



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA PROTEÍNA CON
ACTIVIDAD ANTIRRETROVIRAL APOBEC3G MEDIANTE
LA DETECCIÓN DE POLIMORFISMOS DE UNA SOLA BASE
EN PACIENTES INFECTADOS POR EL VIH-1 Y EN
PERSONAS EXPUESTAS SERONEGATIVAS”**

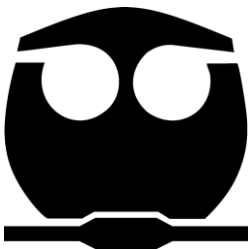
TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

GUADALUPE RUTH CEREZO LIRA



MÉXICO, D.F. Abril del 2010



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.

A **Mamá**, quien es mi mejor amiga y compañera....te admiro mucho.

A **Papá**, quien cotidianamente me demuestra su cariño y me ha enseñado a trabajar por lo que quiero.

A **Migue**, quien además de ser mi amigo, siempre me enseña cosas nuevas...mi brazo derecho.

A **Gelis**, quien siempre está conmigo y me acompaña en los peores momentos...mi conciencia.

Todos ustedes forman parte una importantísima de mí, les debo todo lo que soy

Los quiero mucho.

Al **Dr. Joel A. Vázquez Pérez**, mi tutor, por su gran apoyo, por su confianza, por su interés en mi formación y por su amistad, gracias.

A la **Dra. Klinsty J. Torres Hernández**, por haberme brindado las muestras biológicas, sin ellas este trabajo no hubiese sido posible.

Al **MIBB. Christopher E. Ormsby**, por su apoyo y esfuerzo en el análisis estadístico de datos.

A **Maribel, Viridiana, Miguel Angel, Damaris, Caro Demenehi, Edna, Klinsty, Edgar, Enrique y Perla**, por su apoyo y amistad, además de los muy buenos momentos.

A **Lili**, por estar conmigo toda la carrera, compartir su tiempo y amistad fue maravilloso, eres un gran apoyo, mil gracias.

A **Luz**, con quien comparto muchos despuntes y alegrías; A **Itzel, Rosita, Brenda, Sandy y Jaqueline**, por ser mis amigas desde hace ya tiempo; hemos pasado muy buenos momentos.

A **Gaby, Karen, Alicia, Rodolfo y Sebastian**, por sacarme una sonrisa cuando lo necesitaba.

A **Dany, Ale, Guadalupe, Ara, Gustavo, Fernando, Jorge, Mauricio, Pepe y Ricardo**, quienes me han acompañado en la carrera desde primer semestre.

A los chicos **QFB's de la generación 2005**, que hicieron de la escuela un lugar donde además de aprender química, aprendí de la vida.

A mi **abuelita**, que fue una mujer admirable, trabajadora y muy sencilla, por ello un gran ejemplo.

A mi **familia**, por apoyarme y revisar este trabajo, gracias por los ánimos y las observaciones.

A mis **profesores**, que dieron su tiempo y trabajo para transmitirme sus conocimientos.

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** y a la **Facultad de Química** por ser la base de mi formación profesional.

Al **personal administrativo** y a los **estudiantes del CIENI**, quienes me apoyaron directa o indirectamente a lo largo de mi estadía.

Al **Dr. Reyes Terán**, por haberme brindado la oportunidad de entrar a su grupo de investigación.

Al **CIENI**, por ser un laboratorio que brinda muchas oportunidades y permitir que este trabajo se llevara a cabo.

Al **GDF** por haberme otorgado la beca de titulación. Becario folio No.20090035114.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.	
2.1. VIH.....	2
2.2. Genoma del VIH.....	3
2.3. Estructura del VIH.....	5
2.3.1. Proteínas estructurales.....	5
2.3.2. Proteínas reguladoras y accesorias.....	7
2.4. Ciclo de replicación del VIH.....	10
2.4.1. Mecanismo de entrada.....	11
2.4.2. Eventos post-entrada.....	11
2.5. Historia natural del VIH.....	13
2.5.1. Fase aguda.....	13
2.5.2. Fase crónica.....	14
2.5.3. Fase crítica o SIDA.....	14
2.6. Respuesta inmunológica ante el VIH.....	16
2.6.1. Inmunidad innata.....	16
2.6.2. Inmunidad adaptativa.....	21
2.6.2.1. Respuesta humoral.....	21
2.6.2.2. Respuesta celular.....	22
2.7. Tratamiento, vacuna.....	23
2.7.1. Vacuna.....	25
2.7.2. Nuevas expectativas de terapia antiviral.....	26
2.7.2.1. APOBEC3G (hA3G).....	27
2.7.2.1.1. Descripción.....	28
2.7.2.1.2. Genoma.....	29
2.7.2.1.3. Actividad antirretroviral.....	30
2.7.2.1.3.1. Actividad <i>in vivo</i>	31
2.7.2.1.4. Caracterización de forma genética en poblaciones.....	31
3. JUSTIFICACIÓN.....	34
4. HIPÓTESIS.....	35
5. OBJETIVOS.....	36
6. MATERIALES Y MÉTODOS.	
6.1. Población de estudio.....	37
6.2. Almacenamiento de muestras.....	38
6.3. Extracción y purificación de ADN.....	38
6.4. Cuantificación de ácidos nucleicos.....	38
6.5. Amplificación (PCR).	
6.5.1. Amplificación de β -globina.....	38

6.5.2. Amplificación de la región promotora.....	39
6.6. Secuenciación.....	40
6.6.1. Purificación de productos de PCR.....	40
6.6.2. Reacción de secuenciación.....	41
6.6.3. Purificación de reacción de secuenciación.....	42
6.6.4. Secuenciación automatizada.....	42
6.6.5. Análisis y alineación de secuencias.....	42
6.7. Disociación de alta resolución de DNA (High resolution melting, HRM).....	43
6.7.1. Mezcla de reacción para PCR de HRM.....	43
6.8. Recopilación de datos de expresión de hA3G, CD4 ⁺ y carga viral.....	44
6.9. Análisis estadístico.....	44
6.10. Calculo de frecuencias alélicas y genómicas.....	45
7. RESULTADOS.	
7.1. Población de estudio.....	46
7.2. Identificación de polimorfismos en el promotor de APOBEC3G...	46
7.3. Análisis estadístico de los polimorfismos en el promotor de hA3G presentes en las diferentes cohortes de pacientes.....	49
7.4. Análisis estadístico de los haplotipos elaborados a partir de los polimorfismos en el promotor de hA3G presentes en la población estudiada.....	58
7.5. Identificación de polimorfismos en el exón 4 de hA3G.....	64
7.6. Análisis estadístico del polimorfismo H186R en el exón 4 de hA3G presentes en las diferentes cohortes de pacientes.....	66
7.7. Calculo de frecuencia alélica y genómica de los polimorfismos.	
7.7.1. En promotor de hA3G.....	67
7.7.2. En el exón 4 de hA3G.....	68
8. DISCUSIÓN.	
8.1. Población de estudio.....	69
8.2. Polimorfismos en el promotor de hA3G.....	69
8.3. Polimorfismo H186R en el exón 4 de hA3G.....	72
8.4. Cálculo de frecuencias alélicas y genómicas.....	72
9. CONCLUSIONES.....	76
10. REFERENCIAS.....	78
11. ANEXOS.....	82

1. INTRODUCCIÓN

Los casos de infección por el VIH han aumentado a nivel mundial a través de los últimos años. A pesar de los grandes adelantos en la investigación relacionada con el VIH/SIDA y los conocimientos en los campos de la patogénesis viral, biología del virus, respuesta inmunológica, 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 mecanismos naturales dentro de la célula que puedan limitar la replicación del VIH. El estudio de estos mecanismos podría ofrecer una alternativa para futuras estrategias de vacunación y tratamiento. El factor celular más caracterizado por su acción en la replicación del VIH es la enzima citidina desaminasa APOBEC3G (hA3G).

En este proyecto estamos interesados en caracterizar genéticamente a hA3G en dos sitios: en el promotor y en el exón 4, donde se ha localizado un polimorfismo no sinónimo que puede estar relacionado a la rápida progresión a SIDA. La caracterización se llevó a cabo en células de personas VIH+, expuestas seronegativas, VIH+ con baja carga viral y donadores sanos, estas cohortes se tomaron para relacionar los diferentes polimorfismos en cada una de ellas con su posible papel en la protección por la infección de VIH, en la progresión a SIDA y en el control de la replicación viral.

Para ello, inicialmente se muestra una revisión bibliográfica del VIH, aspectos biológicos, genéticos, inmunológicos y las nuevas expectativas de terapia antirretroviral, en donde se encuentra a hA3G. Posteriormente se describen los materiales y métodos utilizados además del análisis estadístico. En la sección de resultados, se exponen las cohortes, los polimorfismos encontrados y también la frecuencia alélica y genómica en diferentes poblaciones del mundo. Finalmente se encuentra la discusión y las conclusiones, en donde se analizan los hallazgos de este estudio y se sitúan en el contexto del conocimiento general sobre este tema.

2. ANTECEDENTES

2.1. VIH

El virus de la inmunodeficiencia Humana (VIH) es un miembro del género *Lentivirus* de la familia *Retroviridae*. También es llamado retrovirus, debido a que su genoma se transcribe de ARN a ADN dentro de la célula a través de la enzima viral transcriptasa reversa (RT), razón por la cual en la clasificación de Baltimore, se encuentra en el grupo VI.

El VIH fue descubierto por su asociación con el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), que se caracteriza por una reducción significativa en las células T CD4⁺ y el desarrollo de infecciones oportunistas, como resultado de la replicación y diseminación del VIH [7].

Fue aislado en 1983 a partir de células de nódulo linfático de un paciente con linfadenopatía [8]. La gran homología en la secuencia nucleotídica, así como en las similitudes morfológicas, demostraron que los virus aislados de pacientes con SIDA eran evolutivamente similares a los miembros del género lentivirus de la familia *Retroviridae*. La designación de virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y virus de la inmunodeficiencia simia (VIS) se adoptó para los lentivirus humanos y los lentivirus primates no humanos respectivamente [9]. El VIH tipo 1 (VIH-1) hace referencia a los virus genéticamente relacionados encontrados en varias regiones de África, Asia, Europa y del continente americano. El VIH tipo 2 (VIH-2) prevalece en determinados países del oeste de África. Ambos virus son causantes del SIDA, sin embargo los individuos infectados con VIH-2 presentan una menor patogenicidad, transmisibilidad y mortalidad [10]. Análisis filogenéticos de varios genes virales indican que el origen de los lentivirus humanos se encuentra en una transmisión zoonótica, siendo el reservorio del VIH-1 el VIS del chimpancé (*Pan troglodytes*) y reservorio del VIH-2 el VIS del mono gris africano mengabeys (*Cercocebus atys*) [11].

