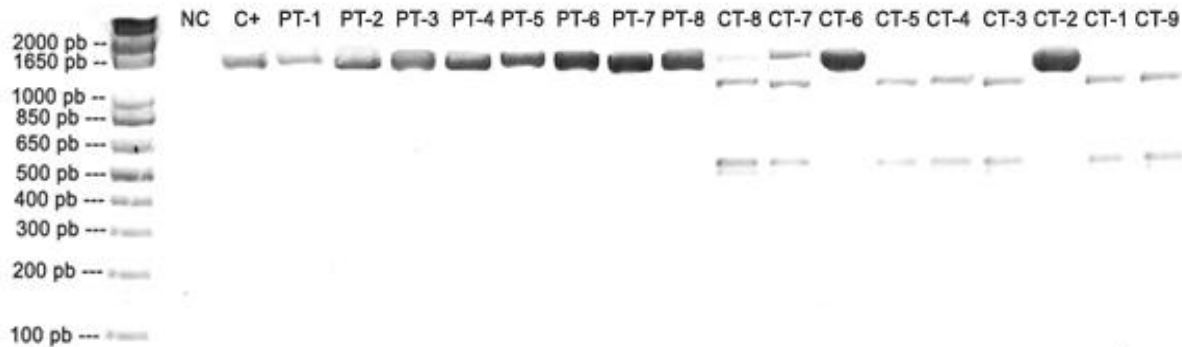


Figura 13. Detección de los productos de amplificación. NC=Control negativo, C+=Control positivo, PT= Progresor, CT= Controlador.

SECUENCIACIÓN DEL GEN DE LA PROTEÍNA ACCESORIA VIF

Para determinar el impacto de la proteína APOBEC3G en la integridad genética de la proteína accesoria viral Vif, se utilizó la secuenciación por el método de Sanger. El fundamento de esta tecnología es la incorporación de dideoxinucleótidos trifosfato (ddNTPs; Nucleótidos que carecen del grupo hidroxilo en el carbono 3', lo que impide la elongación de una hebra de ADN creciente) marcados con 4 fluorocromos, uno por cada base. El análisis de los fragmentos resultantes se realiza mediante electroforesis capilar. Los fluorocromos de los ddNTPs son excitados para la emisión de fluorescencia y la posterior traducción de esta señal a un electroferograma.

PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR

Previa la reacción de secuenciación es necesaria la purificación de los amplicones de Vif, con la finalidad de eliminar iniciadores, nucleótidos, polimerasa y sales residuales de la PCR que pudieran interferir con la reacción de secuencia.

Ambos protocolos de purificación utilizados emplean una membrana de sílica y diferentes amortiguadores para la unión selectiva del ADN presente en la muestra.

- Para los amplicones bien definidos en el gel de agarosa, es decir, los que presentaban únicamente una banda bien delimitada, se empleó el kit: *QIAquick® PCR Purification* (QIAGEN, México).
- Los amplicones que al ser analizados en el gel de agarosa presentaron bandas de amplificación inespecíficas cercanas al producto de interés se sometieron a la purificación mediante el Kit: *QIAquick® Gel Extraction* (QIAGEN, México).

REACCIÓN DE SECUENCIACIÓN.

Se llevó a cabo con el Kit *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, USA; Tabla 10) que proporciona los reactivos requeridos en un pre-mix listo para ser utilizado y las condiciones de reacción de la gráfica 6.

Tabla 10. Mezcla para la reacción de secuencia.

Componente	Volumen/Reacción	Concentración Final
BigDye® v3.1	1 µL	---
Buffer de secuenciación BigDye 5X	1 µL	1X
Primer (2 µM)	1 µL	0.4 µM
H₂O	1 µL	---
ADN	1 o 2 µL	---
Volumen Final	5 µL	---

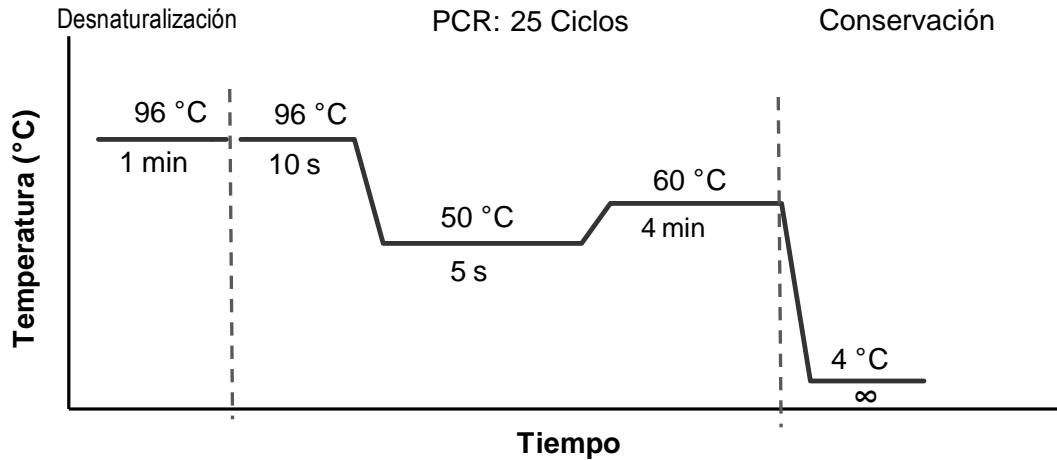


Gráfico 6. Condiciones de reacción para secuenciación de Vif.

PURIFICACIÓN DE LA REACCIÓN DE SECUENCIACIÓN.

Con la finalidad de eliminar impurezas como los ddNTPs que no fueron incorporados a la reacción, se realiza una purificación a cada uno de los pozos de reacción: Se colocan 13µL de una mezcla de Etanol/Acetato (2.5 volúmenes de etanol al 100% y 10% de Acetato de Sodio 3M, pH=5.2) para modificar el pKs y precipitar el ADN a analizar, posteriormente centrifugar la muestra a 2000g durante 20 minutos, terminado este tiempo, retirar la mezcla y a continuación adicionar 70µL de etanol al 70%, centrifugar a 2000g por 5 minutos. Finalmente eliminar el exceso de etanol y adicionar 20 µL de formamida a cada pozo de reacción para evitar la formación de estructuras secundarias.

SECUENCIACIÓN AUTOMATIZADA.

La separación, detección y análisis de los fragmentos de ADN marcados con fluorocromos se realizó en el equipo *ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, USA), un sistema de electroforesis capilar. Se utilizó el polímero POP-6 (Applied Biosystems, USA) como fase estacionaria y se llevó a cabo la secuenciación de acuerdo a las instrucciones en el manual de operación del equipo.

ANÁLISIS Y ALINEACIÓN DE SECUENCIAS.

Los electroferogramas obtenidos para cada una de las muestras fueron revisados de forma individual para asegurar la concordancia entre el electroferograma y la secuencia reportada por el equipo. El ensamble, unión de contiguos, y edición de secuencias se realizó con la herramienta bioinformática Staden Package.

ANÁLISIS DE HIPERMUTACIÓN EN EL GEN VIF

Para determinar si la proteína A3G causa hipermutación en el virus de la inmunodeficiencia humana, se analizan las secuencias obtenidas de las poblaciones de estudio utilizadas y se agregan 91 secuencias del gen Vif obtenidas con anterioridad por el grupo de investigación (Vázquez, JA et al, datos no publicados). Estas 91 secuencias proceden de muestras de pacientes del Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIENI).

La herramienta para el análisis de hipermutación (Hypermut 2.0) se encuentra disponible en el sitio: <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HYPERMUT/hypermut.html>. Donde todas las secuencias son alineadas con una secuencia de referencia, para este ensayo se utilizó el genoma del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1, cepa HXB2 (GenBank: K03455.1)

CUANTIFICACIÓN DE CARGA PROVIRAL

El ADN proviral o provirus es el ADN viral que se ha integrado en el genoma de la célula huésped. Para determinar el número de provirus insertados en el genoma de los individuos en las poblaciones de estudio, es necesario conocer el número copias del genoma de cada paciente presentes en las muestras utilizadas. Se empleó a la Ribonucleasa P (RNAsa P) para calcular el número de genomas presentes en cada muestra, pues cada molécula de ADN contiene una copia única del gen que codifica esta enzima, y conociendo la diploidía del genoma humano, es posible cuantificar el número de copias del genoma viral insertadas en cada

molécula de ADN o célula del hospedero, al relacionarlo con la cantidad de copias RNAsa P en cada una de las muestras.

PCR DIGITAL.

La PCR digital (dPCR) es una tecnología que permite la cuantificación de secuencias de ácidos nucleicos presentes en una muestra de DNA. Típicamente se basa en técnicas convencionales de PCR pero incrementa su sensibilidad al distribuir la muestra de forma aleatoria e independiente en cientos de pequeñas reacciones y realizar el ensayo de PCR a cada una de estas muestras.

Se utilizó el arreglo digital 12.765 Digital Array IFC (Fluidigm, San Francisco, CA), un biochip que divide la muestra en 765 cámaras de reacción, cada una con volumen de nanolitros. Posterior a la amplificación, únicamente las cámaras que contenían originalmente 1 o más copias de la secuencia blanco, emiten una señal que es cuantificada fácilmente y evaluada para significancia estadística.

Tabla 11. Mezcla de reacción para la cuantificación de ADN proviral mediante PCR digital

Componente	Volumen por pozo	Volumen para un arreglo dinámico IFC 12.765 (con exceso)
TaqMan® Gene Expression Master Mix^a	5.0 µL	65 µL
Reactivo de Carga para muestras, GE (20X)^b	0.5 µL	6.5 µL
Mezcla de iniciadores y sondas para VIH	2.5 µL	32.5 µL
Mezcla RNAsaP 20x^c	0.5 µL	6.75 µL
H₂O	0.5 µL	6.75 µL
ADN	1.5 µL	---

^a Applied Biosystems, USA.

^b Fluidigm, San Francisco, CA.

^c Contiene iniciadores y sondas específicos para la amplificación y detección de la Ribonucleasa P. Life Technologies, Carlsbad, CA, USA

PCR EN TIEMPO REAL.

Se llevó a cabo en el equipo *Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, USA). Se realizó por triplicado una curva estándar de 10 puntos con un factor de dilución 1:3 considerando 90,000 copias como punto más alto y realizando las diluciones seriales correspondientes.

Tabla 12. Mezcla de reacción para la cuantificación de ADN proviral mediante PCR en tiempo real.

Componente	Volumen por reacción
TaqMan® Gene Expression Master Mix ^a	25.0 µL
Mezcla de iniciadores para VIH-1(Fw+Rv)	2.0 µL
Sonda para VIH	1.0 µL
Mezcla RNAsaP	2.5 µL
ADN	19.5 µL
Total	

50.0 µL

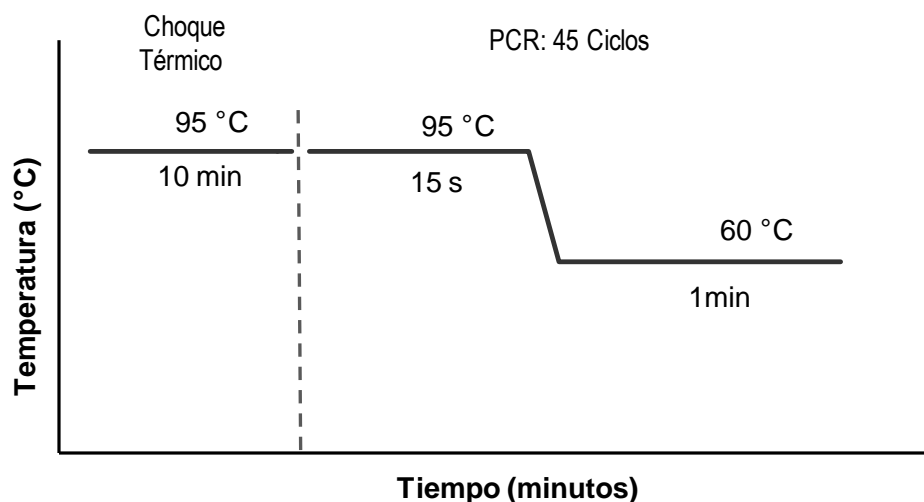


Gráfico 7. Condiciones de ciclado para la cuantificación de ADN proviral mediante PCR en tiempo real.

En ambos métodos se utilizó como control positivo ADN de la línea celular ACH-2, caracterizada por poseer únicamente una copia de ADN proviral de VIH-1 integrada. Como control negativo se utilizó ADN de un donador sano.

CÁLCULO DEL NÚMERO DE COPIAS DE ADN PROVIRAL

Considerando que 3.08pg de ADN contienen una copia de RNAsa P y debido a la naturaleza diploide del genoma humano, sabemos que en cada célula existen dos copias de RNAsa P (6.16 pg). El cálculo de copas del genoma en cada muestra se realiza de la siguiente forma:

$$\text{Copias de genoma en cada muestra} = \frac{\text{Concentración ADN (pg/}\mu\text{L)}}{6.16 \text{ pg}}$$

Se divide el número de copias de DNA proviral cuantificado por el software en el número de genomas presentes para cada muestra. Finalmente el resultado se expresa en copias de ADN proviral por 1 millón de genomas:

Copias ADN proviral:

$$= \left(\frac{\text{Copias de ADN proviral cuantificadas por el equipo}}{\text{Copias de genoma en cada muestra} * \text{Volumen de muestra}} \right) * 1x10^6 \text{ genomas}$$

DETERMINACIÓN DE LA PRESIÓN DE SELECCIÓN EVOLUTIVA EJERCIDA POR APOBECE3G EN EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA

La detección y cuantificación de las presiones evolutivas ejercidas por hA3G en el genoma del VIH-1 que contribuyen a la variación genética del virus, fueron analizadas con el servidor Datamonkey (<http://www.datamonkey.org>). El servidor permite identificar sitios de rápida evolución o inusualmente conservados en las regiones codificantes de las secuencia, esto empleando métodos estadísticos que

se basan en la tasa de sustituciones nucleotídicas sinónimas (dS) y no sinónimas (dN) y en pruebas estadísticas para determinar si $dN \neq dS$ y por ende la existencia de eventos de selección. Se considera que cuando el ratio $dN/dS < 1$ existe selección purificadora, o negativa, y que cuando el ratio posee un valor mayor a 1, la selección ejercida es diversificadora o positiva.⁷⁸

Para la detección de sitios bajo selección se emplearon los siguientes métodos, todos basados en máxima probabilidad:

- **SLAC (*Single likelihood ancestor counting*):** Procesa alineamientos utilizando longitudes de ramas y parámetros de sustitución de nucleótidos y codones y reconstituciones ancestrales. Puede detectar evolución no neutral en alineamientos de gran tamaño (> 50 secuencias).
- **FEL (*Fixed effects likelihood*):** La probabilidad de efectos fijos es un método nuevo basado en probabilidad y estadística para adaptar valores independientes de dN y dS para cada sitio, en el contexto de modelos de sustitución de codones y comprobar si $dN \neq dS$. Tiende a ser menos conservativo que SLAC en conjuntos de datos de tamaño intermedio (20-50 secuencias)

RESULTADOS

CARACTERÍSTICAS DE LA COHORTE

Se analizaron dos cohortes de individuos infectados con VIH-1 para el estudio del efecto antirretroviral de la proteína APOBEC3G. Los pacientes fueron seleccionados de las cohortes de pacientes del Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIENI) del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER). Todas las muestras se proporcionaron bajo consentimiento escrito de los individuos participantes.

Se utilizaron muestras de donadores sanos como controles negativos. Las 5 muestras utilizadas procedieron del banco de sangre del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

El grupo de pacientes controladores (CTs) fue conformado por individuos que cumplían los criterios clínicos y de laboratorio de acuerdo al consorcio internacional de estudio de controladores del VIH-1.⁴⁵ De acuerdo a esto definimos como controladores a los individuos que presentan infección por el VIH-1 por al menos un año y de forma consistente han tenido cargas virales menores a 2000 copias/mL, sin tomar ningún tratamiento antirretroviral. Se estudiaron 9 pacientes con estas características, la media de linfocitos T CD4⁺ periféricos de esta cohorte fue de 936 células/ μ L de sangre (rango: 347 – 2027 células/ μ L de sangre) y la carga viral promedio de 525 copias/mL de sangre con un rango de <40 a 1138 copias/mL de sangre (Tabla 13).

La cohorte de pacientes progresores (PTs), comprendió individuos que presentan las características típicas de la infección crónica por VIH. Se seleccionaron 8 pacientes con cargas virales elevadas, media: 171, 243 copias /mL de sangre (rango: 11,956 – 1, 141,401 copias /mL sangre) y niveles de

linfocitos T CD4⁺ menores a 500 células/μL de sangre (media: 364 células/μL de sangre; rango: 212 – 487 células/μL de sangre; Tabla 13).

Tabla 13. Características clínicas de las cohortes

Parámetro clínico	Controladores	Progresores
Número de Pacientes	9	8
Carga Viral (copias de ARN viral/mL de sangre)	Media: 526 Rango: <40 - 1138	Media: 171,243 Rango: 11,956 – 1,141,401
Linfocitos T CD4 ⁺ (células/μL de sangre)	Media: 936 Rango: 347 - 2027	Media: 364 Rango: 212 - 487

La carga viral de los pacientes progresores fue significativamente mayor con respecto a los controladores ($p < 0.0001$, Mann-Whitney) contrario a los niveles de linfocitos T CD4⁺ que fueron significativamente más altos ($p = 0.0016$, Mann-Whitney) en pacientes controladores que en progresores (Figura 14 A y B). Así mismo se observa que los niveles de carga viral correlacionan significativa y negativamente ($r = -0.8785$; $p < 0.0001$) con los niveles de linfocitos T CD4⁺ (Figura 15).

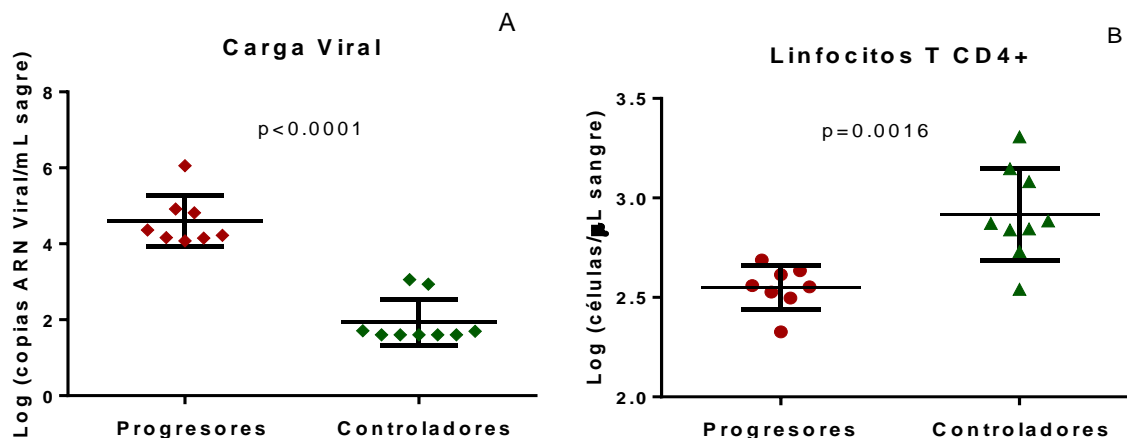


Figura 14. Carga viral y Linfocitos T CD4⁺ de las cohortes estudiadas. A) Cargas virales en ambas poblaciones. Es importante considerar que algunos de los pacientes presentaron cargas virales indetectables, por lo que se consideró el menor límite de detección del equipo utilizado con fines de análisis. Se muestran las medias y \pm DE para cada grupo, el valor p representado se calculó mediante una prueba de Mann Whitney. B) Recuento de linfocitos T CD4⁺, al ser un indicador de progresión de la enfermedad, se seleccionaron pacientes progresores con niveles menores de 500 células/uL de sangre, pero mayores a 300 células/uL de sangre. Se muestran las medias y \pm DE para cada grupo.

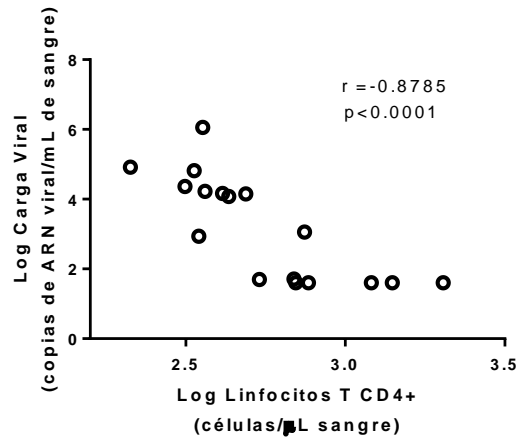


Figura 15. Correlación entre el recuento de linfocitos T CD4⁺ periféricos y cargas virales de los pacientes en estudio. Los datos fueron analizados mediante una correlación Spearman.

CUANTIFICACIÓN DE ADN PROVIRAL

La cuantificación de ADN proviral se realizó mediante dos tecnologías: PCR digital y PCR en tiempo real. El resultado final de ambas metodologías es distinto pues la cantidad de copias detectadas por cada millón de genomas analizado en PCR digital es mayor por un orden de magnitud con respecto a las detectadas en PCR en tiempo real, es importante mencionar la diferencia en la cantidad de muestra utilizada para cada método, puesto que en PCR digital se utiliza únicamente un microlitro, aspecto que puede interferir en una toma homogénea de la muestra y por ende en la fidelidad de los resultados obtenidos, mientras que para la PCR en tiempo real se emplean 19.5 microlitros de muestra, dato que sugiere una mayor homogeneidad en la cantidad de ADN presente en la muestra analizada. Para la PCR en tiempo real se logró un límite de detección de una copia de ADN proviral por millón de células (genomas), para el caso de la PCR digital la menor cantidad de copias que pudieron detectarse fue 29 (Tabla 14).

La curva patrón y las muestras extrapoladas para la cuantificación de la carga viral por medio de PCR en tiempo real, puede consultarse en el anexo (Figura A1)

Tabla 14. Carga proviral cuantificada en controladores y progresores

CONTROLADORES			PROGRESORES	
	PCR Tiempo Real	PCR Digital	Paciente	PCR Tiempo Real
Paciente	ADN proviral (copias / millón de PBMCs)	ADN proviral (copias / millón de PBMCs)		ADN proviral (copias / millón de PBMCs)
CT-1	26	0	PT-1	377
CT-2	71	0	PT-2	181
CT-3	13	102	PT-3	1149
CT-4	Indetectables	466	PT-4	45
CT-5	Indetectables	NC	PT-5	235
CT-6	20	200	PT-6	543
CT-7	2	81	PT-7	15
CT-8	640	1208	PT-8	12
CT-9	8	29		

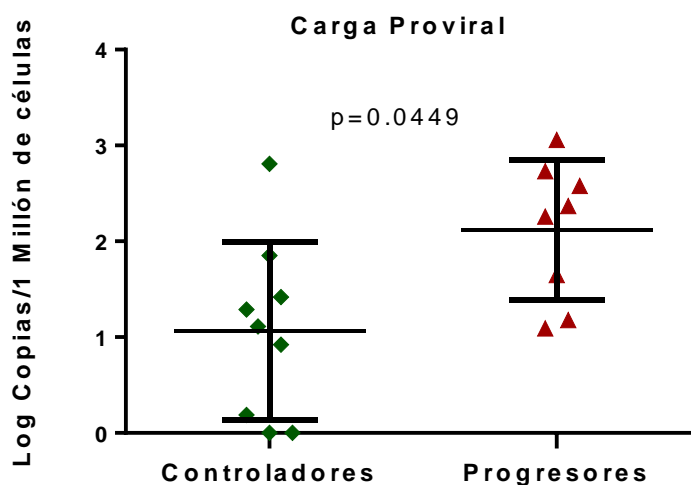


Figura 16. Carga proviral en las poblaciones estudiadas. Se muestra la carga proviral para cada una de las cohortes, se observa una diferencia significativa en la cantidad de provirus insertados en el genoma del hospedero para los pacientes controladores. Se muestra el resultado de la prueba Mann-Whitney