2.2. Genoma del VIH

El VIH, al igual que otros retrovirus, además de las proteínas estructurales, presenta en la fase extracelular dos cadenas de ARN de cadena sencilla y polaridad positiva, esta forma es denominada virión; posteriormente cuando se lleva a cabo la infección, mediante la enzima transcriptasa reversa, se realiza una conversión a una doble cadena de DNA, que se integra al genoma celular por las secuencias de las repeticiones terminales largas (Long Terminal Repeat [LTR]) flanqueando los genes virales, esta forma se denomina provirus. Ambas formas presentan una longitud aproximada de 9.2 kilobases (kb) [12].

Los genes que codifican para las proteínas virales se dividen en genes estructurales, reguladores y accesorios (o auxiliares). Los genes *estructurales* son: el gen *gag*, que codifica para los precursores de las proteínas de la cápside del virión, el gen *pol* que codifica para precursores de distintas enzimas virales como la proteasa (PR), la retrotranscriptasa (RT), RNasa H, la integrasa (IN) y el gen *env* que codifica para los precursores de las glicoproteínas de envoltura (gp). Los genes *reguladores* esenciales son, el gen transactivador transcripcional (*tat*) y el gen de la expresión viral (*rev*), ambos genes codifican para pequeñas proteínas esenciales para la replicación viral que no aparecen en la partícula viral. Finalmente los genes *accesorios o auxiliares* (*vif*, *vpr*, *vpu* y *nef*) no son esenciales para la replicación viral de células *in vitro*, pero *in vivo* condicionan la patogenia de la enfermedad [13].

El tránsito primario del VIH consiste en un ARNm viral completo sometido a varios procesos de expresión diferencial. La expresión de los genes de VIH se dividen en una fase inicial, durante la cual se expresan los genes reguladores y una fase avanzada donde se expresan los genes estructurales y se empaquetan los genomas virales completos. Las proteínas reguladoras (Rev, Tat) y la accesoria Nef, son productos de los genes iniciales codificados por ARNm con procesamiento completo, que se exportan desde el núcleo y se traducen a proteínas en el citoplasma, inmediatamente después de la infección de la célula. Los genes tardíos son Env, Gag y Pol. La proteína Rev inicia el cambio de

expresión de los genes iniciales a los tardíos, estimulando la exportación del ARN con procesamiento sencillo y sin procesar hacia el exterior del núcleo [14].

La poliproteína del precursor de pol es autoescindida por su región PR en productos que son las enzimas virales transcriptasa reversa (RT), proteasa (PR) y la integrasa (IN). A través de escisión proteolítica, el precursor p55 de Gag da lugar a las proteínas p24, p17, p9 y p6. Los procesos de escisión de las poliproteínas virales, así como del procesamiento tanto sencillo como múltiple del ARNm dan lugar a todas las proteínas virales. En lo que respecta a los ARNm, el balance entre los mensajeros sin procesar, con procesamiento sencillo y múltiple son determinados en gran medida por la proteína REV que a su vez es un producto de procesamiento múltiple [7].

La proteína gp160 se corta proteolíticamente, formando las proteínas gp120 y gp41, esta proteína proviene de un ARNm con un solo procesamiento.

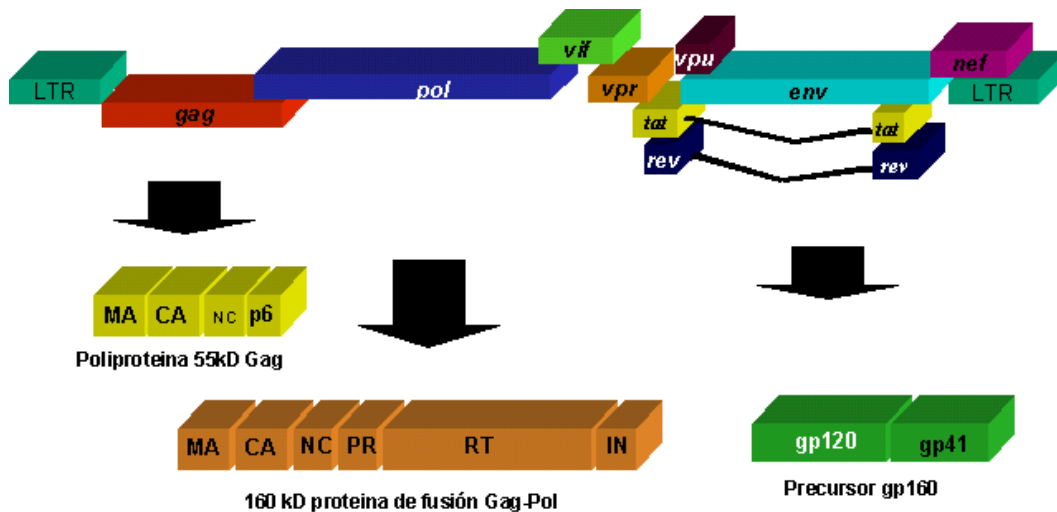


Figura 1. Estructura genómica y procesamiento de las proteínas virales. La poliproteína Gag está compuesta de los dominios matriz (MA), cápside (CA), nucleocápside (NC) y p6. Se produce una proteína (Gag-Pol) que provee de las actividades enzimáticas, como transcriptasa reversa, RNasa H, proteasa e integrasa. Las glicoproteínas de superficie (gp120 y gp41) son producidas a partir de un precursor poliprotéico de 160 kD y traducido a partir del gen env. El genoma de VIH codifica a su vez para varias proteínas accesorias denominadas Nef, Tat, Rev, Vif, Vpr y Vpu. Figura adaptada de [3]

2.3. Estructura del VIH

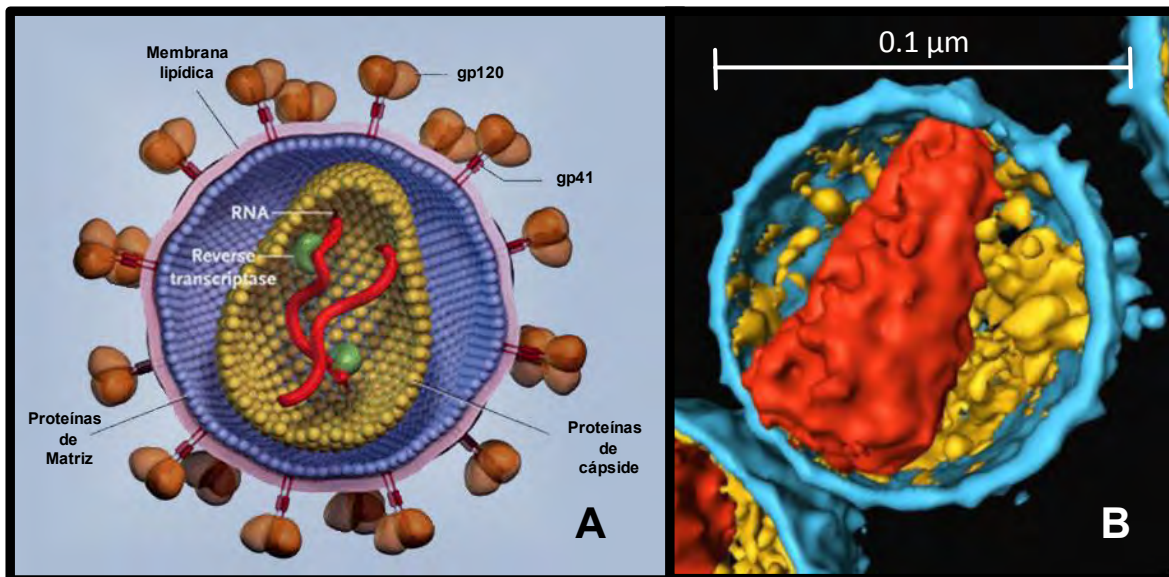


Figura 2. Estructura del VIH-1, el virión mide de 0.1-0.12 μ m de diámetro. (A) Representación esquemática de un virión maduro. (B) Tomografía crioelectrónica de la estructura interna de una partícula de VIH, mostrando la cápside en rojo y la membrana lipídica en azul. El área amarilla son las proteínas de matriz. Figuras adaptadas de [2] y [5] respectivamente.

Los viriones de VIH tienen, tres diferentes tipos de proteínas, las estructurales, regulatorias y accesorias. Siendo las proteínas estructurales Gag, Pol y Env características de todos los retrovirus.

2.3.1 Proteínas estructurales

Gag. Presenta tres proteínas estructurales: la matriz (MA, p17), la cápside (CA, p24) y la nucleocápside (NC, p7). La matriz forma la capa interna en la partícula debajo de la membrana viral, la CA forma el centro cónico que incluye al ARN viral, la polimerasa dependiente de ARN y la RT; la NC interacciona recíprocamente con el ARN viral dentro de la cápside [7]. Estas proteínas virales son generadas por la proteasa viral (PR) al procesar la poliproteína precursora: p55. La localización de las proteínas Gag en el precursor p55 es la siguiente: p17/p24/p2/p7/p1/p6. Gag p55 en su forma no escindida tiene tres dominios, el que apunta a la membrana (M), el de interacción (I) y tardío (L). M, situado dentro de la región de la MA, es miristilada y apunta la proteína de Gag hacia la membrana plasmática. El dominio I es la responsable de la interacción entre los

monómeros de Gag y se encuentra dentro de la NC. El dominio de L, media la gemación viral que involucra a la región p6 de la poliproteína de gag.

Pol. Presenta tres enzimas: la proteasa, la retrotranscriptasa y la integrasa. La proteasa o p10 es una aspartil-proteasa, su forma funcional es un dímero. Actúa cortando las piezas de las proteínas Gag y Pol.

La retrotranscriptasa, está compuesta de dos subunidades de 66 kDa y 51 kDa denominados p66 y p51 respectivamente. La porción N-terminal de la subunidad p66 constituye el dominio polimerasa y la porción C-terminal comprende el dominio de RNasa H, esta se encarga de la degradación de la doble cadena de ARN, una vez sintetizado el ADN, generado por la retrotranscripción. La actividad retrotranscriptasa realizada sobre el ARN viral comienza empleando una molécula de ARN de transferencia, tARN^{Lys} [15] como iniciador.

La integrasa (p31) realiza la inserción del ADN proviral en el genoma celular.

Env. Las proteínas de envoltura, derivan de una glicoproteína precursora de 160kDa, que es escindida dentro de la célula, en una proteína superficial externa de la envoltura (gp120) y una proteína transmembranal (gp41), la superficie del virus posee glicoproteínas de envoltura, como trímeros. Las proteínas de la envoltura se transportan a la superficie de la célula, donde la porción central y el N-terminal de gp 41 se expresan en el exterior del virión. El segmento del asa de gp41 es importante para la fusión membranal.

La proteína gp120, localizada en la superficie del virus contiene los sitios para el acoplamiento de los receptores celulares CD4 en la célula blanco y los principales dominios de anticuerpos neutralizantes [16].

2.3.2. Proteínas reguladoras y accesorias

Como se mencionó anteriormente, los viriones de VIH tienen, además de las proteínas estructurales, las reguladoras de expresión viral (Tat y Rev) como también proteínas accesorias (Nef, Vif, Vpu y Vpr) con funciones moduladoras de la expresión viral y de la patogénesis.

Tat. Es una proteína transactivadora, que actúa como regulador positivo, incrementando la tasa de su propia síntesis y la síntesis de todas las demás proteínas virales[17]. La proteína Tat pesa aproximadamente 23 KDa y su función transactivadora está localizada en la región N-terminal. La función de Tat es dependiente de una secuencia específica de reconocimiento, TAR, localizada en la región 5' de los ARN mensajeros virales. Tat actúa básicamente en la etapa de elongación transcripcional utilizando varios cofactores celulares para su acción [18]. Así, un complejo proteín-cinasa celular llamado TAK (Tat-associated kinase) es capaz de fosforilar el extremo C-terminal de la ARN polimerasa II, esta hiperfosforilación estimula una eficiente elongación transcripcional. El componente cinasa del complejo TAK, Cdk9, interacciona con la proteína celular Ciclina T (CycT), la cual incrementa la afinidad de la proteína Tat por TAR [19].

Rev. Actúa como regulador de la expresión proteica viral. Pesa aproximadamente 19 kDa, tiene una región C-terminal que posee una secuencia para una señal de exportación nuclear (NES). Así, la proteína Rev facilita la exportación de ARNm viral no procesado de 9 kb y también aquel que han sido parcialmente procesado con ARNm viral de 4 kb, la exportación se lleva a cabo del núcleo al citoplasma celular, en cooperación con factores celulares, utilizando la vía CRM/exportina-1 [20].

Vpu. Es una proteína accesoria transmembranal de unos 16 kDa, que está implicada en el eficiente ensamblaje y gemación de las partículas virales, interactuando con los canales de K^+ . Aparentemente aumenta la replicación del virus mediante la formación de poros en la membrana. Puede regular

negativamente la expresión y aumentar la degradación de CD4. También promueve la apoptosis en células infectadas con VIH [21].

Nef. Esta proteína se expresa tempranamente durante replicación viral. Es una secuencia altamente polimórfica. Parece ser un factor pleiotrópico (que puede ser regulatorio negativo o positivo para la replicación del virus). Pesa 27 kDa y tiene diversas funciones; se enlistan algunas que promueven la replicación viral: puede participar en la entrada del virus, aumenta la transcripción inversa, regula negativamente la expresión de CD4 en algunas células T, transporta el colesterol sintetizado recientemente hacia sitios de gemación viral, induce a las proteínas que regulan positivamente la expresión del receptor de las células T y puede hacer susceptibles a las células T CD4⁺ en reposo a la infección[19].

Puede competir por los factores que interactúan con la LTR, disminuyendo la activación celular y la transcripción, regulando negativamente la replicación[21].

Vif. Es el factor de infectividad viral, pesa 23 kDa y parece estar implicado en la eficiencia de transmisión de la infección por el VIH, debido a que se ha observado que partículas virales carentes de *vif* son ineficientes en la infección.[22]

Induce a la ubiquitinación y la degradación de hA3G (proteína intracelular antirretroviral, que tiene actividad de citidina deaminasa, en el cDNA de los retrovirus), a través de las proteínas celulares Cullen 5, elonginas b y c RBX1. Existen reportes que indican que dos dominios de *vif* están involucrados en estas funciones: el primero se une a hA3G y el segundo regula la degradación a través de la vía dependiente del proteosoma. *Vif* también previene la incorporación de hA3G en los viriones y por lo tanto, permite la generación de progenie viral infecciosa.[23]

Vpr y Vpx. La proteína Vpr del VIH-1 pesa de 12-14kDa. Puede participar en la entrada al núcleo de la célula, como parte del complejo de preintegración (PIC) y ayuda a la entrada hacia el núcleo a las células en división y en las que no se

encuentran en este proceso. Esta proteína viaja entre el núcleo y el citoplasma e interactúa con la importina para promover el paso del PIC hacia el núcleo.[24]

Además detiene la proliferación celular en el estado G₂/M del ciclo celular, puede aumentar la transcripción de LTR viral en el ADN viral integrado y aumenta o reduce la apoptosis en células infectadas. La inducción de la apoptosis puede estar relacionada con la inactivación de la proteína anti-apoptótica HAX-1.

El VIH-2 expresa dos genes con homología en funcionalidad a la proteína Vpr del VIH-1: Vpr de VIH-2 y Vpx. La Vpr del VIH-2 mantiene su habilidad para aumentar la infección en células que no se encuentran en división y Vpx es necesaria para la replicación en macrófagos.[21]

Tabla 1. Genes y proteínas del VIH-1.

Gen	Proteína	Nomenclatura y tamaño (kDA)	Función
Gag	gag	P24	Cápside (CA), proteína estructural
		P17	Proteína de la matriz (MA), miristilada.
		P7	Proteína de la nucleocápside (NC), ayuda a la transcripción reversa.
Pol	Polimerasa (pol)	P6	Papel en la gemación (dominio L)
		P66, p51	Transcriptasa reversa (RT): RNAsa H interior de la cápside.
		P10	Procesamiento postraduccional de proteínas virales.
Env	Integrasa (IN) Envoltura (env)	P32	Integración de ADNc viral
		Gp120	Superficie de la proteína de envoltura.
		Gp41	Proteína transmembranal de la envoltura.
Tat	Tat	P14	Transactivación.
Rev	Rev	P19	Regulación de la expresión de ARN viral y transporte de ARN del núcleo al citoplasma.
Nef	Nef	P27	Pleiotrópico, puede incrementar o disminuir la replicación del virus.
Vif	Vif	P23	Incrementa la infectividad del virus y la transmisión de célula a célula, ayuda en la síntesis de ADN proviral y/o en el ensamblaje del virión.
Vpr	Vpr	P15	Ayuda en la replicación del virus transactivación.

Vpu	Vpu	P16	Ayuda en la liberación del virus, interrumpe los complejos gp160:CD4
Vpx	Vpx	P15	Ayuda en la entrada y en la infectividad.

2.4. Ciclo de replicación del VIH

El ciclo de replicación de los lentivirus se divide en dos fases: temprana y tardía. La fase temprana comienza con la unión del virus a la célula y continúa con la formación del provirus integrado en el genoma celular. La fase tardía comienza con la transcripción del ARN viral a partir de ADN proviral integrado y acaba con la liberación de los viriones de la célula. (Figura 3)

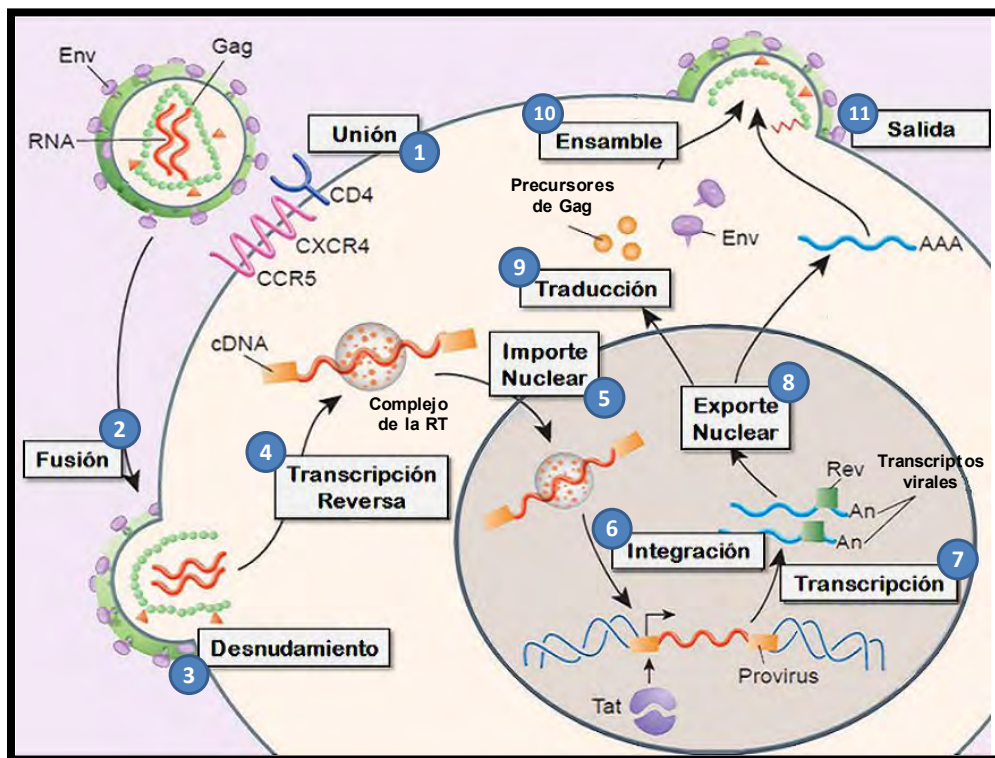


Figura 3. Ciclo de infección del VIH-1. Los pasos como se muestran a continuación: 1: unión; 2: Fusión; 3. Desnudamiento; 4: Transcripción reversa; 5: Importe nuclear; 6. Integración; 7. Transcripción; 8. Exporte nuclear; 9 Traducción; 10. Ensamble; 11. Gemación. Figura adaptada de [25]

2.4.1. Mecanismo de entrada.

-Unión y fusión del virión y la célula.

La unión del VIH a la célula, es mediada por la interacción del dominio transmembranal de Env (gp120) y el antígeno CD4, que posee un dominio de alta afinidad por gp120. Esta unión causa un cambio de conformación en el complejo gp120/CD4 que lleva a la interacción de gp 120 con el correceptor apropiado, (CCR5 en monocitos-macrófagos o CXCR4 en linfocitos).

Tras la interacción gp120/correceptor se produce un cambio conformacional en gp41, se expone un péptido de fusión que posee en su extremo amino-terminal y se genera la unión y fusión de la membrana del virión y de la célula [26].

2.4.2. Eventos post-entrada.

-Síntesis de ADN viral.