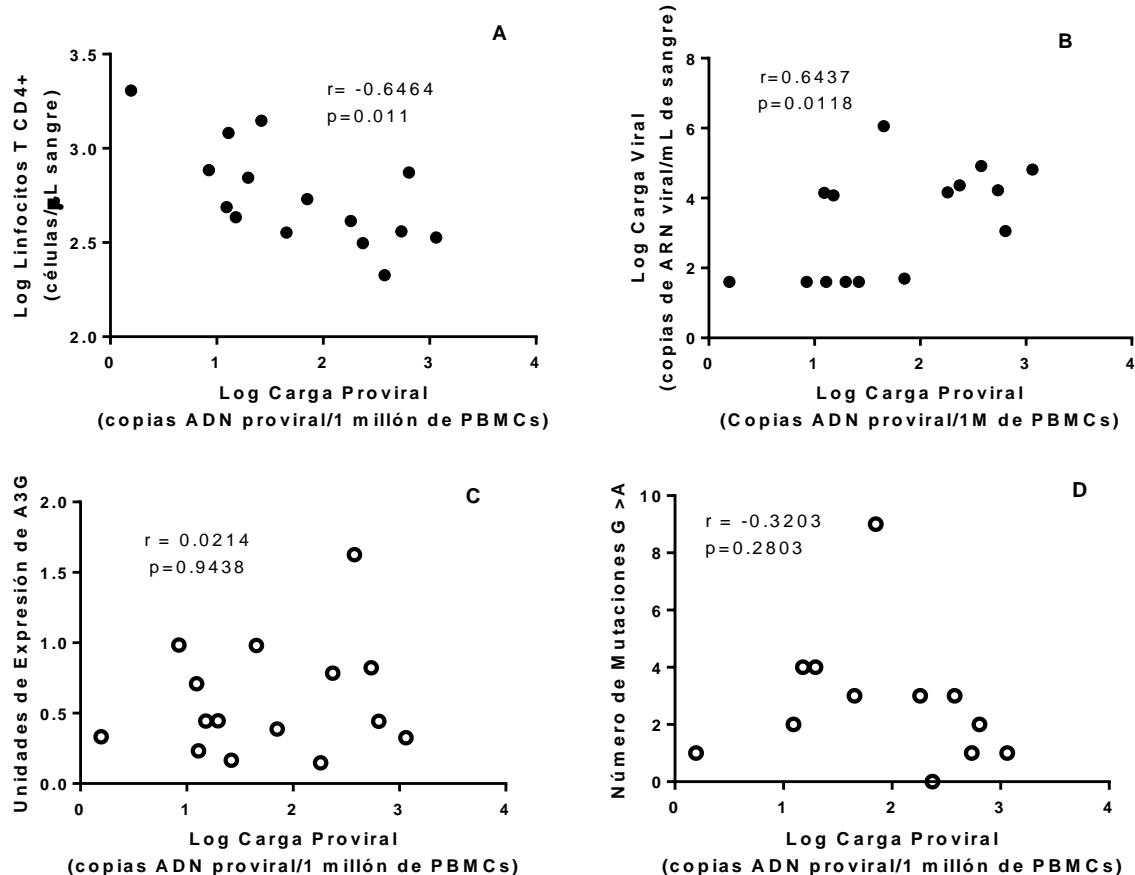


Figura 17. Carga proviral y su relación con las características clínicas de las cohortes, la expresión basal de APOBEC3G y el número de mutaciones G \Rightarrow A. A) Carga proviral y su correlación con los niveles de linfocitos T CD4⁺, se observa una correlación inversa de significancia. B) Correlación entre la carga proviral y la carga viral de cada uno de los pacientes. C) Relación entre la carga proviral y la expresión basal del factor antirretroviral APOBEC3G. D) Correlación del logaritmo de carga proviral con el número de cambios G \Rightarrow A identificados en cada uno de los pacientes. En cada una de las gráficas se muestran los resultados del análisis de correlación Spearman.

En dos de los controladores (CT-4 y CT-5) no fue posible la detección de ADN proviral, ambos pacientes presentaron cargas virales indetectables. y es posible observar una diferencia significativa (Mann-Whitney) entre el número de copias provirales integrado para los controladores y los progresores (media=111 versus 320 copias por millón de PBMCs respectivamente; Figura 16). Asimismo, niveles más altos de linfocitos T CD4⁺ correlacionaron significativa y negativamente con el

número de copias detectado para cada paciente (Spearman; $p=0.01$; Figura 17 A). Contrariamente, los niveles de carga viral correlacionaron significativamente y de manera positiva con la carga de ADN proviral (Figura 17 B), esto nos demuestra que a mayor carga viral, (y menor cantidad de linfocitos T CD4⁺) la cantidad de copias de ADN viral insertadas en el genoma humano son mayores.

Por otro lado, se observa una tendencia positiva entre la carga proviral en las poblaciones estudiadas y la expresión basal de la proteína APOBEC3G (Figura 17 C), de forma contraria existe una tendencia negativa entre el número de cambios G \Rightarrow A observados a lo largo de la secuencia del gen *vif* y la carga proviral en cada uno de los pacientes (Figura 17 D). A pesar de estas tendencias no se observa una correlación significativa (Spearman).

ANÁLISIS DE HIPERMUTACIÓN DEL FACTOR DE INFECTIVIDAD VIRAL

Con la finalidad de analizar de forma indirecta la actividad de citidin deaminasa de la proteína APOBEC3G (A3G) *in vivo*, se analizó la hipermutación en el gen *vif*. Es bien sabido que A3G, como factor antirretroviral celular provoca hipermutación en el genoma viral y que tal actividad es neutralizada por la proteína Vif.

Para que un provirus pueda considerarse hipermutado, debe ser sometido a gran cantidad de cambios de G \Rightarrow A, tales mutaciones pueden resultar en una replicación defectuosa del virus debido a la introducción de nuevos codones de paro.

Las mutaciones G \Rightarrow A en el contexto de APOBEC3G (GG \Rightarrow AG) y APOBEC3F (GA \Rightarrow AA), donde la base desaminada es la subrayada, fueron analizadas mediante la herramienta bioinformática *Hypermut 2.0* de la base de datos de los Álamos. Únicamente fue posible la amplificación de la proteína viral en 4 de los 9 controladores analizados, esto puede deberse a que la mayoría de los controladores presentaban cargas virales y provirales bajas o indetectables. Al

comprobar la amplificación (Figura 13), tales controladores presentaban bandas inespecíficas cerca del sitio de amplificación de Vif esto puede ser indicador de secuencias virales defectuosas insertadas en el genoma del paciente debido a tasas elevadas de cambios G⇒A, o a la presencia de ambigüedades en los sitios de empalme de los iniciadores empleados. Una vez obtenidas las secuencias, fueron alineadas con la secuencia de referencia HXB2 (GenBank: K03455.1), así como con una secuencia consenso elaborada a partir de 91 secuencias provirales de Vif en pacientes mexicanos obtenidos previamente en el grupo de trabajo (Vázquez JA, et al, datos no publicados), esto con la finalidad de identificar las hipermutantes en las cohortes de estudio con respecto al virus circulante en la población y evitar la detección de mutaciones fuera del contexto inmunogenético de la población mexicana.

Las secuencias se consideraron hipermutadas cuando presentaban un valor $p < 0.05$ en la prueba exacta de Fisher que compara el número de cambios G ⇒ A en contexto de las proteínas APOBEC3G (GG ⇒ AG) y APOBEC3F (GA ⇒ AA) versus las presentes en las secuencias consenso empleadas. Tales valores fueron proporcionados por la herramienta Hypermut 2.0.

La Figura 18 indica el número y tipo de mutaciones identificadas para cada una de las secuencias, donde puede observarse que una secuencia de vif de los pacientes controladores se identificó como hipermutada ($p < 0.05$). Además de presentar una mayor cantidad de sustituciones G⇒A dentro de un contexto APOBEC3G (azul) y APOBEC3F (rojo), esta secuencia posee un nuevo codón de paro, representado por el punto azul (codón 70). El individuo controlador con secuencias provirales hipermutadas (CT-2) se indica en la Figura 18 con un asterisco.

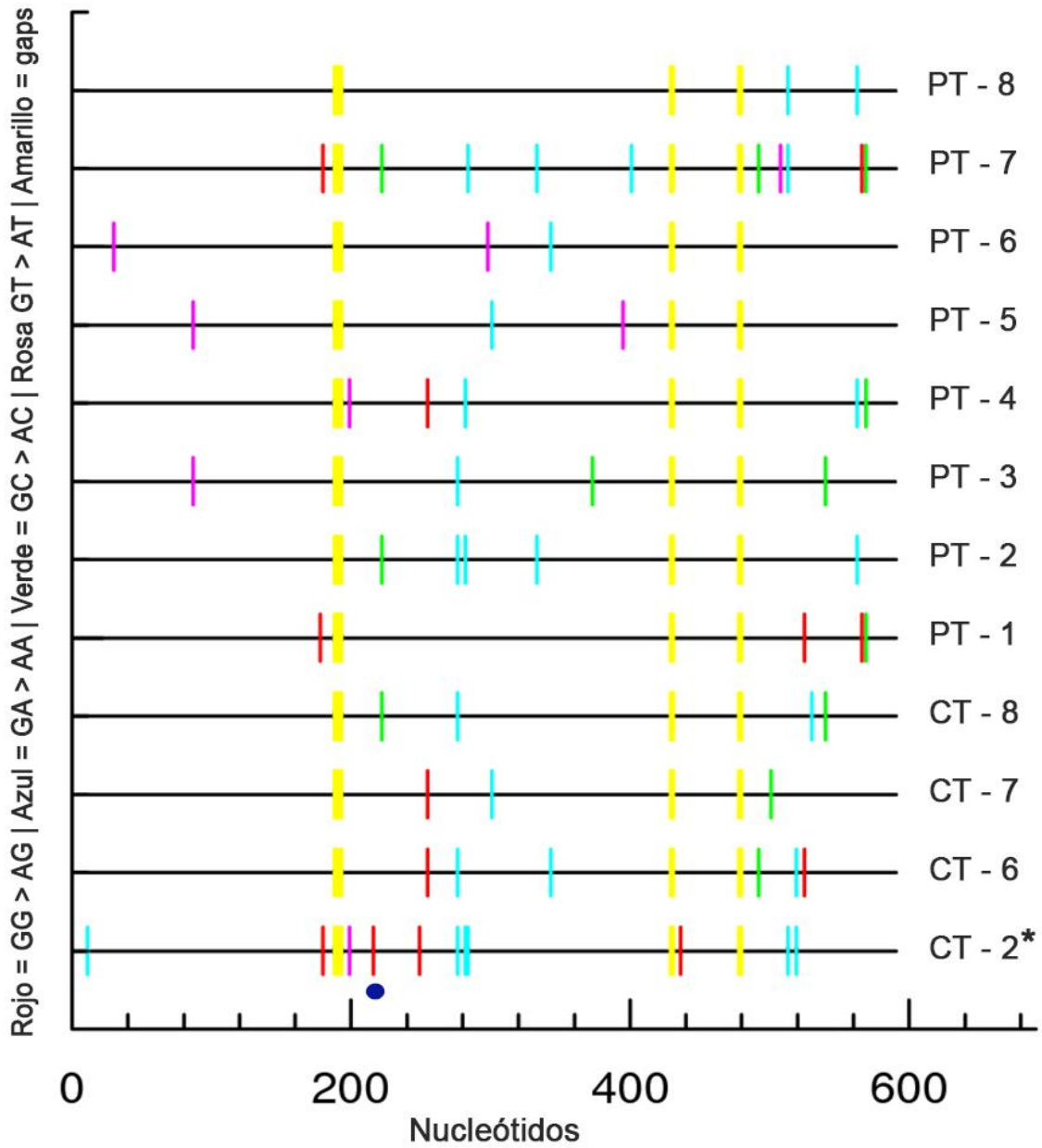


Figura 18. Posición relativa de las mutaciones identificadas en cada secuencia proviral del gen *vif* de pacientes controladores y progresores. Las barras de color rojo indican una mutación en contexto de APOBEC3G (GG \Rightarrow AG), mientras que las barras de color azul indican las mutaciones en contexto de APOBEC3F (GA \Rightarrow AA). El punto azul representa el codón de paro identificado. El asterisco señala la secuencia que presentó un número significativo de mutaciones ($p < 0.05$; Fisher).

Los pacientes progresores presentaron un rango de mutaciones G⇒A de [1-4] cambios G⇒A en la secuencia del gen *vif*, mientras que el grupo de los controladores presentó un rango de mutaciones de [1-9] cambios G→A (Figura 19A). No se observó una diferencia significativa entre las hipermutaciones de ambas poblaciones; sin embargo, es necesario retomar las dificultades presentes durante la amplificación proviral.

Con la finalidad de asociar la actividad de hipermutación de A3G y A3F con los principales parámetros de progresión de la enfermedad, se realizó un análisis de correlación Spearman (Figura 19B) relacionando el número de cambios G⇒A observados en cada paciente con sus respectivas cargas virales, observando una tendencia que sugiere que a mayor carga viral existen menos cambios G⇒A .

Por otra parte, se correlacionaron los cambios G⇒A de todas las secuencias disponibles de *vif* con las cuentas de linfocitos T CD4⁺, (Figura 20) encontrándose una tendencia donde el número de mutaciones G⇒A es más elevado en pacientes con mayores niveles de linfocitos T CD4⁺ (r=0.02354, P=0.8276).

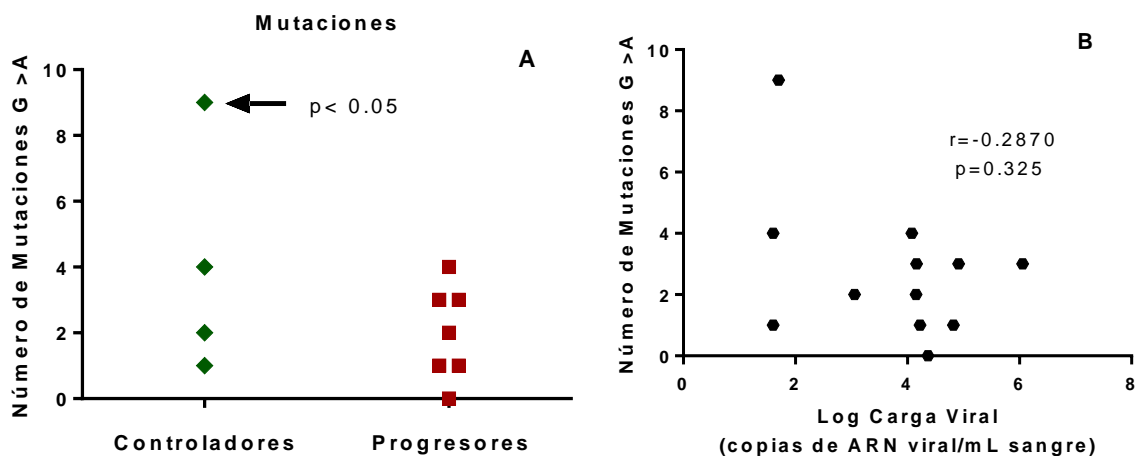


Figura 19. Cambios G⇒A en CTs y PTs y su relación con la carga viral. A) Mutaciones identificadas en las cohortes de estudio. Se muestra el número de mutaciones identificadas en el gen *vif* amplificado de las PBMCs de cada paciente analizado. El paciente CT-2 presentó un número de cambios G⇒A superiores al resto de los individuos, tal secuencia se considera hipermutada (p<0.05). B) Correlación entre los niveles de carga viral con el número de cambios G⇒A detectados en la secuencia del gen *vif* de los sujetos de estudio, Se indica el análisis de correlación Spearman (r=-0.2870; p=0.325)

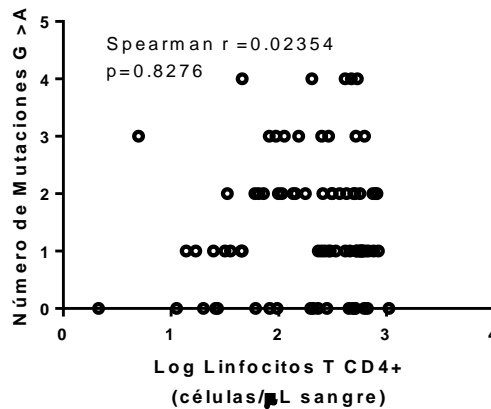


Figura 20. Correlación entre el número de mutaciones G ⇒A y el recuento de linfocitos T CD4+ periféricos. Se muestran los resultados del análisis de correlación Spearman.

ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE LOS GENES APOBEC3

Con la finalidad de evaluar la actividad inhibitoria de la replicación viral del factor de restricción APOBEC3G (A3G), se realizó la cuantificación de las unidades de expresión génica de la familia APOBEC3 en su estado basal, bajo la influencia de antígenos del VIH-1 e interferón α (IFN- α).

No se encontró diferencia significativa en la expresión basal de A3G entre los grupos analizados (Figura 21 A) así como una relación entre la expresión basal de A3G y la carga viral de los pacientes (Figura 21B), o el recuento de linfocitos T CD4⁺.

De todos los miembros de la familia APOBEC3, fue APOBEC3B el que presentó una mayor expresión en las dos poblaciones analizadas, observándose un incremento importante de más de cien unidades o veces de expresión (n fold) bajo el estímulo de IFN- α en ambas cohortes y un incremento significativo ($p < 0.05$, Mann-Whitney) en pacientes progresores bajo el estímulo de RNA40 y las células

sin estimular con respecto a los pacientes controladores, (Figura 22). Otro dato significativo fue el incremento de APOBEC3A en PTs con respecto a CTs con RNA40 como estímulo.

Por el contrario el elemento de la familia que presentó una menor expresión fue APOBEC3G, además de que no se encontró diferencia significativa en su expresión en las cohortes de estudio.

No se observó algún patrón que indicara que alguno de los estímulos utilizados fuese el mejor inductor de la expresión de esta familia

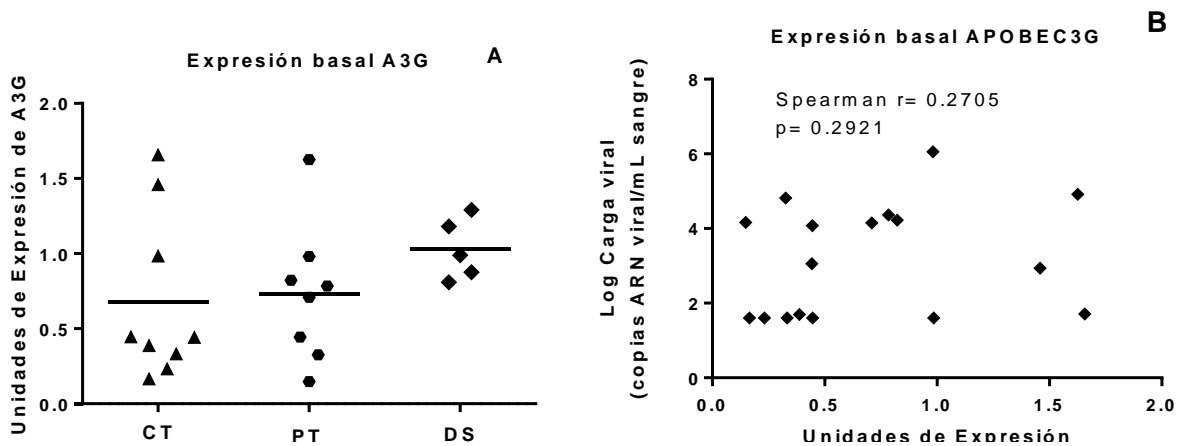


Figura 21. Expresión basal de A3G en CT, PT y DS y su relación con la carga viral. A) Resultados de las unidades de expresión basal del ARNm de A3G en pacientes controladores, progresores y sujetos sanos, las líneas horizontales representan las medias de expresión. B) Relación entre el logaritmo de la carga viral y las unidades de expresión basal de A3G, se indica el análisis de correlación Spearman.

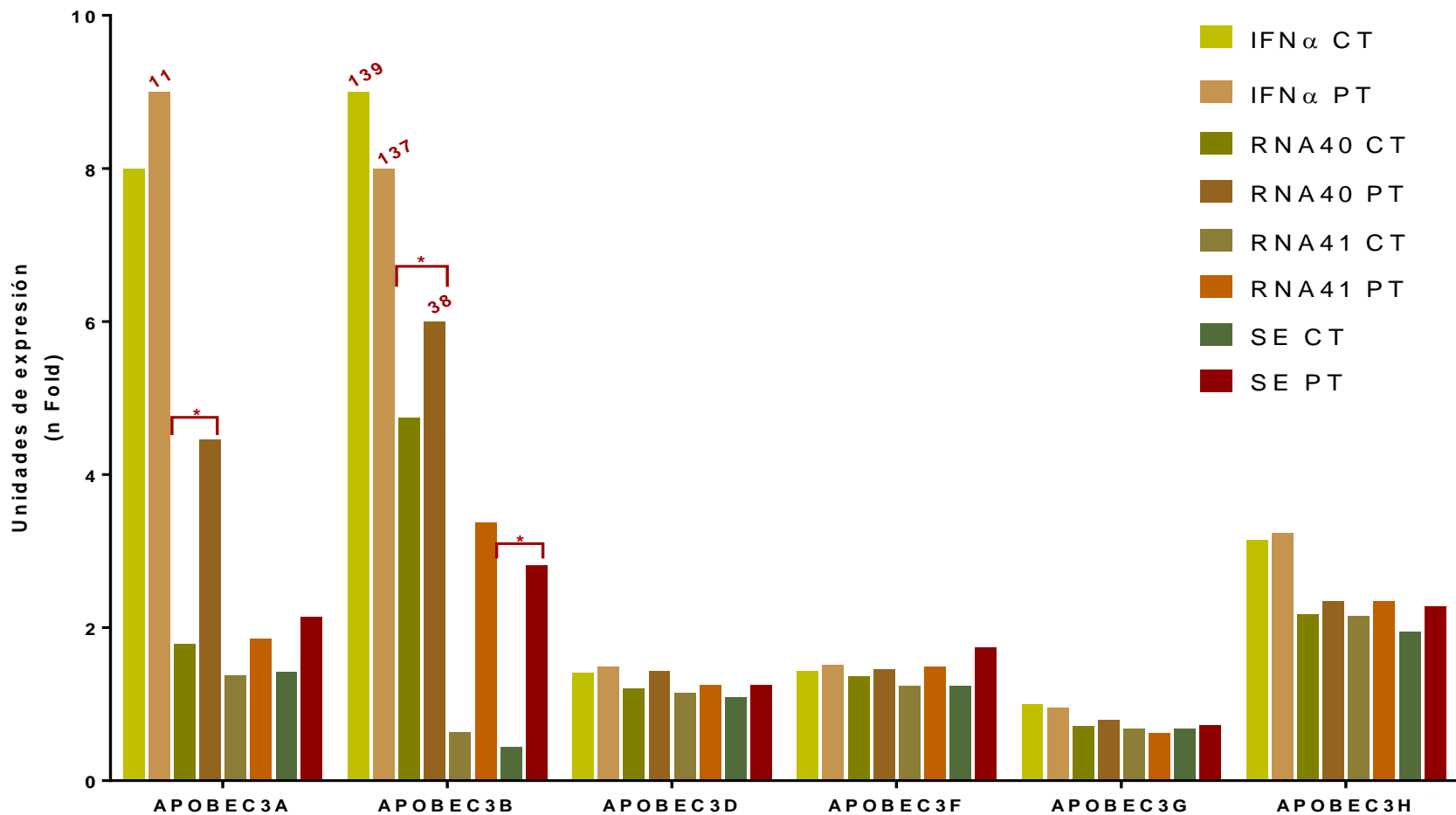


Figura 22. Cuantificación de la expresión génica de la familia APOBEC3. Se muestran los niveles de expresión para cada miembro de la familia bajo diferentes estímulos en ambas poblaciones. La expresión se reporta en unidades de expresión (fold increase). Se indica el valor numérico del incremento para algunos genes con expresión por encima del resto. La diferencia significativa ($p < 0.05$, Mann-Whitney) en la expresión de un gen entre controladores y progresores es indicada con un asterisco. IFN α = Interferón alfa; RNA40= Oligonucleótido análogo al ARN viral; RNA41=Oligonucleótido, control negativo para el estímulo de RNA40; SE= Células sin estímulo; CT= Controladores; PT= Progresores.

DETERMINACIÓN DE LA PRESIÓN DE SELECCIÓN EVOLUTIVA EN EL GEN *vif*. ANÁLISIS POR MODELOS DE SUSTITUCIONES SINÓNIMAS Y NO SINÓNIMAS.

Como se describió anteriormente, la proteína APOBEC3G induce sustituciones de guanosina por adenosina en el genoma viral, esta hipermutación puede ocasionar la aparición de codones de paro, seguidos de una completa pérdida de los marcos de lectura de los genes virales. Para determinar si existe presión evolutiva sobre el VIH-1 debida a APOBEC3G se analizó la secuencia de aminoácidos de la proteína Vif y se determinó la tasa de cambios sinónimos (dS) y no sinónimos (dN) para cada sitio de la secuencia de la proteína viral. Esto permitió identificar los sitios que se encuentran bajo una selección positiva, en otras palabras, que tienden a la variación, y que podrían favorecer el escape del virus a los factores inmunes del ser humano o bajo una selección negativa, favoreciendo la conservación del aminoácido, actuando así en desventaja para el agente infeccioso. Cuando los cambios sinónimos y no sinónimos son significativamente diferentes proporcionan una evidencia convincente de una evolución no neutral del genoma en estudio. Para esta identificación, tras la amplificación del fragmento del genoma viral codificante para Vif, se alinearon las secuencias nucleotídicas, mismas que fueron traducidas a aminoácidos mediante la herramienta bioinformática MEGA 5. Tales alineamientos fueron sometidos a un análisis de selección purificadora o diversificadora en el servidor de análisis de secuencias <http://www.datamonkey.org/>⁷⁹ de la Universidad de California, se utilizaron dos métodos: SLAC y FEL empleando el modelo de nucleótidos REV (General Reversible Model). Para ambos métodos se seleccionaron los codones bajo una selección positiva o negativa con una significancia menor a 0.01 (p value)

En la Tabla 15 se muestran únicamente los codones inferidos con selección positiva y en la Tabla 16 los sitios inferidos con selección negativa por ambos métodos. Se muestra el valor numérico normalizado (dN-dS Normalizado) de la relación (dN-dS)/(Longitud del árbol de codones) donde dN es la relación de los

cambios no sinónimos observados con los estimados y dS la relación de los cambios sinónimos observados con los estimados para cada uno de los codones, así mismo se muestra la probabilidad de que una sustitución aleatoria genere un cambio no sinónimo (Valor p). Podemos observar que esta probabilidad es menor a 0.01 para todos los codones, y que ambos métodos coinciden en la selección inferida para los codones mostrados.