Tras producirse la fusión de las membranas, la nucleocápside viral es liberada al citoplasma celular, donde se lleva a cabo la síntesis del ADN viral, mediante la actividad de la transcriptasa reversa, formándose un híbrido de ADN/ARN, posteriormente el ARN es degradado por la ARNasa H y finalmente se sintetiza la hebra de ADN complementaria a la hebra anterior. El proceso de transcripción reversa es uno de los puntos en el ciclo de replicación viral que genera la rápida variabilidad genómica que es característica del VIH, lo cual ha proporcionado al virus una capacidad intrínseca de alterar el tropismo celular, eludir al sistema inmune y desarrollar rápidamente resistencias a la terapia antiviral, así como de generar las diversas variantes de VIH (quasiespecies) que han impedido hasta el momento el desarrollo de una vacuna eficaz [27].

-Integración del ADN viral.

Una vez sintetizada la doble hebra de ADN se produce la translocación del PIC que está constituido por la doble hebra de ADN y varias proteínas virales, hacia al núcleo donde se produce la integración al material genético celular por acción de

la integrasa. La integración en el genoma ocurre principalmente en regiones transcripcionalmente activas en el genoma de la célula hospedera, en particular, en aquellas activadas por la infección del VIH.[28] La integración, puede involucrar un complejo nuclear específico formado por la integrasa viral y la proteína LEDGF/p75. Esta proteína es un factor trascendental, que permite la unión entre la cromatina y la integrasa[29].

-Síntesis de proteínas.

La síntesis del ARN viral se produce a partir del ADN proviral del núcleo, posteriormente es transportado al citoplasma donde tiene lugar la expresión de los genes virales. Dicha expresión tiene lugar en dos fases: en la fase temprana se produce la síntesis de proteínas que no se incluirán dentro del virión (tat, rev y nef) y en la fase tardía se sintetizan las proteínas que se incorporarán en el virión (gag, pol y env). Ese mismo ARN será el ARN viral genómico presente en la progenie viral. La transcripción del ARN viral está regulada por mecanismos complejos tanto virales como celulares que influirán en la latencia clínica y en la patogenicidad del virus [12].

-Ensamble y diseminación del virión.

En primer lugar se produce una asociación de los precursores de Gag y Gag/Pol con la membrana plasmática celular y con el ARN viral genómico, posteriormente se produce el ensamblaje y la liberación de las partículas virales.

-Maduración.

Se procesan los precursores Gag, Gag/Pol por la proteasa viral en proteínas individuales que se combinan para formar un virus funcional [13].

2.5. Historia Natural del VIH.

La progresión de la infección del VIH *in vivo* se divide en tres etapas: aguda, crónica y crítica o SIDA (figura 4). La evolución de la infección puede tener seguimiento realizando mediciones de la cantidad de virus presente en plasma y con recuentos de los linfocitos T CD4⁺ del paciente, siendo la cantidad de virus (carga viral), la virulencia intrínseca de la cepa y la capacidad de respuesta del hospedero, los determinantes de la evolución de la infección.

2.5.1. Fase aguda:

Corresponde a la evolución a partir de la primoinfección y es independiente del mecanismo de transmisión (sexual o vía parenteral) [30]. Ocurre cuando los viriones penetran en las células mediante la fusión de gp120/gp41 con el receptor celular CD4 y su correceptor CCR5. Dependiendo de la localización de la exposición inicial al virus, las primeras células pueden ser los linfocitos TCD4⁺ y los monocitos de la sangre o los linfocitos TCD4⁺ y los macrófagos de los tejidos de las mucosas. Es probable que las células dendríticas de los epitelios de los focos de entrada del virus lo capturen y migren después hacia los ganglios linfáticos, por lo tanto estas células dendríticas pueden desempeñar un papel fundamental en la diseminación inicial del VIH por los tejidos linfáticos. Una vez en éstos, las células dendríticas transmiten el virus a los linfocitos T CD4⁺ a través de contactos intercelulares directos. Algunos días después de la primera exposición al VIH, se detecta una replicación abundante de cepas R5 del virus (aquellas en las cuales existe una mayor afinidad por el correceptor celular CCR5), debido a la elevada expresión de este correceptor en las células T CD4⁺ activadas en los ganglios linfáticos. [31].

Esta replicación provoca una viremia, con cantidades elevadas de partículas víricas en la sangre del paciente (de 10⁶ a 10⁷ copias del VIH/ mL de plasma), acompañada de un síndrome agudo compuesto por distintos signos y síntomas inespecíficos, característicos de numerosas enfermedades víricas. La viremia permite que el virus se disemine por todo el organismo e infecte a los linfocitos T

cooperadores, macrófagos y las células dendríticas de los tejidos linfáticos periféricos, en esta etapa es cuando el sistema inmunitario adaptativo produce una respuesta inmunitaria, tanto humoral como celular que van dirigidas contra los antígenos virales, como p24. También se observa que la cantidad de linfocitos T CD4⁺ comienza a disminuir. Estas respuestas controlan parcialmente la infección y la producción de virus, que se refleja en la disminución de la viremia hasta niveles bajos pero detectables ($30000 \cdot 10^5$ copias/mL), hacia las 12 semanas después de la exposición inicial, además de que la disminución de linfocitos TCD4⁺ en este tiempo es menor.

2.5.2. Fase crónica:

Esta fase dura varios años, durante ella la replicación viral persiste en cantidades bajas y la mayoría de los linfocitos T de la sangre periférica no están infectados, pero experimentan una disminución mantenida. En este periodo de la enfermedad, el sistema inmunitario mantiene su competencia y puede erradicar a la mayoría de las infecciones causadas por microorganismos oportunistas, siendo las manifestaciones clínicas de la infección por el VIH escasas, por lo que esta fase es llamada latencia clínica. La replicación viral se produce en los órganos linfoides donde la carga viral es entre 10 y 10000 veces mayor a la presente en plasma [32], por lo que no existe un estado verdadero de latencia virológica.

Durante la fase progresiva o crónica, aumenta la susceptibilidad del paciente a otras infecciones, las respuestas inmunitarias pueden estimular la producción del virus y apresurar la destrucción de los tejidos linfáticos, debido a que los estímulos que activan a los linfocitos T (como antígenos y diversas citocinas), pueden favorecer la transcripción de los genes virales

2.5.3. Fase crítica o SIDA:

La enfermedad progresa hacia la fase final denominada SIDA, en la que se produce un incremento de la actividad replicativa del virus, igualándose la carga viral circulante y la de los órganos linfoides y se genera una depleción de linfocitos T CD4⁺ circulantes en sangre periférica. Clínicamente, aparece una alteración de

estado general de paciente, infecciones oportunistas, neoplasias, caquexia, insuficiencia renal y trastornos neurológicos.

Dado que los linfocitos TCD4⁺ cooperadores son esenciales para las respuestas inmunitarias tanto humorales como celulares frente a diversos microorganismos, su pérdida es el motivo fundamental de la susceptibilidad de los pacientes con SIDA a muchos tipos distintos de infecciones. Además gran parte de los tumores que aparecen en esos pacientes son virales y su prevalencia en el SIDA, se debe a la incapacidad del paciente infectado por el VIH para elaborar una respuesta inmunitaria eficaz contra los virus oncogénicos.

En la última fase de la infección, existe un cambio de tropismo por parte del virus, emergen las cepas X4 del VIH (aquellas en las cuales se tiene mayor afinidad por el correceptor es CXCR4, en vez del correceptor CCR5), estas tienen mayor patogenicidad y están relacionadas con una rápida caída del número del linfocitos TCD4⁺, una acelerada progresión de la enfermedad y finalmente la aparición de la inmunodeficiencia o SIDA [33, 34].

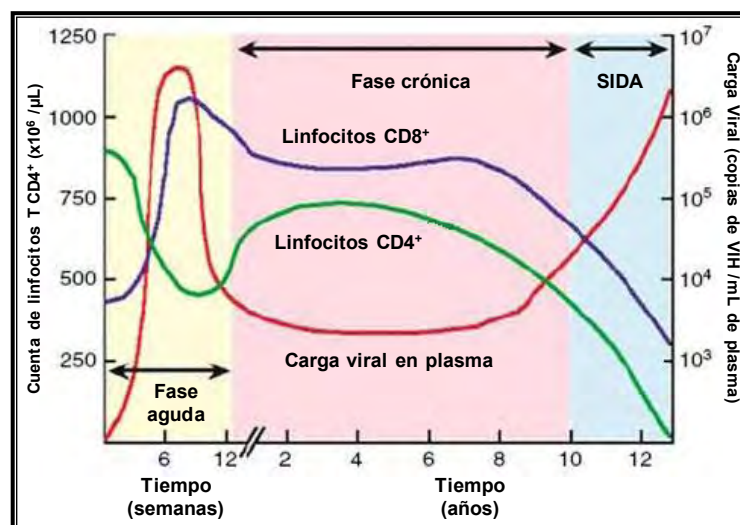


Figura 4. Historia natural del VIH. Se muestra la variación de tres parámetros, dos de ellos son clásicos para realizar el seguimiento por la infección por el VIH: la cuenta de linfocitos TCD4⁺ y la carga viral. Se resaltan en color amarillo la fase aguda, en rosa la Fase crónica y en azul la fase crítica o SIDA. Figura adaptada de [35]

2.6. Respuesta inmunológica ante el VIH.

La infección por el VIH se presenta esencialmente en el sistema inmunológico, considerando las moléculas necesarias para la infección y su expresión restringida por elementos de este sistema, además de las consecuencias de la infección por múltiples mecanismos virales que dañan progresivamente a los órganos linfoides primarios y secundarios. [14].

Pese a que esta infección activa la respuesta inmune innata y adaptativa, en la gran mayoría de los infectados la enfermedad progresa, esto quiere decir que no logran desarrollar mecanismos totalmente efectivos para controlar completamente la infección, destruyendo las células del sistema inmune y los órganos linfoides, lo cual conduce a una inmunodeficiencia seria, a menos que se instaure oportunamente un esquema de terapia antirretroviral altamente efectiva (HAART) [36].

La inmunodeficiencia observada durante la evolución de la infección es de tipo combinado, es decir que compromete tanto la respuesta inmune innata como la adaptativa y tanto los mecanismos efectores humorales como los celulares.

En cuanto al escape de la respuesta inmunológica por parte del virus, se sabe que tiene una capacidad inherente para generar mutaciones en las secuencias antigénicas reconocidas por el sistema inmunológico adaptativo, creando cepas de escape. En consecuencia, a pesar de casi dos décadas de investigaciones dirigidas a inducir una respuesta inmune adaptativa contra el VIH, no se han implementado terapias inmunológicas o vacunas exitosas. [37]

2.6.1. Inmunidad innata

El sistema inmune innato es la primera línea de defensa contra los patógenos invasores y es particularmente importante en el control de bacterias y virus que tratan de ingresar por las superficies epiteliales y mucosas [38].