La selección ejercida en cada uno de los codones de la proteína Vif se muestra en la Figura 23, por fines prácticos se presenta únicamente el gráfico con los valores dN-dS obtenidos por el método SLAC, no obstante, como se mostró previamente, el análisis por ambos métodos resultó en el mismo patrón de selección. Los codones seleccionados positivamente son los que presentaron una tasa mayor de cambios no sinónimos con respecto a los cambios sinónimos y que por ende, tienden a la variación, característica que podría proporcionar una mayor diversidad genética que favorezca el escape del virus a los factores de restricción del genoma humano o una replicación viral más eficiente. Se puede observar que existen codones que presentan este tipo de selección y que se encuentran dentro de un motivo funcional en Vif. Entre estos se encuentran el codón R93G/S/E/K/N que forma parte de la región hidrofílica E⁸⁸WRKK⁹³, caracterizada por favorecer la expresión de Vif en la célula hospedera, y los codones N122K/Q/H/R/S, R128I/V/L/K, R132S/K/E/I y A137T, todos localizados dentro del motivo H¹⁰⁸CCH¹³⁹, encargado de la coordinación de un ión de Zn²⁺ y el reclutamiento del complejo ubiquitin-ligasa para la degradación proteosomal de las proteínas APOBEC3. Por otro lado, una gran cantidad de codones presentaron selección negativa, (o una tasa mayor de sustituciones sinónimas con respecto a las no sinónimas y que son conservados) y se localizaron dentro de un motivo funcional de Vif, fueron: L24, V25, H43, G71, L72, E171 y D172 todos pertenecientes a los sitios de reconocimiento de APOBEC3G y APOBEC3F para su degradación, E88 y R90 localizados dentro de la región hidrofílica E⁸⁸WRKK⁹³, I107, H108, Y111, A119, R121, S130, Y135 y H139 del motivo H¹⁰⁸CCH¹³⁹, S144, L145, Q146 y L148

del motivo SOCS que interacciona con las proteínas EloB y EloC del complejo ubiquitin-ligasa y todos los codones del motivo de multimerización de Vif rico en prolina P¹⁶¹PLP¹⁶⁴. Estos resultados nos indican que existe una presión de selección mayoritariamente negativa dentro de los dominios funcionales de Vif, por lo tanto es probable que la interacción con A3G y A3F ejerza una presión evolutiva sobre el VIH-1 mayormente deletérea de la replicación.

Tabla 15. Sitios Seleccionados Positivamente en la proteína Vif de VIH-1

Codón	SLAC		FEL	
	dN-dS Normalizado	Valor p	dN-dS Normalizado	Valor p
19	1.9325	1.6E-03	0.4831	4.4E-03
33	1.5314	5.1E-03	0.3929	6.8E-04
37	2.3019	8.6E-05	0.5083	6.2E-04
39	2.3844	7.1E-04	0.7763	1.8E-03
63	2.1729	1.5E-03	0.7704	1.8E-04
93	1.9490	2.3E-04	0.4828	1.7E-04
95	2.3107	2.5E-03	0.6928	3.2E-04
102	1.3396	3.7E-03	0.3516	5.1E-03
128	1.5622	2.5E-03	0.4400	4.2E-04
132	1.5496	2.1E-03	0.3529	1.6E-03
137	0.9120	3.4E-03	0.1808	2.6E-03
151	2.3934	3.4E-07	0.5324	4.9E-07
158	1.9744	3.3E-04	0.5085	1.1E-05
178	1.6059	1.8E-04	0.3651	4.8E-06
190	1.4590	1.4E-03	0.3606	2.2E-03

Tabla 16. Sitios Seleccionados Negativamente en la proteína Vif de VIH-1

Codón	SLAC		FEL	
	dN-dS Normalizado	Valor p	dN-dS Normalizado	Valor p
12	-1.7784	9.2E-06	-0.5166	3.3E-07
13	-0.7796	1.4E-03	-0.2051	1.4E-04
23	-1.3479	1.7E-04	-0.5308	2.2E-06
24	-1.0700	6.5E-03	-0.3012	3.9E-03

25	-0.7117	6.8E-03	-0.1906	2.1E-03
27	-2.2897	5.9E-04	-0.4965	1.4E-03
34	-0.7862	2.7E-03	-0.2073	3.9E-04
43	-2.5623	1.6E-08	-0.4921	3.8E-09
56	-1.2961	4.0E-03	-0.2241	8.0E-03
57	-1.1113	9.9E-05	-0.2016	6.5E-05
59	-1.1428	5.4E-03	-0.3373	2.5E-03
64	-1.8545	4.4E-04	-0.4745	2.5E-04
71	-0.8424	8.7E-03	-0.2818	7.9E-04
72	-1.4145	1.7E-05	-0.3042	4.7E-06
80	-1.1445	6.3E-04	-0.4530	2.1E-05
81	-0.8071	3.6E-03	-0.1664	1.1E-03
82	-1.4327	6.5E-06	-0.4233	3.9E-08
88	-0.9330	3.1E-03	-0.2496	9.2E-04
90	-2.2914	2.7E-06	-0.4491	7.7E-06
104	-2.2952	6.3E-08	-0.4256	2.4E-08
107	-0.6188	6.2E-03	-0.1935	5.6E-04
108	-2.4195	1.6E-08	-1.0595	3.2E-12
111	-3.3001	2.7E-07	-0.7334	8.0E-07
119	-1.3222	2.3E-05	-0.3892	1.1E-07
121	-1.3299	3.1E-05	-0.3342	1.5E-06
130	-2.5531	2.4E-04	-1.6840	3.3E-08
135	-1.3263	1.2E-03	-0.5251	5.5E-05
139	-1.7834	1.2E-06	-0.7118	3.0E-09
140	-2.3386	8.3E-04	-0.4627	2.4E-03
143	-1.1180	7.1E-03	-0.3628	5.9E-04
144	-1.4441	8.9E-05	-0.4459	2.2E-06
145	-0.8618	2.0E-03	-0.2188	1.7E-04
146	-3.7807	1.3E-11	-0.8454	1.2E-12
148	-1.0477	4.2E-04	-0.2143	1.9E-04
153	-1.4859	6.6E-04	-0.3753	6.7E-04
161	-1.0341	1.5E-04	-0.2821	4.6E-06
162	-1.5626	2.2E-06	-0.4162	4.1E-08
163	-1.5888	1.1E-05	-0.3450	3.0E-06
164	-0.9041	4.6E-04	-0.2666	1.1E-05

168	-1.9713	5.9E-07	-0.5723	1.4E-08
169	-2.5247	7.1E-09	-0.5750	6.1E-10
171	-0.8038	1.9E-03	-0.1464	6.9E-04
172	-1.9807	2.6E-06	-0.8422	5.2E-09
191	-1.8983	1.6E-06	-0.5744	8.8E-09
192	-1.7741	1.2E-05	-0.3331	1.3E-05

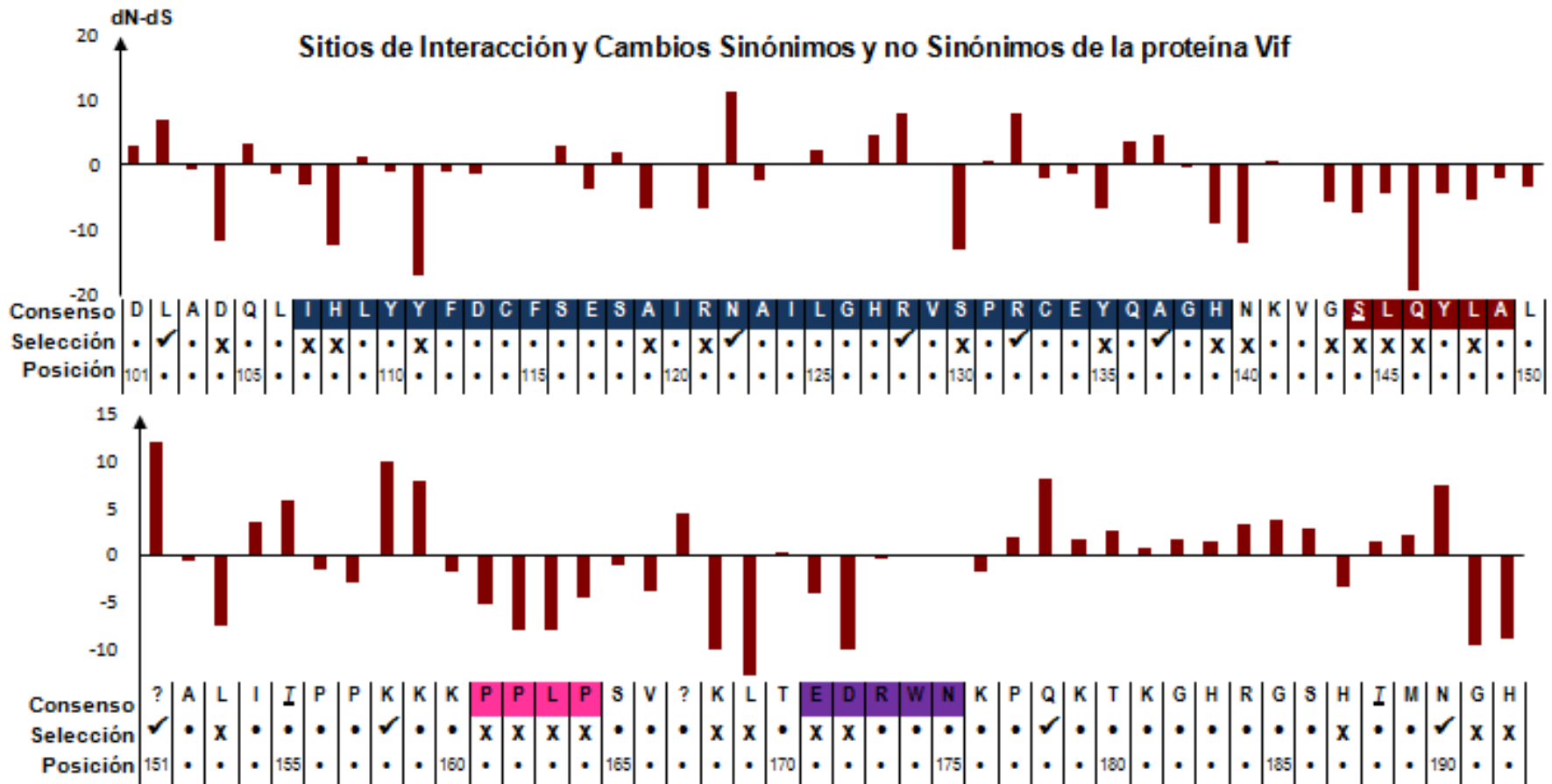


Figura 23. Sitios de Interacción y Cambios Sinónimos y no Sinónimos en la proteína Vif. Se representan los 192 codones del factor de infectividad viral, las barras indican la tasa de cambios no sinónimos vs. sinónimos para cada uno de los codones. Se indica si se encontró una presión selectiva de significancia por los dos métodos de análisis empleados (✓ = selección positiva y x=selección negativa), los codones sombreados indican los sitios de interacción del factor con proteínas como APOBEC3G (verde) APOBEC3F (morado), la región hidrofílica que favorece la expresión de Vif (amarillo), el motivo HCCH que coordina a un ion de Zn²⁺ para la unión del complejo ubiquitin-ligasa (azul), el motivo SOCS de interacción con EloB y EloC (rojo), el dominio rico en prolina, esencial para la multimerización y aumento de infectividad de Vif (rosa) y los sitios de fosforilación se representan subrayados y en cursiva.

DISCUSIÓN

Los factores de restricción son proteínas que funcionan de manera autónoma para suprimir la replicación de diferentes virus, entre ellos el VIH-1. En la actualidad se sabe que la familia de citidin desaminasas APOBEC3, en especial APOBEC3G (A3G) y APOBEC3F (A3F) desempeñan un papel importante en la restricción de la infectividad del VIH-1. De la misma forma, es bien sabido que la proteína viral Vif actúa como su antagonista, promoviendo su poliubiquitinación y su consecuente degradación proteosomal, inhibiendo así su empaquetamiento en la progenie viral^{69,80,81}

No obstante, la participación de A3G en la progresión de la infección no está claramente dilucidada, es por eso que el presente trabajo contribuye al esclarecimiento del papel de A3G en la regulación de la replicación del virus de la inmunodeficiencia humana en cohortes mexicanas, principalmente en individuos controladores (CTs). La mayoría de personas infectadas con VIH-1 no son capaces de controlar la replicación viral por sí solos a diferencia de los individuos controladores que lo hacen sin necesidad de tratamiento, hoy en día, únicamente 1 de cada 300 personas infectadas es un controlador de VIH-1.⁴⁵

Se analizó el papel del factor de restricción APOBEC3G en la limitación de la replicación viral y la protección ante el VIH-1 mediante el estudio de diferentes atributos de la proteína, como la expresión de su ARNm, su capacidad de hipermutar el ADN y su relación con parámetros clínicos, la carga proviral y la presión evolutiva ejercida en el genoma viral de dos cohortes de pacientes: controladores (n=9) y pacientes con una progresión típica de la infección (PTs; n=8), empleando como control negativo individuos sanos (DS; n=5).

Es conocido que los parámetros de carga viral y el recuento de linfocitos T CD4⁺ son útiles para la predicción y monitoreo de la infección, además de auxiliar la valoración del riesgo de transmisión o la aparición de posibles infecciones oportunistas.⁴⁵ Tomando en cuenta lo anterior, los valores de las cargas virales en

sangre de CTs y PTs y el recuento de linfocitos T CD4⁺ indican una clara diferencia entre los dos grupos de estudio ($p < 0.001$ y $p < 0.0016$ respectivamente). Es importante notar que uno de los controladores presentó niveles menores de CD4⁺ a los establecidos inicialmente como criterio de inclusión (> 500 Linfocitos T CD4⁺/ μ L de sangre), sin embargo el individuo en cuestión poseía una carga viral por debajo de 2000 copias, tal como define el consorcio internacional a los pacientes controladores.⁴⁵

Tomando en cuenta ambos parámetros se puede decir que la cohorte de PTs no se encuentra en una etapa avanzada de la infección; no obstante, son pacientes que están progresando y se diferencian del grupo de CTs. De esta forma, se tienen dos grupos de comparación en los cuales es importante elucidar los factores virales e inmunogenéticos determinantes en la progresión en la infección por el VIH-1.

Los resultados obtenidos en la cuantificación de la carga proviral de las cohortes muestran una correspondencia entre esta y los parámetros clínicos analizados, se observó una correlación negativa de significancia entre el recuento linfocitario y la carga proviral (Figura 17 A) y una correlación positiva de significancia entre la carga proviral y la carga viral plasmática (Figura 17 B). Tales observaciones se corroboraron con la detección de una menor cantidad de copias provirales insertadas en el genoma de los pacientes controladores ($p = 0.044$; Mann-Whitney; Figura 16) Por otro lado, la baja cantidad de copias provirales observadas en los pacientes controladores fue uno de los principales obstáculos para lograr una amplificación exitosa del genoma proviral, se ha reportado que el límite mínimo para la amplificación del genoma completo es alrededor de 300 copias de ADN proviral por reacción de PCR¹⁰³ por lo que el rango de copias provirales detectadas en CTs [2-640] copias/millón de PBMCs presenta un reto para amplificar óptimamente el genoma viral de estos pacientes.

Para comprobar la hipótesis de que una inactivación o control de la replicación viral puede ser ocasionada por la hipermutación del genoma viral, se evaluó la

actividad de hipermutación de A3G y su relación con la generación de codones de paro, cambios en el marco de lectura, deleciones e inserciones, encontrándose que no existe una diferencia significativa en el número de cambios G→A entre PTs y CTs, pues en la cohorte de PTs también se detectaron mutaciones con un patrón característico de A3G; sin embargo, estas se presentaron en menor frecuencia (rango: [1-4] cambios G→A/secuencia de *vif*) con respecto a los CTs (rango [1-9] cambios G→A/secuencia de *vif*). Aunado a esto, es necesario considerar la dificultad presentada al amplificar el genoma proviral en CTs, pues solamente se logró amplificar la secuencia del gen *vif* de 4 de los 9 pacientes controladores disponibles (versus 8/8 secuencias obtenidas de los progresores), aspecto que limitó considerablemente el análisis de la actividad de A3G y dificultó el establecimiento de una correlación significativa entre los parámetros que distinguen a estas cohortes (Carga viral y recuento linfocitario) con el número de cambios G→A observados en las secuencias.

A pesar de las limitaciones antes mencionadas, se encontró dentro de la cohorte de pacientes controladores una secuencia hipermutada y con un codón de paro, W70X (codón 70; CT-2; Figura 18), localizado en un motivo de interacción con APOBEC3F/G, resultado que concuerda con otros reportados previamente que sugieren que la inducción de mutaciones en un contexto de APOBEC3G podría controlar la replicación viral *in vivo*.^{71,72,83,97} Aunque no se encontraron otras secuencias significativamente hipermutadas, es importante considerar que solo fue posible analizar la porción del genoma viral correspondiente a *Vif*, pues se ha observado hipermutación dentro de un contexto de A3G en otras partes del genoma viral como *vpu*, *env* y *rev*^{83,98} pero no en las secuencias provirales de *Vif*. Al examinar las tasas de mutación y su relación con la progresión de la enfermedad, Land et al. 2008 encontró que las hipermutaciones fuera de la región *Vif* correlacionaban de forma significativa con un aumento considerable de los linfocitos T CD4⁺ periféricos; en este caso se encontró una tendencia negativa entre el número de mutaciones identificadas y la carga viral, y aunque una tendencia no necesariamente indica causalidad, este descubrimiento apoya la

hipótesis de que un mayor número de mutaciones disminuye la progenie viral y ofrece un efecto protector ante la infección por VIH-1.

El descubrimiento de un codón de paro prematuro en la secuencia de Vif que se identificó como hipermutada sugiere una posible disminución en la tasa de replicación o una incapacidad de producción de virus funcionales, lo que podría sugerir un control de la replicación viral sin la necesidad de tratamiento antirretroviral debido a la edición de los transcritos reversos del VIH-1 por APOBEC3G en los pacientes controladores. Asimismo, es conocido que la proteína viral Vif contrarresta la actividad de APOBEC3G y APOBEC3F mediante su ubiquitinación y posterior degradación proteosomal^{69,80} además de evitar su incorporación en los nuevos viriones por lo que la presencia de un codón de paro en la proteína Vif puede ocasionar una pérdida de las funciones antes mencionadas favoreciendo el incremento de la cantidad de A3G y A3F que es empaquetada en la progenie viral y con ello un incremento en su actividad antirretroviral por la hipermutación del genoma viral.

Aunado a que las hipermutaciones G → A puedan ocasionar mutaciones letales en el genoma viral y disminuyan la producción de progenie viral viable, existen teorías que proponen la existencia de mecanismos antivirales citidin desaminasa independientes. La falta de correlación entre las tasas de hipermutación y la inhibición de la replicación pueden ser un indicativo de la existencia de estos mecanismos, se han reportado proteínas APOBEC3 mutantes catalíticamente inactivas y capaces de inhibir la infección viral.⁹⁹ Otros mecanismos propuestos incluyen una disminución de la alineación del iniciador viral de ARNt,¹⁰⁰ la inhibición de la elongación del ADN,¹⁰¹ y la transcripción reversa.¹⁰² Un mecanismo distinto por el que la hipermutación mediada por A3G limita la replicación viral es la degradación del genoma viral hipermutado mediante la activación de uracil glicosilasas (UNG) del hospedero pues un cDNA viral rico en uracilos sufre la degradación por las enzimas celulares durante la transcripción

reversa, previo a su integración en el genoma del hospedero, disminuyendo de esta forma la carga proviral.

La expresión de la proteína A3G y su relación con la progresión de la infección por VIH-1 aún no está claramente establecida. Existen reportes de la inexistencia de una correlación entre los niveles de A3G y los parámetros clínicos antes mencionados en pacientes expuestos seronegativos (ESN),⁸² supresores elite,⁸³ y pacientes recién seroconvertidos.⁸⁴ Aún así, se han reportado fuertes correlaciones en la expresión de A3G y los parámetros clínicos que definen la infección viral, observando que un aumento en la expresión de A3G puede asociarse de forma significativa con un incremento en el recuento de linfocitos T CD4⁺ periféricos y con un decremento de la carga viral en individuos expuestos seronegativos (ESN),⁸⁵ y lentos progresores (LTNPs),⁷⁰ todos vírgenes al tratamiento y con respecto a progresores típicos en diferentes etapas de la infección. Otros reportan niveles más altos de A3G en pacientes con cargas virales bajas (bajo set point) tanto antes como después de la infección⁸⁶ además de una resistencia a la infección por VIH-1 en PBMCs de ESN.⁸⁷

En este caso, no se encontró diferencia significativa entre la expresión basal del ARNm de A3G en CTs, PTs o los donadores sanos (DS) empleados como control negativo de la infección (Figura 21A), de la misma forma, tampoco fue posible establecer una relación con los parámetros de progresión de la enfermedad (recuento linfocitario o la carga viral; Figura 21 B). Esto se puede atribuir a la etapa de la infección en la que se encuentran los progresores típicos, pues si bien presentan una evolución típica de la enfermedad, sus niveles linfocitarios reflejan un sistema inmune potencialmente funcional, aunado al reducido tamaño de ambas cohortes, aspectos que interfieren en una clara diferenciación entre la expresión de A3G y su relación con los parámetros clínicos en las diferentes poblaciones. Para esto, es necesario incrementar el tamaño de las poblaciones y delimitar adecuadamente cargas virales y recuentos linfocitarios en cada una de ellas, principalmente en pacientes progresores.

Contrario a lo que se esperaba, al analizar la respuesta de los miembros de la familia APOBEC3 ante diversos estímulos, se encontró que no todos los miembros de la familia incrementaron la expresión de su ARNm cuando se utilizó IFN- α como estimulante, contrario a los reportes previos que señalaban a esta citocina como un potente inductor de la expresión de los miembros de esta familia ante las infecciones virales.^{88, 89}

Únicamente se observó un incremento significativo en la expresión de los transcritos de las proteínas APOBEC3A (A3A) y APOBEC3B (A3B) bajo el estímulo de IFN- α , tal evento ocurrió en la cohorte de PTs (Figura 22). Para el caso de A3A, los reportes de su función durante la infección por VIH-1 son escasos, las referencias existentes reportan una actividad antiviral de importancia cuando esta proteína es fusionada a otras proteínas que promuevan su traslado al interior del virus^{90,91}. Asimismo, existen reportes de su falta de actividad protectora ante una infección por VIH-1.^{92,93}

En lo que respecta a APOBEC3B, se ha reportado una disminución de la infectividad de VIH-1 por A3B y una resistencia a la degradación mediada por la proteína viral Vif, aunque esto sugiere que A3B podría inhibir con mejor capacidad a los virus que contengan Vif perfectamente funcional, también podría implicar que los factores sensibles a Vif son los más relevantes para la restricción de HIV-1 *in vivo*.^{92,94–96}

A pesar de los reportes existentes de la capacidad antiviral del resto de la familia APOBEC3, tal capacidad es considerablemente menor a la observada por A3G y A3F pues en ocasiones solo inducen mutaciones subletales en el genoma viral.

Es bien conocido que la principal función de Vif es inducir la poliubiquitinación y la subsecuente degradación proteosomal de A3G, ocasionando así una disminución de los niveles citosólicos de A3G y con ello evitando su incorporación en las nuevas partículas virales.⁶⁹ Tal actividad se logra al reclutar

simultáneamente a A3G y el complejo Cullina5-elongina B7C-RbX ubiquitin ligasa, funcionando como un adaptador entre el complejo y su sustrato.¹⁰⁴

Con base en lo anterior, se evaluó la presión selectiva posiblemente ejercida por A3G en la proteína Vif por el método de razón de sustituciones sinónimas y no sinónimas en las secuencias codificantes de ADN y empleando los codones como unidad mínima evolutiva.

Se detectaron 15 posiciones bajo selección positiva (tabla 15), 4 de ellos (N122K/Q/H/R/S, R128I/V/L/K, R132S/K/E/I y A137T) localizados dentro del motivo H¹⁰⁸CCH¹³⁹, encargado de la coordinación de un ión de Zn²⁺ y del reclutamiento del complejo ubiquitin-ligasa para la degradación proteosomal de A3G. Se ha reportado que todos los aminoácidos dentro de este dominio a excepción del aminoácido G126, son críticos para el ensamblaje del complejo Vif-Ubiquitina ligasa Cullina5 E3 y que la alteración de este motivo ocasiona que Vif sea incapaz de reclutar Cullina5 y con ello, disminuya la habilidad de degradar APOBEC3G. Otro sitio seleccionado positivamente se localizó en la región hidrofílica E⁸⁸WRK⁹³ (R93G/S/E/K/N) que favorece la expresión de Vif en células hospederas, tales hallazgos sugieren que la presión positiva promueve la variación de los sitios que suscitan la degradación de APOBEC3.

Las posiciones de Vif bajo selección positiva nos indican que estos sitios son susceptibles a la variación, pues poseen adecuaciones mayores al promedio de la población, y que su frecuencia se incrementa en las siguientes generaciones favoreciendo la diversidad genética de estos sitios, esta variación puede ser consecuencia tanto como de una adaptación del virus hacia una degradación más eficiente de APOBEC3G y un escape de los factores inmunes celulares, como de la presión ejercida por A3G en esta región del genoma para contrarrestar la degradación mediada por Vif.

Se observó una gran cantidad de sitios bajo selección negativa, demostrando la importancia de esta selección purificadora en el mantenimiento de la estabilidad

biológica del virus. Muchos de estos sitios se localizaron en dominios funcionalmente importantes para Vif, como los sitios de reconocimiento de APOBEC3G y APOBEC3F para su degradación, la ya mencionada región hidrofílica E⁸⁸WRKK⁹³, el motivo H¹⁰⁸CCH¹³⁹, la caja SOCS o S¹⁴⁴LQ¹⁴⁹ responsable de la unión de Elongina C que posteriormente ocasiona la poliubiquitinación y degradación proteosomal de A3G, el motivo rico en prolina P¹⁶¹PLP¹⁶⁴ esencial para la multimerización de Vif en su extremo carboxilo terminal; tal multimerización es crucial para prevenir la incorporación de APOBEC3G a las partículas virales y un sitio blanco de fosforilación por cinasas celulares para regular la infectividad de Vif como S144. Todos estos sitios desempeñan un papel importante en la inhibición y degradación de APOBEC3G por lo que la selección negativa inferida indica que las mutaciones en estos sitios son menores que el resto del genoma y que la frecuencia de los mutantes disminuye con el paso de las generaciones, de esta forma se eliminan las variantes de la población que pudiesen interferir con la capacidad biológica del virus. Esto sugiere que una posible hipermutación inducida por A3G solo podría ser tolerada por el genoma hasta cierto nivel, pues la sola presencia de un bajo número de mutaciones en estas regiones altamente conservadas ocasiona la desaparición o eliminación del genoma en cuestión, evitando así la prevalencia de las mutaciones con un patrón característico de A3G.