La importancia de la respuesta innata en el control de la infección es actualmente un área de mucho interés, ya que varios componentes del sistema inmune innato

tienen un efecto directo anti VIH y al mismo tiempo, son blanco de la infección viral [14]. Entre ellos, se mencionan:

Factores solubles. Los componentes solubles de la inmunidad innata están entre los primeros factores que fueron evaluados buscando actividad natural contra el VIH; se descubrió que la lectina de unión a de manosa (MBL) y proteínas del complemento se unen directamente al virus, estimulando la fagocitosis mediada por los neutrófilos y macrófagos, e induciendo la lisis del virus [14]. Se ha observado que el complemento puede destruir el virus en presencia de anticuerpos antivirales específicos; de esta manera, el complemento integra la inmunidad innata y la adaptativa en la respuesta contra el VIH. Pese a estas observaciones, actualmente se considera que la acción de estos factores solubles en el control in vivo de la infección tiene muy poca relevancia.[39]

Otros componentes solubles, incluyendo las quimiocinas beta (RANTES, MIP-1 α y MIP-1 β), citocinas y algunas defensinas, son secretados luego de la interacción de los microorganismos patógenos con las diferentes células del sistema inmune innato y pueden modular tanto la respuesta inmune celular innata como la adaptativa. Por ejemplo, las citocinas interleucina-12 (IL-12), IL-4, IL-6, IL-16 e interferón-gamma (IFN- γ) determinan si predomina una respuesta inmune adaptativa tipo Th1 o Th2. La respuesta Th1 coordina la acción del sistema inmune contra las infecciones por patógenos intracelulares, como el VIH. La respuesta tipo Th2 regula la inmunidad contra los patógenos extracelulares mediante el estímulo para la secreción de anticuerpos y se ha observado que esta predomina en los pacientes infectados por el VIH, en especial, en los que están en fases avanzadas de la enfermedad [40, 41].

Otras citocinas, como el factor de necrosis tumoral-alfa (FNT- α) y los interferones (IFN) también afectan la replicación del virus. Las quimiocinas dirigen el reclutamiento y activan las funciones de células inmunomoduladoras y efectoras, como las células natural killer (NK), las células dendríticas, los linfocitos T efectoras y de memoria y los macrófagos, acumulándolas en los sitios de replicación viral. La producción de quimiocinas beta y en particular, la presencia o

ausencia de sus receptores puede influir también en la capacidad del virus para infectar las células blanco [40].

Células NK. Las células NK constituyen una de las primeras líneas efectoras de la respuesta innata contra los microorganismos. Debido a su rápida movilización y actividad citotóxica constitutiva; se considera que las células NK son responsables del control inicial de la replicación viral, dando tiempo para que la respuesta inmune adaptativa se desarrolle y elimine los remanentes de la infección. En los individuos sanos, las células NK constituyen entre el 5% al 16% de los linfocitos circulantes, con dos subpoblaciones que se diferencian de acuerdo con la expresión de las moléculas CD56 y CD16. Las células NK CD56⁺⁺/CD16⁻, que corresponden al 5% de la células NK, producen IFN- γ , tienen acción inmunomoduladora, no secretan perforina y no son citotóxicas. En contraste, el 95% de las células NK son CD56^{bajo}/CD16⁺⁺, no secretan IFN- γ , expresan y secretan perforina y tienen actividad citotóxica [42]. Las células NK normalmente atacan aquellas células que tienen una baja expresión de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), clase I; muchas células tumorales e infectadas por virus regulan negativamente la expresión de las moléculas del CMH clase I como una forma de evadir el reconocimiento por los linfocitos T CD8⁺, haciendo susceptibles a estas células de la eliminación por las células NK . Las células NK pueden eliminar directamente las células infectadas por medio de la activación de uno de los receptores naturales de citotoxicidad (natural cytotoxicity receptors, NCR) como la molécula NKp44 o por medio de la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC). La ADCC es importante durante la infección, pues se ha observado que una fuerte actividad de ADCC se asocia con una mayor duración del estado clínico asintomático y una mejor evolución clínica [43]. Las células NK, también son una fuente de citocinas inmunorreguladoras como el IFN- γ , el FNT- α , el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), así como de las quimiocinas beta MIP-1 α y RANTES, factores que pueden inhibir in vitro e in vivo la replicación del virus.[44]

Recientemente, se demostró un aumento significativo de la actividad de las células NK en individuos expuestos al VIH que no se infectaron (expuestos seronegativos); en particular, las células NK de estos individuos presentaban un aumento en la secreción de IFN- γ . Se ha demostrado que el IFN- γ tiene una actividad anti-VIH directa, mediada principalmente por un antagonismo de la transactivación viral inducida por la proteína viral Tat. Además, el IFN- γ es importante para la activación de la respuesta inmune adaptativa y se ha propuesto como uno de los mecanismos responsables de la resistencia natural a la infección [45].

Células dendríticas. Las células dendríticas son las principales células presentadoras de antígeno y activan la respuesta inmune innata y adaptativa por medio de la expresión de moléculas coestimuladoras y la secreción de citocinas como IL-12, FNT α , IFN- α , IL-7 e IL-1. Pueden ayudar a controlar la infección por medio de la producción de quimocinas e IFN tipo 1 (IFN α y β).

Las células dendríticas plasmacitoides son las principales células productoras de IFN tipo 1, se encuentran principalmente en los tejidos linfoides, mientras que en la sangre periférica corresponden al 0.2% a 0,9% de las células mononucleares.

Varios estudios sugieren que durante la infección, las células dendríticas plasmacitoides pueden proteger a los individuos infectados de desarrollar neoplasias e infecciones oportunistas, por medio de la producción de IFN- α y de la modulación de la respuesta inmune innata y adaptativa.[46]

Como sucede en la fase inicial de las infecciones virales, el IFN- α puede tener un efecto anti-VIH directo en la fase aguda de esta infección, bloqueando la replicación viral; además, esta citocina modula una variedad de acciones antivirales y antitumorales que activan otras células de la respuesta inmune como las células dendríticas mieloides, los monocitos, las células NK y los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. Por ejemplo, el IFN- α puede incrementar el reconocimiento del VIH por el sistema inmune adaptativo al incrementar la expresión de las moléculas del CMH clase I en las células presentadoras de antígeno[47].

Los IFN tipo 1 también incrementan la producción de IFN- γ por los linfocitos T CD4⁺, prolongan la supervivencia de los linfocitos T y promueven el desarrollo de

respuestas inmunes tipo Th1. Sin embargo, la actividad del IFN- α durante la infección crónica, es más compleja e impredecible y es potencialmente nociva para el sistema inmune; en los individuos crónicamente infectados por el VIH, el IFN- α puede favorecer la apoptosis de los linfocitos T CD4⁺ al inducir la expresión de las moléculas TRAIL y DR5, proteínas de superficie celular que al interactuar activan la transducción de señales inductoras de apoptosis.[41]

Actividad anti-VIH no citotóxica de las células T CD8⁺. Los linfocitos T CD8⁺ son un ejemplo de elementos del sistema inmune que puede tener acciones contra el VIH, tanto en la respuesta innata como en la adaptativa. Estas células pueden controlar la replicación viral en las células infectadas por medio de dos mecanismos: la actividad citotóxica clásica (adaptativa) y por una respuesta antiviral no citotóxica (CNAR). La actividad CNAR fue descubierta en individuos asintomáticos positivos para VIH; los estudios in vitro con células de esos individuos mostraron que cuando se retiraban las células T CD8⁺, el virus se replicaba y se podía recuperar del cultivo, mientras que la adición de estas células suprimió la replicación del VIH en una forma dependiente de la dosis. Sin embargo, la actividad de estas células no llevaba a la eliminación de las células infectadas.

La actividad CNAR tiene características de una respuesta innata: no es específica contra el virus, tampoco es específica de especie, no es restringida por moléculas del CMH clase I o clase II y ocurre rápidamente después de la infección.

Esta actividad antiviral es policlonal (se observa en múltiples células T CD8⁺) y también se ha observado en clones de células T CD8⁺ de individuos no infectados. Finalmente, la actividad CNAR también se ha encontrado en individuos expuestos seronegativos, lo que indica que puede constituir otro de los elementos involucrados en la resistencia natural contra este virus [48].

La actividad CNAR es mediada por un factor soluble secretado, denominado el factor antiviral de las células T CD8⁺ (CD8⁺ T cell antiviral factor, CAF).

El CAF es aparentemente una nueva proteína, diferente de otros factores celulares con actividad antiviral conocida, como los IFN y las quimiocinas. Las quimiocinas bloquean la infección, al competir por los receptores (que son los

correceptores para el VIH); se ha demostrado que el efecto de CAF ocurre posterior a la entrada del virus a las células blanco, durante la transcripción viral [49, 50].

2.6.2. Inmunidad adaptativa.

Esta inmunidad es específica y además tiene la capacidad de crear memoria. En la infección por el VIH la inmunidad humoral y celular está relacionada a procesos que involucran a los anticuerpos circulantes que reaccionan contra este virus y contra las células infectadas por el, a continuación se menciona la respuesta humoral y celular:

2.6.2.1. Respuesta humoral:

Se ha demostrado que durante la evolución de la infección viral se induce la producción de anticuerpos neutralizantes, los cuales se unen a las proteínas virales que interactúan con los receptores y correceptores, previniendo la entrada del VIH a las células blanco, entre mayor sea el repertorio de anticuerpos neutralizantes, mejor es el pronóstico de la infección. Sin embargo, debido a la presión ejercida por los anticuerpos neutralizantes y a la gran capacidad de mutación que presenta este virus, empiezan a aparecer mutantes virales o cepas de escape que van siendo resistentes a la acción neutralizante de los anticuerpos .

Otro de los mecanismos antivirales ejercido por los anticuerpos corresponde a la ADCC, mediada por macrófagos y células NK, la cual se desencadena cuando una célula infectada que expresa en su superficie proteínas virales, es reconocida por los anticuerpos específicos que, uniéndose a los receptores Fcγ de esas células efectoras, provocan la lisis de las células infectadas [14].

Un factor que impide el establecimiento de una respuesta humoral protectora universal contra el VIH es la gran variabilidad de virus circulante en el mundo, con muy poca reacción cruzada entre ellos. Aunado a esto, un individuo puede tener infecciones mixtas (por dos o más subtipos), con cepas que pueden intercambiar material genético para originar cepas recombinantes [36].

Los anticuerpos anti-HIV que no tienen capacidad neutralizante pueden llegar a potenciar la infección de células como los neutrófilos, monocitos, macrófagos,

células dendríticas mieloides, células NK y linfocitos B que expresan receptores Fcγ, los cuales unen la fracción FC de las inmunoglobulinas que se encuentran formando complejos inmunes con los virus. Además, durante la infección viral se produce una hiperactivación policlonal de linfocitos B y se desencadenan respuestas inmunes contra proteínas propias del hospedero portadas por el virus en su envoltura; este fenómeno se ha asociado con la mayor frecuencia de procesos autoinmunes mediados por anticuerpos que se observan durante esta infección [36].

2.6.2.2. Respuesta Celular

Actividad citotóxica de las células T CD8⁺. Los linfocitos T CD8⁺ activados específicos para el VIH destruyen células infectadas y se encargan del control inicial de la infección durante la primoinfección; esta respuesta citotóxica específica se correlaciona con la disminución en la viremia observada en los primeros meses después de la infección. [51]

Respuesta de los linfocitos T cooperadores CD4⁺. Los linfocitos T CD4⁺ cooperadores (LTh) son esenciales para el desarrollo de la respuesta inmune protectora y la memoria inmunológica de larga duración contra los microorganismos patógenos. Los LTh proveen las señales complementarias que requieren los linfocitos B para la producción de anticuerpos y también ayudan a los linfocitos T CD8⁺ para desplegar su actividad citotóxica; además, producen las citocinas necesarias para potenciar la respuesta efectora de las principales células de la inmunidad innata como los macrófagos, las células NK, las células dendríticas y los neutrófilos. Desde la fase aguda de la infección se activa una respuesta específica de LTh contra este virus; sin embargo, esta respuesta no es efectiva para controlar la infección y se va perdiendo gradualmente a medida que se van eliminando éstas células [50].

2.7. Tratamiento, Vacuna.

Son muchos los esfuerzos de investigación dedicados al desarrollo de productos que interrumpan el ciclo de replicación del virus, en la actualidad el tratamiento de la infección por el VIH y el SIDA consiste en la administración de tres clases de fármacos antirretrovirales, que se utilizan en combinación y que intentan combatir moléculas del virus que no presentan actividad o estructura homóloga a proteínas humanas [52].

Cabe señalar que estos fármacos no eliminan al virus, pero reducen la carga viral, e interfieren con la replicación y generación de viriones infectivos.

El espectro de fármacos antirretrovirales descubiertos para el VIH, se centra en blancos vulnerables del ciclo de replicación del virus. En la primer terapia antirretroviral se empleó al inhibidor de la RT azidovudina (o AZT), que es un análogo de nucleósidos, fue aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) en 1987 [53]. En la tabla 2, se muestran los fármacos antirretrovirales que están aprobados hasta el 2009.

Los análogos de nucleósidos de la RT, interfieren en la replicación del VIH inhibiendo de forma competitiva esta enzima. Sin embargo la monoterapia posee una actividad limitada contra el VIH. Posteriormente, aparecieron blancos adicionales a la RT como la proteasa, los inhibidores de esta enzima se unen a su centro activo inhibiendo la formación de proteínas virales maduras y haciendo que la partícula viral no sea infecciosa. Cuando estos inhibidores se administran en monoterapia, inducen una rápida producción de virus mutantes que resisten a sus efecto [54]; También están presentes los inhibidores de la integrasa, que impiden la integración del ADN proviral en el ADN de la célula hospedera [14].

Es en 1995 cuando se llevan a cabo los primeros ensayos clínicos usando un inhibidor de proteasa en combinación con dos inhibidores de la RT, esta triple terapia combinada se denominó *terapia antirretroviral altamente activa* (highly active antirretroviral therapy [HAART]). Con esta nueva estrategia la historia natural de la infección por VIH cambia de forma radical; por un lado el número de

linfocitos T CD4⁺ se recupera y por otro se consigue reducir la cantidad de carga viral por debajo de 20-80 copias/mL en más del 50-80% de los pacientes. Este efecto se mantiene durante periodos superiores a un año, alcanzándose respuestas superiores a los 4 años [52].

Otras terapias antirretovirales fueron posibles con la introducción de los inhibidores no nucleósidos de la RT (NNRTI), que constituyen un grupo estructuralmente diverso que se unen a una región distante del centro activo generando cambios conformacionales en el centro activo de la RT e inhibiendo su actividad [55].

El desarrollo e introducción de nuevos fármacos continúa. Entre las nuevas clases de fármacos anti-VIH, que se están sometiendo a estudios clínicos figuran los inhibidores de la entrada del virus (antagonistas del receptor de quimiocinas e inhibidores de la fusión entre el virus y la membrana celular) [56].

Sin embargo ningún tratamiento consigue la erradicación y en los protocolos prolongados aparecen resistencias a los fármacos. Además el tratamiento, con antirretrovirales puede tardar, en teoría, decenios en erradicar los reservorios de células con infección latente [36].

Tabla 2 Nombres genéricos y abreviaciones comunes de los antirretrovirales aprobados por la FDA[57]

Nucleosidos inhibidores de la RT		Inhibidores de proteasa	
Abacavir	ABC	Amprenavir	APV
Emtricitabina	FTC	Fos- Amprenavir	fAPV
Didanosina	Ddl	Atazanavir	ATV
Lamivudina	3TC	Darunavir	DRV
Estavudina	d4T	Indinavir	IDV
Zalcitabina	ddC	Lopinavir	LPV
Zidovudina	ZDV	Nelfinavir	NFV
Tenofovir	TDF	Saquinavir	SQV
		Ritonavir	RTV
		Tipranavir	TPV

Inhibidores de la integrasa			
Raltegravir			
No nucleosidos inhibidores de la RT		Inhibidores de entrada y fusión	
Delavirdina	DLV	Enfurvirtida	ENF
Efavirenz	EFV	Maraviroc	MVC
Nevirapina	NVP		
Etravirina	ETR		

2.7.1. Vacuna

El desarrollo de una vacuna eficaz contra el VIH se ha convertido en una prioridad de la investigación biomédica en todo el mundo, ya que con ella se reduciría la infección protegiendo a la población, desafortunadamente la tarea es complicada, por diversos factores: la gran capacidad del virus para mutar (de esta forma cambia sus antígenos inmunógenicos), que el VIH se integra en el genoma celular, que afecta sitios inmunológicamente privilegiados (como ganglios), que el virus compromete la función inmune (al tener como blanco principal a las células de este sistema) y que se puede inducir respuesta autoinmune [58].

Para que una vacuna sea eficaz, se deben de cumplir varias características, entre las que se encuentran: inducción de inmunidad local en todos los sitios de entrada del VIH, estimulación de las respuestas inmunes humorales, así como las celulares frente a los antígenos vírales, inducción de respuesta inmune de reconocimiento a las células infectadas de forma latente, que posterior a su aplicación no se provocara respuesta autoinmune y que no se presentaran efectos a largo plazo[59].

Se han utilizado una gran diversidad de estrategias para la vacunación contra el VIH, por ejemplo con virus inactivados, variantes replicativas atenuadas, vacunas subunitarias (gp 120, gp160, gp41, gag), proteínas virales en vectores replicativos (virus, bacterias), cápsides virales con proteínas de la envoltura “pseudoviriones”, péptidos virales, anticuerpos neutralizantes, transferencia genética de DNA y proteínas derivadas de plantas[14].

Hasta ahora, la forma más eficaz y segura de inmunización ha sido la aplicación de una inmunización primaria con un vector replicativo, que expresa proteínas de VIH, seguido de un refuerzo con una proteína subunitaria u otro vector viral replicativo.

El éxito de la vacunación podría incrementarse a través de adyuvantes apropiados, que puedan aumentar de forma selectiva la respuesta inmune innata y adaptativa [36].

Actualmente se están realizando ensayos clínicos con una inmunización primaria que consiste en una vacuna basada en un vector poxviral y un refuerzo con la proteína de envoltura [60].

2.7.2. Nuevas expectativas de terapia antiviral.

Debido a la naturaleza intracelular del VIH, la respuesta inmune celular parece ser el mecanismo más importante, para controlar o prevenir la infección por el VIH en el hospedero, ya que en el ciclo de replicación se encuentran involucradas proteínas intracelulares que pueden variar dependiendo del tipo celular en el que se esté llevando a cabo la infección. De esta manera la infección por el VIH necesita de factores celulares para ser productiva [28].

En lo referente a la vacunación, se han realizado varias pruebas con virus activos, con el objetivo de que induzcan una respuesta aguda de linfocitos. Entre estas vacunas figuran las de virus híbridos recombinantes no virulentos, compuestas en parte por secuencias del VIH y las de virus atenuados mediante deleciones de una o varias partes del genoma. Pero existe la posibilidad de que se produzca la enfermedad si los virus no se atenúan por completo o si se recombinan in vivo con un VIH natural, para generar una variante patógena. Otro método que evita este problema de seguridad, pero que mantiene la eficacia en cuanto a la inducción de una inmunidad mediada por los linfocitos T CD4⁺, es el uso de vectores virales no VIH recombinantes que portan genes del VIH. Ensayos realizados han demostrado que se han obtenido respuestas considerables frente a los antígenos de retrovirus. También se han estudiado muchas vacunas de ADN, formadas por

combinaciones de genes estructurales y reguladores del VIS o del VIH, empaquetados en vectores de expresión de ADN de mamíferos [14, 36].

Otra estrategia a considerar es aprovechar la actividad antirretroviral de factores celulares llamados también factores de restricción como TRIM5, Teterina (BST-2) y APOBEC3G.

2.7.2.1. APOBEC3G (hA3G)

Hace algunos años, Malim y colaboradores describieron un efecto intracelular que contrarrestaba el VIH en células humanas. La resistencia involucraba a un factor intracelular innato, que es neutralizado con la proteína viral vif [28].

Los descubrimientos se basaron en estudios que comparan variantes de VIH que carecen de vif contra el VIH silvestre con el gen vif y se demostró que algunas células T (por ejemplo CEM-SS) son altamente permisivas a ambos virus, mientras que las células mononucleares de sangre periférica (PBMC's), no lo son.

Estudios posteriores descubrieron que un gen celular humano (CEM-15) inhibía la replicación del VIH, su efecto era neutralizado por la proteína Vif. Subsiguientemente se describió que CEM-15 representaba un gen humano que codifica para la proteína hA3G [61].