Estos resultados sugieren la existencia de una presión selectiva por parte de APOBEC3G sobre la proteína viral Vif. Sin embargo, más investigación es necesaria, el relacionar los resultados obtenidos por ejemplo, el análisis de los diversos epítomos de alelos HLA de las cohortes, la producción de factores antivirales solubles, las respuestas de linfocitos T citotóxicos o la participación de otros componentes de las respuestas inmunes innatas como células NK y células dendríticas permitiría discernir sobre los elementos y la convergencia de presiones selectivas múltiples que contribuyan al fenotipo de resistencia presente en pacientes controladores.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se evaluaron diversos aspectos del factor celular APOBEC3G con la finalidad de esclarecer su participación en la restricción de la replicación del Virus de la Inmunodeficiencia Humana en individuos controladores de la infección.

Se encontró que los pacientes controladores presentan una mayor tasa de cambios G→A dentro de un contexto de APOBEC3F/G, así como menor carga proviral que los pacientes progresores.

A pesar de los obstáculos presentados al establecer una correlación entre la expresión génica de la familia APOBEC3 y los parámetros analizados como carga viral, recuento linfocitario, hipermutación, y carga proviral, fue posible observar una tendencia que sugiere que el factor de restricción APOBEC3G participa en la concesión de un fenotipo de resistencia en pacientes controladores.

La variabilidad observada en el genoma viral, en este caso la región *vif* es un indicativo de la magnitud de la presión evolutiva a la que está sometido el virus de la inmunodeficiencia humana y de la participación del factor de restricción APOBEC3G en la misma.

La amplia cantidad de codones de la proteína Vif sometidos a presión negativa y que por lo tanto tienden a la conservación, son blancos interesantes para el desarrollo de nuevos agentes antivirales cuya finalidad sea bloquear la actividad de esta proteína y favorecer la actividad antiviral del factor de restricción APOBEC3G, proponiendo así una nueva estrategia para controlar la infección por VIH-1.

BIBLIOGRAFÍA

1. Knipe, D. M. & Howley, P. M. *Fields Virology*. (Lippincott Williams & Wilkins, 2007).
2. Barré-Sinoussi, F. *et al.* Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**, 868–871 (1983).
3. Francki, R., Fauquet, C., Knudson, D. & Brown, F. *Fifth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. (1991).
4. World Health Organization (WHO) Department of HIV/AIDS. *WHO* at <<http://www.who.int/hiv/data/en/index.html>>
5. Epidemiología y Monitoreo. *Centro Nacional para la Prevención y Control del VIH y el SIDA (CENSIDA), Secretaría de Salud* at <<http://www.censida.salud.gob.mx/interior/panorama.html>>
6. UNAIDS/WHO. 2012 Global Report: UNAIDS Report on the global AIDS epidemic 2012. at <<http://www.unaids.org/es/dataanalysis/knowyourresponse/countryprogressreports/2012countries/file,68899,es..pdf>>
7. American Society for Microbiology, Griffith, B., Campbell, S. & Caliendo, A. in *Manual of clinical microbiology* **2**, (ASM Press, 2011).
8. Prescott, L. M. *Microbiology*. (McGraw-Hill, 2002).
9. Barré-Sinoussi, F. HIV as the cause of AIDS. *The Lancet* **348**, 31–35 (1996).
10. Hoffmann, C. & Kamps, B. S. *HIV medicine*. (Flying Publisher, 2007).
11. Peterlin, B. M. & Trono, D. Hide, shield and strike back: how HIV-infected cells avoid immune eradication. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 97–107 (2003).
12. Levy, J. A. *El VIH y la patogénesis del SIDA*. (Fondo de Cultura Económica, INER, 2008).
13. Lefranc, M.-P. *et al.* IMGT, the international ImMunoGeneTics information system. *Nucleic Acids Res.* **37**, D1006–1012 (2009).

14. Göttlinger, H. HIV-1 Gag: a Molecular Machine Driving Viral Particle Assembly and Release. *HIV Sequence Compendium 2001* (2001). at <http://74.125.127.132/scholar?q=cache:5qNWxSQ6tRwJ:scholar.google.com/+HIV-1+Gag:+a+Molecular+Machine+Driving+ViralParticle+Assembly+and+Release&hl=en&as_sdt=0,5>
15. Ashorn, P. *et al.* An inhibitor of the protease blocks maturation of human and simian immunodeficiency viruses and spread of infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 7472–7476 (1990).
16. Miller, M., Jaskólski, M., Rao, J. K., Leis, J. & Wlodawer, A. Crystal structure of a retroviral protease proves relationship to aspartic protease family. *Nature* **337**, 576–579 (1989).
17. Gag-Pol polyprotein - Human immunodeficiency virus type 1 group M subtype B (isolate BRU/LAI) (HIV-1). at <<http://www.uniprot.org/uniprot/P03367>>
18. Hope, T. J. & Trono, D. HIV InSite Knowledge Base: Structure, Expression, and Regulation of the HIV Genome. *Center for HIV Information (CHI), University of California San Francisco (UCSF)* at <<http://hivinsite.ucsf.edu/InSite?page=kb-02-01-02#S2.1.3X>>
19. Wyatt, R. *et al.* The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. *Nature* **393**, 705–711 (1998).
20. Karn, J. Tackling Tat. *J. Mol. Biol.* **293**, 235–254 (1999).
21. Zapp, M. L. & Green, M. R. Sequence-specific RNA binding by the HIV-1 Rev protein. *Nature* **342**, 714–716 (1989).
22. Piguet, V. & Trono, D. The Nef protein of primate lentiviruses. *Rev. Med. Virol.* **9**, 111–120 (1999).
23. Vodicka, M. A., Koepf, D. M., Silver, P. A. & Emerman, M. HIV-1 Vpr interacts with the nuclear transport pathway to promote macrophage infection. *Genes Dev.* **12**, 175–185 (1998).
24. Cohen, E. A. *et al.* Identification of HIV-1 vpr product and function. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **3**, 11–18 (1990).

25. Klimkait, T., Strebel, K., Hoggan, M. D., Martin, M. A. & Orenstein, J. M. The human immunodeficiency virus type 1-specific protein vpu is required for efficient virus maturation and release. *J. Virol.* **64**, 621–629 (1990).
26. Goncalves, J., Korin, Y., Zack, J. & Gabuzda, D. Role of Vif in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription. *J. Virol.* **70**, 8701–8709 (1996).
27. Mehle, A. *et al.* Vif overcomes the innate antiviral activity of APOBEC3G by promoting its degradation in the ubiquitin-proteasome pathway. *J. Biol. Chem.* **279**, 7792–7798 (2004).
28. Greene, W. C. & Peterlin, B. M. Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy. *Nat. Med.* **8**, 673–680 (2002).
29. Campbell, S. M., Crowe, S. M. & Mak, J. Lipid rafts and HIV-1: from viral entry to assembly of progeny virions. *Journal of Clinical Virology* **22**, 217–227 (2001).
30. Kao, S. Y., Calman, A. F., Luciw, P. A. & Peterlin, B. M. Anti-termination of transcription within the long terminal repeat of HIV-1 by tat gene product. *Nature* **330**, 489–493 (1987).
31. Jones, K. A. & Peterlin, B. M. Control of RNA initiation and elongation at the HIV-1 promoter. *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 717–743 (1994).
32. Wu-Baer, F., Sigman, D. & Gaynor, R. B. Specific binding of RNA polymerase II to the human immunodeficiency virus trans-activating region RNA is regulated by cellular cofactors and Tat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 7153–7157 (1995).
33. Cullen, B. R. Retroviruses as model systems for the study of nuclear RNA export pathways. *Virology* **249**, 203–210 (1998).
34. Simmons, A., Aluvihare, V. & McMichael, A. Nef triggers a transcriptional program in T cells imitating single-signal T cell activation and inducing HIV virulence mediators. *Immunity* **14**, 763–777 (2001).
35. Jowett, J. B. *et al.* The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene arrests infected T cells in the G2 + M phase of the cell cycle. *J. Virol.* **69**, 6304–6313 (1995).

36. Wilk, T. *et al.* Organization of immature human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **75**, 759–771 (2001).
37. Zimmerman, C. *et al.* Identification of a host protein essential for assembly of immature HIV-1 capsids. *Nature* **415**, 88–92 (2002).
38. Madani, N. & Kabat, D. An endogenous inhibitor of human immunodeficiency virus in human lymphocytes is overcome by the viral Vif protein. *J. Virol.* **72**, 10251–10255 (1998).
39. Göttlinger, H. G., Sodroski, J. G. & Haseltine, W. A. 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**, 5781–5785 (1989).
40. Kahn, J. O. & Walker, B. D. Acute Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *New England Journal of Medicine* **339**, 33–39 (1998).
41. Parham, P. *Inmunología*. (Médica Panamericana, 2006).
42. Mellors, J. W. *et al.* Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science* **272**, 1167–1170 (1996).
43. Deeks, S. G. & Walker, B. D. Human Immunodeficiency Virus Controllers: Mechanisms of Durable Virus Control in the Absence of Antiretroviral Therapy. *Immunity* **27**, 406–416 (2007).
44. Sáez-Cirión, A. *et al.* HIV controllers: how do they tame the virus? *Trends Immunol.* **28**, 532–540 (2007).
45. The International HIV Controllers Study. at <<http://www.hivcontrollers.org/>>
46. Saxena, N. K., Rodes, B., Wang, B. & Soriano, V. Elite HIV controllers: myth or reality? *AIDS Rev* **9**, 195–207 (2007).
47. Saag, M. & Deeks, S. G. How Do HIV Elite Controllers Do What They Do? *Clinical Infectious Diseases* **51**, 239–241 (2010).
48. Buchbinder, S. & Vittinghoff, E. HIV-infected long-term nonprogressors: epidemiology, mechanisms of delayed progression, and clinical and research implications. *Microbes and Infection* **1**, 1113–1120 (1999).

49. Centers for Disease Control and Prevention. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *MMWR Recommendations and Reports* **41**, (1992).
50. Kuritzkes, D. & Walker, B. D. in *Fields Virology* **2**, (Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health).
51. Murphy, K. in *Janeway's immunobiology* (Garland Science, 2012).
52. Abbas, A. K., Lichtman, A. H. & Pillai. in *Inmunología celular y molecular* (Elsevier, 2008).
53. Murphy, K. *Janeway's immunobiology*. (Garland Science, 2012).
54. Abbas, A. K., Lichtman, A. H. & Pillai. *Inmunología celular y molecular*. (Elsevier, 2008).
55. Boasso, A., Shearer, G. M. & Chougnet, C. Immune dysregulation in human immunodeficiency virus infection: know it, fix it, prevent it? *Journal of Internal Medicine* **265**, 78–96 (2009).
56. Jost, S. & Altfeld, M. Control of human viral infections by natural killer cells. *Annu. Rev. Immunol.* **31**, 163–194 (2013).
57. Grandvaux, N., tenOever, B. R., Servant, M. J. & Hiscott, J. The interferon antiviral response: from viral invasion to evasion. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **15**, 259–267 (2002).
58. Cocchi, F. *et al.* Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science* **270**, 1811–1815 (1995).
59. Masur, H. *et al.* CD4 counts as predictors of opportunistic pneumonias in human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Ann. Intern. Med.* **111**, 223–231 (1989).
60. Shirai, A., Cosentino, M., Leitman-Klinman, S. F. & Klinman, D. M. Human immunodeficiency virus infection induces both polyclonal and virus-specific B cell activation. *J. Clin. Invest.* **89**, 561–566 (1992).
61. American Society for Microbiology, Lurain, N. S. & Thompson, K. D. in *Manual of clinical microbiology* (ASM Press, 2011).