En 1993 se identificó otra proteína de esta familia, a la APOBEC1 que es expresada en tejido gastrointestinal y es el componente central de un complejo que desamina la citosina 6666, el complejo convierte la glutamina de esta posición a un codón de paro, resultando en una versión truncada de APOBEC.

Todos los genes de APOBEC (hA3A-hA3H) están dispuestos en la misma orientación. Se expresan en el bazo, linfocitos de la sangre periféricos, ovarios y testículos, sin embargo muy poco del ARNm de hA3B es detectable en estos tejidos. Se ha encontrado que hA3B, hA3C y en menor medida hA3A prevalecen en varias líneas celulares de cáncer. hA3F y hA3B se co-expresan con hA3G y muestran moderados niveles de actividad contra el VIH [62, 63].

2.7.2.1.1. Descripción



Figura 5. Estructura tridimensional de la proteína APOBEC3G. Adaptada de [1]

APOBEC3G o “Apolipoprotein B mRNA Editing Enzyme Catalytic Polypeptide- like 3G”, es una proteína intracelular humana, ubicada en el cromosoma 22, perteneciente a la superfamilia de las proteínas APOBEC, que tienen actividad de citidina deaminasa en el cDNA de los retrovirus, dando lugar a una hipermutación guanina por adenina, lo cual puede resultar en una degradación del ADN proviral o en un ADN defectuoso. Es expresada principalmente en estirpes celulares de linfocitos y macrófagos.

hA3G consta de dos dominios. El dominio catalítico es importante para su función, la región de unión a zinc es esencial para la actividad de citidin deminasa y los efectos antivirales. El otro dominio es el responsable de la unión al ARN y es requerido para encapsular a hA3G en las partículas virales [28].

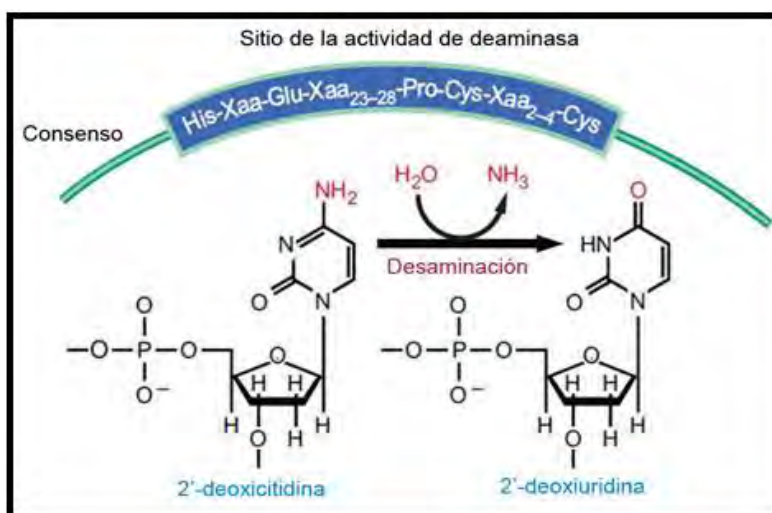


Figura 6. Sitio activo de la enzima, cataliza la desaminación hidrolítica en el C4 de la 2'-deoxicitidina, que requiere la presencia de residuos de cisteína, coordinar con el ión Zn y un glutamato, involucrado en acarrear protones. En esta reacción, la 2'-deoxycytidina se convierte en 2'-deoxyuridina como resultado de la eliminación de un grupo de Amino en presencia de agua. Adaptada de [6]

Se observó que las células T en reposo de órganos linfoides que presentaban la proteína, eran mayoritariamente infectadas, en comparación a las células T en reposo de sangre periférica, que también la presentaban [6]. Estudios posteriores, demostraron que existían dos tipos de complejos de hA3G, el de bajo peso molecular que está presente en la células T de sangre periférica, es enzimáticamente activo y puede ser convertido a un complejo de alto peso molecular, mediante la acción de varias citocinas, incluyendo IL-2 y IL-15, las cuales están presentes en el microambiente del tejido linfoide, este complejo pesa aproximadamente de 5-15MDa y la actividad antirretroviral de la proteína está altamente inhibida, razón por la cual las células de órganos linfoides son más permisivas a la infección [6, 64].

2.7.2.1.2. Genoma

El locus del gen de APOBEC contiene siete distintos genes, localizados en el cromosoma 22 en humanos. Su expansión genética es llevada en tándem. Cuatro genes (hA3B, hA3DE, hA3F y hA3G) muestran una duplicación del dominio de citidin deaminasa [62].

El ARNm de hA3G tiene aproximadamente 1.5 kilobases que codifica para 384 aminoácidos y el ADN linear tiene cerca de 8 Kilobases. Cuenta con ocho exones y siete intrones [4, 65].

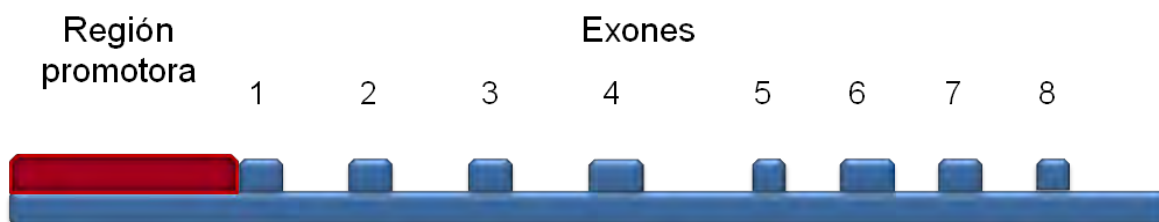


Figura7. Mapa genómico de la proteína APOBEC3G, se muestra la distribución de exones (no a escala)[4]

2.7.2.1.3. Actividad antirretroviral

En ausencia de vif, hA3G es efectivamente incorporada a los viriones de VIH. Este proceso requiere de interacción con la nucleocápside de la poliproteína gag y con el ARN viral. Si se incorporan 7 ± 4 moléculas de hA3G a los viriones carentes de vif, son suficientes para inhibir la replicación durante la siguiente ronda de infección. [6]

Esta proteína que tiene actividad de citidin-deaminasa, actúa principalmente por dos vías de acción, la de citidina dependiente, en la cual es capaz de inducir numerosas mutaciones, convirtiendo la citosina en uracilo, empleando como sustrato el DNA de cadena sencilla o cDNA viral, resultando en mutaciones de guanina por adenina, lo que causa la degradación del DNA viral debido al reconocimiento por endonucleasas apurinica-pirimidinicas de sitios abasicos; o por la aparición de hipermutaciones, afectando la replicación del virus puesto que se producen codones de paro.

La otra vía es independiente de la actividad citidin-deaminasa, en este caso la enzima actúa por impedimento estérico, inhibiendo a la transcriptasa reversa viral[6].

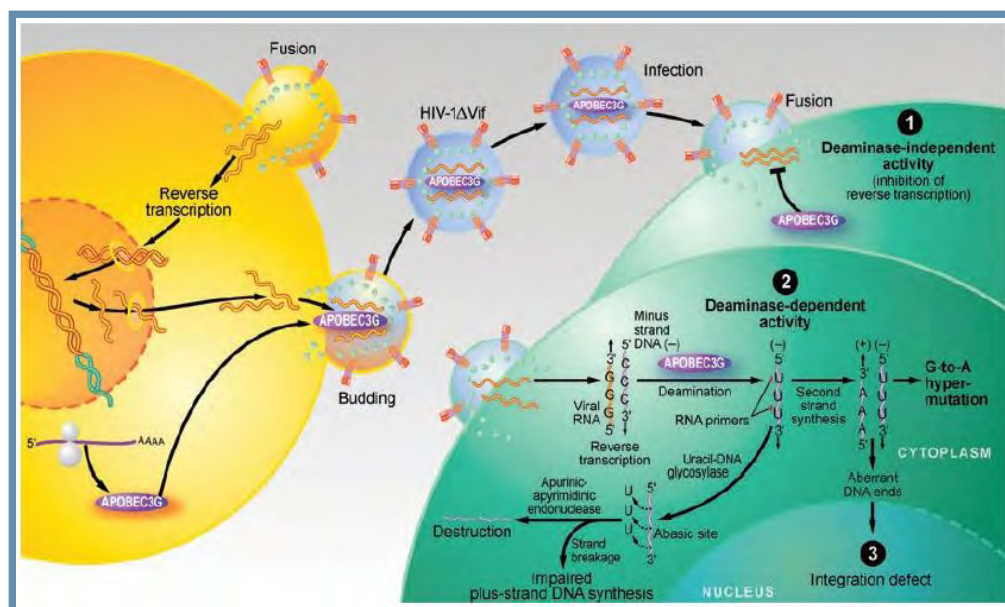


Figura 8. Acciones antivirales de hA3G, en ausencia de vif. Figura adaptada de [6]

Esta actividad antirretroviral es neutralizada por *vif* (proteína viral que proporciona infectividad al virus), que impide la incorporación de hA3G en los viriones, tanto por la inhibición de su traducción y/o por inducción de su ubiquitinación y posterior degradación [28].

2.7.2.1.3.1. Actividad *in vivo*

En vivo, la importancia de la hipermutación de hA3G como un agente de protección de la patogénesis y de la progresión de la enfermedad por VIH sigue siendo incierta. En un estudio se observó que los niveles de ARNm de hA3G en PBMCs activados, tienen una relación inversa con los niveles de ARN del VIH en plasma y son proporcionales con el conteo de células T CD4⁺. En contraste, un grupo diferente de investigación no ha encontrado ninguna correlación [66, 67].

Por otra parte, un informe mostró un aumento considerable de ARNm de hA3G en PBMCs y células de biopsia cervical de individuos expuestos seronegativos al VIH y un informe independiente encontró que en PBMCs estimuladas de no progresores a largo plazo, se han encontrado niveles de ARNm de hA3G significativamente mayor que en controles de personas no infectadas o individuos con VIH progresivo. Por último, se encontró que los pacientes VIH⁺ que tiene baja carga viral tuvieron una mayor expresión hA3G que los pacientes con alta carga viral. Tomando en cuenta los estudios anteriores, se puede asociar una actividad neutralizante del VIH por la actividad de hA3G [67].

2.7.2.1.4. Caracterización de forma genética en poblaciones

hA3G se puede considerar un factor importante del hospedero, que además de conferir una resistencia intrínseca al VIH, podría actuar contra otros agentes patógenos que tienen un paso obligado de transcripción inversa. Dada esta importancia, se han reportado trabajos que analizan el gen de hA3G examinando variantes de la región que podría modificar la transcripción de la proteína.