62. Sabundayo, B. P. & James, C. W. in *Concepts in Immunology and Immunotherapeutics* (Smith, B. T.) (ASHP, 2008).
63. Malim, M. H. & Bieniasz, P. D. HIV Restriction Factors and Mechanisms of Evasion. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* **2**, a006940–a006940 (2012).
64. Goila-Gaur, R. & Strebel, K. HIV-1 Vif, APOBEC, and Intrinsic Immunity. *Retrovirology* **5**, 51 (2008).
65. Lever, R. A. & Lever, A. M. L. Intracellular defenses against HIV, viral evasion and novel therapeutic approaches. *J. Formos. Med. Assoc.* **110**, 350–362 (2011).
66. Chang, M. O., Suzuki, T., Yamamoto, N., Watanabe, M. & Takaku, H. HIV-1 Gag-Virus-Like Particles Inhibit HIV-1 Replication in Dendritic Cells and T Cells through IFN- α -Dependent Upregulation of APOBEC3G and 3F. *Journal of Innate Immunity* **4**, 579–590 (2012).
67. Hultquist, J. F. *et al.* Human and Rhesus APOBEC3D, APOBEC3F, APOBEC3G, and APOBEC3H Demonstrate a Conserved Capacity To Restrict Vif-Deficient HIV-1. *Journal of Virology* **85**, 11220–11234 (2011).
68. Yu, Q. *et al.* Single-strand specificity of APOBEC3G accounts for minus-strand deamination of the HIV genome. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 435–442 (2004).
69. Sheehy, A. M., Gaddis, N. C. & Malim, M. H. The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif. *Nat. Med.* **9**, 1404–1407 (2003).
70. Jin, X. *et al.* APOBEC3G/CEM15 (hA3G) mRNA levels associate inversely with human immunodeficiency virus viremia. *J. Virol.* **79**, 11513–11516 (2005).
71. Farrow, M. A. *et al.* Nuclear localization of HIV type 1 Vif isolated from a long-term asymptomatic individual and potential role in virus attenuation. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **21**, 565–574 (2005).
72. Wang, B. *et al.* First demonstration of a lack of viral sequence evolution in a nonprogressor, defining replication-incompetent HIV-1 infection. *Virology* **312**, 135–150 (2003).

73. Human Interferon Alpha | PBL Interferon Source. at <<https://www.interferonsource.com/content/human-interferon-alpha>>

74. Life Technologies™. *Real-Time PCR Handbook*. (Life Technologies Corporation, 2012).

75. Biotium, Inc. EvaGreen® Dye: A PCR Dye Safe to the Environment. (2011). at <http://www.biotium.com/product/product_info/newproduct/evagreen.asp>

76. Fluidigm Corporation. Fluidigm technology - Nanoflex valves, Integrated Fluidic Circuits. at <<http://www.fluidigm.com/technology.html>>

77. Koneman, E. W., Winn, Allen, Janda & Procop. *Koneman diagnóstico microbiológico: texto y atlas en color*. (Editorial Médica Panamericana, 2008).

78. Bizinoto, M. C. *et al.* Codon pairs of the HIV-1 vif gene correlate with CD4+ T cell count. *BMC Infectious Diseases* **13**, 173 (2013).

79. Delport, W., Poon, A. F. Y., Frost, S. D. W. & Kosakovsky Pond, S. L. Datamonkey 2010: a suite of phylogenetic analysis tools for evolutionary biology. *Bioinformatics* **26**, 2455–2457 (2010).

80. Conticello, S. G., Harris, R. S. & Neuberger, M. S. The Vif protein of HIV triggers degradation of the human antiretroviral DNA deaminase APOBEC3G. *Curr. Biol.* **13**, 2009–2013 (2003).

81. Marin, M., Rose, K. M., Kozak, S. L. & Kabat, D. HIV-1 Vif protein binds the editing enzyme APOBEC3G and induces its degradation. *Nat. Med.* **9**, 1398–1403 (2003).

82. Cho, S.-J. *et al.* APOBEC3F and APOBEC3G mRNA levels do not correlate with human immunodeficiency virus type 1 plasma viremia or CD4+ T-cell count. *J. Virol.* **80**, 2069–2072 (2006).

83. Gandhi, S. K., Siliciano, J. D., Bailey, J. R., Siliciano, R. F. & Blankson, J. N. Role of APOBEC3G/F-Mediated Hypermutation in the Control of Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Elite Suppressors. *Journal of Virology* **82**, 3125–3130 (2007).

84. Reddy, K. *et al.* APOBEC3G expression is dysregulated in primary HIV-1 infection and polymorphic variants influence CD4+ T-cell counts and plasma viral load: *AIDS* **24**, 195–204 (2010).

85. Vazquez-Perez, J. A., Ormsby, C. E., Hernandez-Juan, R., Torres, K. J. & Reyes-Teran, G. APOBEC3G mRNA expression in exposed seronegative and early stage HIV infected individuals decreases with removal of exposure and with disease progression. *Retrovirology* **6**, 23 (2009).
86. Ulena, N. K. *et al.* Relationship between human immunodeficiency type 1 infection and expression of human APOBEC3G and APOBEC3F. *J. Infect. Dis.* **198**, 486–492 (2008).
87. Biasin, M. *et al.* Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G: a possible role in the resistance to HIV of HIV-exposed seronegative individuals. *J. Infect. Dis.* **195**, 960–964 (2007).
88. Chen, K. *et al.* Alpha interferon potently enhances the anti-human immunodeficiency virus type 1 activity of APOBEC3G in resting primary CD4 T cells. *J. Virol.* **80**, 7645–7657 (2006).
89. Herbeuval, J.-P. *et al.* Differential expression of IFN-alpha and TRAIL/DR5 in lymphoid tissue of progressor versus nonprogressor HIV-1-infected patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 7000–7005 (2006).
90. Aguiar, R. S., Lovsin, N., Tanuri, A. & Peterlin, B. M. Vpr.A3A Chimera Inhibits HIV Replication. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 2518–2525 (2007).
91. Goila-Gaur, R., Khan, M. A., Miyagi, E., Kao, S. & Strebel, K. Targeting APOBEC3A to the viral nucleoprotein complex confers antiviral activity. *Retrovirology* **4**, 61 (2007).
92. Rose, K. M., Marin, M., Kozak, S. L. & Kabat, D. Regulated production and anti-HIV type 1 activities of cytidine deaminases APOBEC3B, 3F, and 3G. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **21**, 611–619 (2005).
93. Bogerd, H. P., Wiegand, H. L., Doehle, B. P., Lueders, K. K. & Cullen, B. R. APOBEC3A and APOBEC3B are potent inhibitors of LTR-retrotransposon function in human cells. *Nucleic Acids Res.* **34**, 89–95 (2006).
94. Doehle, B. P., Schäfer, A. & Cullen, B. R. Human APOBEC3B is a potent inhibitor of HIV-1 infectivity and is resistant to HIV-1 Vif. *Virology* **339**, 281–288 (2005).
95. Yu, Q. *et al.* APOBEC3B and APOBEC3C are potent inhibitors of simian immunodeficiency virus replication. *J. Biol. Chem.* **279**, 53379–53386 (2004).

96. Bishop, K. N. *et al.* Cytidine deamination of retroviral DNA by diverse APOBEC proteins. *Curr. Biol.* **14**, 1392–1396 (2004).
97. Sandońs, V. *et al.* A combination of defective DNA and protective host factors are found in a set of HIV-1 ancestral LTNPs. *Virology* **391**, 73–82 (2009).
98. Land, A. M. *et al.* Human immunodeficiency virus (HIV) type 1 proviral hypermutation correlates with CD4 count in HIV-infected women from Kenya. *J. Virol.* **82**, 8172–8182 (2008).
99. Holmes, R. K., Koning, F. A., Bishop, K. N. & Malim, M. H. APOBEC3F can inhibit the accumulation of HIV-1 reverse transcription products in the absence of hypermutation. Comparisons with APOBEC3G. *J. Biol. Chem.* **282**, 2587–2595 (2007).
100. Guo, F., Cen, S., Niu, M., Saadatmand, J. & Kleiman, L. Inhibition of formula-primed reverse transcription by human APOBEC3G during human immunodeficiency virus type 1 replication. *J. Virol.* **80**, 11710–11722 (2006).
101. Iwatani, Y. *et al.* Deaminase-independent inhibition of HIV-1 reverse transcription by APOBEC3G. *Nucleic Acids Res.* **35**, 7096–7108 (2007).
102. Bishop, K. N., Verma, M., Kim, E.-Y., Wolinsky, S. M. & Malim, M. H. APOBEC3G inhibits elongation of HIV-1 reverse transcripts. *PLoS Pathog.* **4**, e1000231 (2008).
103. Simmonds, P. *et al.* Human immunodeficiency virus-infected individuals contain provirus in small numbers of peripheral mononuclear cells and at low copy numbers. *J. Virol.* **64**, 864–872 (1990).
104. Yu, X. *et al.* Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex. *Science* **302**, 1056–1060 (2003).

ANEXO

Tabla A1: Carga Viral y linfocitos T CD4+ de cada uno de los pacientes de las cohortes de estudio

CONTROLADORES			PROGRESORES		
ID Paciente	Carga Viral (copias de ARN viral/mL de sangre)	Linfocitos T CD4+ (células/ μ L de sangre)	ID Paciente	Carga Viral (copias de ARN viral/mL de sangre)	Linfocitos T CD4+ (células/ μ L de sangre)
CT-1	<40	1404	PT-1	81,987	212
CT-2	50	538	PT-2	14,527	412
CT-3	Indetectable	1206	PT-3	65,859	336
CT-4	862	347	PT-4	1,141,401	357
CT-5	51	690	PT-5	23,196	314
CT-6	Indetectable	699	PT-6	16,835	363
CT-7	<40	2027	PT-7	11,956	431
CT-8	1138	745	PT-8	14,182	487
CT-9	<40	766			
Promedio	525.25	935.78	Promedio	171,242.88	364
Desviación estándar	559.65	520.77	Desviación estándar	392,908.41	83.12

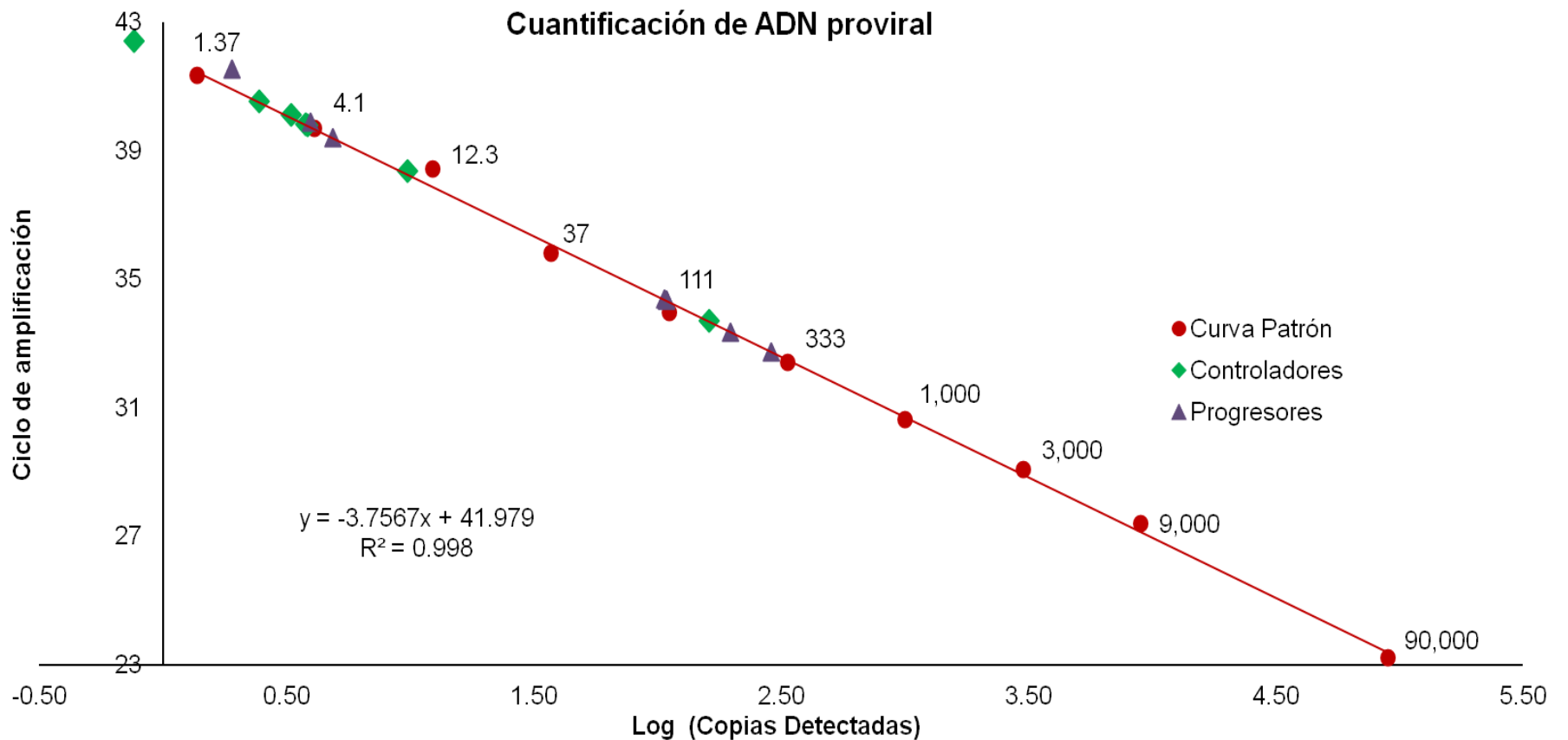


Figura A1. Cuantificación de carga viral por PCR en tiempo real. La curva patrón se muestra en color rojo ($R^2=0.998$), se muestra el número de copias para cada uno de los puntos de la curva y la extrapolación de las muestras analizadas con base en su ciclo de amplificación.