Se encontraron polimorfismos de una sola base, (single nucleotide polymorphisms [SNPs]) y se analizaron sus efectos y haplotipos en varias cohortes de personas, con características muy particulares, siendo las más comunes personas que no se han infectado a pesar de su exposición el VIH. Estas personas se denominan personas expuesta seronegativas (ES) o personas altamente expuestas seronegativas (HEPS por sus siglas en ingles Highly Exposed Persistently Seronegative). También se han hecho estudios con personas infectadas por el VIH y que permanecen con niveles bajos de replicación viral durante largos periodos de tiempo, son los llamados “Controladores”.

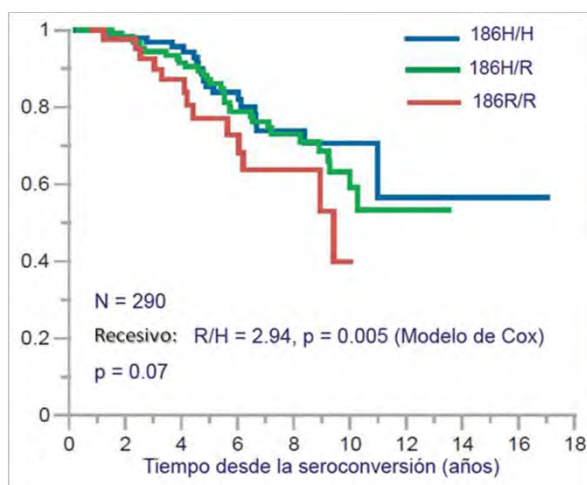


Figura 9. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de progresión de VIH-1 a SIDA, después de seroconversión para los tres genotipos de APOBEC3G-H186R en Afroamericanos, se puede observar que si el alelo es homocigoto recesivo o heterocigoto, el tiempo de progresión a SIDA es menor. 186H/H Homocigoto dominante; 186 H/R Heterocigoto; H 186R/R Heterocigoto recesivo. Figura adaptada de [4]

En el trabajo descrito por Ping A. y colaboradores (2004) se encontraron seis SNP's en el genoma de hA3G, se analizaron sus haplotipos y efectos en cinco cohortes de los Estados Unidos y una Suiza para observar su influencia sobre la progresión, obteniendo la frecuencia alélica y genómica de los diferentes polimorfismos. Con este estudio, se encontró que el polimorfismo no sinónimo ubicado en el exón 4 (H186R, la sustitución resulta en el cambio de aminoácido de histidina a arginina) que puede aparecer en forma homocigota recesiva y heterocigota, está

relacionado con la rápida progresión a SIDA y muerte en las personas afroamericanas (ver figura 9).

En referencia a los haplotipos, se observó que se distribuyen de forma diferente entre personas de ascendencia asiática, Europea y Africana. Esto indica que los haplotipos de hA3G, posiblemente fueron diferentes a través de eventos históricos o evolutivos en poblaciones geográficas. Los distintos orígenes genéticos en las

frecuencias alélicas y genómicas entre el mundo, pueden explicar, en parte, los efectos específicos genéticos del VIH en la población [4].

Por lo tanto en este proyecto caracterizamos genéticamente al promotor y al exón 4 de la proteína hA3G en población mexicana, tomando principalmente cuatro cohortes de personas: donadores sanos, expuestos seronegativos, VIH positivos y VIH+ con baja carga viral, debido a que los polimorfismos en el promotor podrían estar relacionados con una mayor o menor expresión de la proteína hA3G, además de que para el exón 4 se han reportado efectos en el tiempo de progresión a SIDA en otras poblaciones.

3. JUSTIFICACIÓN

El VIH es un problema de salud mundial, se estima que en el 2008 estaban infectadas 33.4 millones de personas y que en ese mismo año se infectaron 2.7 millones [68]. A pesar de que se han realizado grandes avances en la investigación de esta enfermedad, que ayudan al tratamiento del VIH, no se ha encontrado una cura ni una vacuna.

En parte, podría deberse a una parcial incomprensión de los mecanismos que se establecen entre el sistema inmune del hospedero y el VIH, por ello es una necesidad estudiarlos, dentro de estos es importante profundizar en el conocimiento de factores celulares que protegen al hospedero y que podrían ser clave en el desarrollo de mejores estrategias terapéuticas.

En este estudio, nos enfocamos a la caracterización genética de la proteína intracelular con actividad antirretroviral hA3G, en diversas cohortes de estudio, ya que se ha observado que está altamente expresada en personas VIH+ con baja carga viral y en personas expuestas seronegativas, lo que da una pauta a conocer el mecanismo por el cual se percibe una protección y menor progresión a SIDA en estas cohortes de personas.

Se ha estudiado la variación genética de la proteína hA3G, en diferentes poblaciones caracterizando diversos polimorfismos de una base (SNPs), algunos de ellos, como el que se presenta en el exón 4 (H186R) se relacionó en población afroamericana infectada con VIH, con una mayor progresión a SIDA.

Es por ello que es importante caracterizar e identificar en población mexicana, polimorfismos de una base en diferentes cohortes de personas, que pudieran relacionarse con el tiempo de progresión a SIDA o con la protección contra la infección, este conocimiento podría ser de importancia en la prevención de la enfermedad y en el diseño de mejores estrategias terapéuticas para el VIH.

4. HIPÓTESIS

Se han encontrado polimorfismos en la proteína intracelular APOBEC3G y aun no se ha determinado su asociación con la susceptibilidad a la infección así como con el tiempo de progresión a SIDA, por lo tanto si se encuentran polimorfismos en la región promotora y en el exón 4 relacionados a alta expresión de hA3G, en expuestos seronegativos y pacientes que son VIH+ con baja carga viral, se asociará con la susceptibilidad a la infección y la rapidez del tiempo de progresión a SIDA.

5. OBJETIVOS

El Objetivo general es, caracterizar de forma genética a la proteína hA3G en pacientes que son VIH+ con baja carga viral y en personas expuestas no infectadas, como posible factor que limite la replicación viral y confiera protección contra la infección.

Objetivos particulares:

1. Detectar polimorfismos que afecten positiva o negativa, la expresión del gen hA3G, analizando la región promotora y el exón 4 de esta proteína en ambos grupos de pacientes.
2. Comparar la presencia de estos polimorfismos en personas infectadas con el VIH con progresión normal o que no controlan la replicación, así como personas sanas no infectadas como control.
3. Comparar las frecuencias genómicas y alélicas de los polimorfismos encontrados en nuestra población, con otras reportadas.
4. Relacionar el tiempo de progresión a SIDA con el polimorfismo H186R.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Población de estudio.

En este estudio se incluyeron varias cohortes de pacientes:

- a) Donadores Sanos (DS, n=50): Las muestras, se obtuvieron de un paquete leucocitario del banco de sangre del INER, en donde se le realizaron pruebas de detección a algunos agentes infecciosos, como es el caso de hepatitis B, C y de VIH, asegurándose que resultaran libres de los mismos.
- b) Personas infectadas con VIH (n=50): Se eligieron las muestras de personas que no hubieran estado expuestos previamente a tratamiento antirretroviral. Fueron colectadas con consentimiento informado, de la cohorte de pacientes del CIENI, INER.

La mediana de la carga viral fue de 13000 copias/mL en un rango de 1320-750000 copias/mL. La mediana del conteo de células CD4⁺ fue de 108 células/mL, en un rango de 10-917 células/mL.

- c) Personas VIH+ con baja carga viral (n=12): Estos individuos presentan la infección por el VIH, pero han mantenido bajos sus niveles de carga viral al menos tres años sin tratamiento antirretroviral. Fueron colectadas con consentimiento informado, de la cohorte de pacientes del CIENI, INER.

La mediana de la carga viral fue de 5830 copias/mL en un rango de 397-9850 copias/mL. La mediana del conteo de células CD4⁺ fue de 614 células/mL en un rango de 331-1097 células/mL.

- d) Personas expuestas seronegativas o altamente expuestas seronegativas (HEPS, n=50): Estos individuos no presentan la infección por el VIH, aunque son parejas de personas que si la presentan. Fueron colectadas con consentimiento informado, de la cohorte de pacientes del CIENI, INER. La mediana del conteo de células CD4⁺ fue de 849 células/mL en un rango de 548-1897 células/mL.

6.2. Almacenamiento de muestras

Posterior a la colección de sangre por punción venosa, en un vacutainer con ACD como anticoagulante, las muestras fueron procesadas inmediatamente para la obtención de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) utilizando la separación con gradiente de densidad de ficol, posteriormente se colocaron en viales, a una concentración de 5-10 millones de células; las que no fueron utilizadas, se criopreservaron en nitrógeno líquido a -80°C .

6.3. Extracción y purificación de ADN.

Se realizó con el Kit de extracción *QIAamp® DNA Blood Mini* (QIAGEN, México), las células deben ser lisadas para liberar el ADN, a continuación se precipitó el con etanol al 100% y se colocó en la columna de sílice gel, donde se utilizaron varios buffers para eluirlo y purificarlo.

6.4. Cuantificación de ácidos nucleicos.

Se realizó con el equipo NanoDrop® ND-1000, el cual emplea un software, para dar la concentración y los valores de relación 260/280 (ADN/Proteínas), que debe ser mayor a 1.9 para asegurarse de la pureza del ADN extraído y purificado.

6.5. AMPLIFICACIÓN (PCR)

6.5.1. Amplificación de β -globina

Se realizó para comprobar la integridad del ADN. Se amplifica un fragmento del gene de la β globina que cuenta con 251 pb.

Tabla 1 Mezcla de reacción para la amplificación de β -globina

Componente	1x	Concentración final
Buffer 10x	5.0	1x
Mgcl ₂ 50 mM	1.5	1.5 mM
dNTP's 1.25 mM	8.0	0.2 mM
Taq 5U/ μ L	0.2	0.02 U/ μ L

Primers 20pmol/μL	1	0.4 pmol/μL
Agua [μL]	-----	-----
ADN		[100 ng/μL]
Volumen final [μL]	50	

---- Cantidad variable, de acuerdo al volumen al que se tenga que ajustar la cantidad de ADN para que se obtenga una concentración de 100 ng/μL

Tabla 2. Programa de amplificación de la β-globina

Paso	Temperatura [°C]	Tiempo [s]	Ciclos
Desnaturalización	94	5	1
	94	10	
	60	10	3
	72	30	
Alineación	94	10	
	55	10	32
	72	30	
Extensión final	72	420	1
	4	∞	

Posteriormente a la amplificación, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1,5%.

6.5.2. Amplificación de la región promotora de hA3G

Se amplificó la región promotora del gene de hA3G, que tiene 2219 pb, con los primers 154F y 2373R.

Tabla 3 Mezcla de reacción para la amplificación de la región promotora de hA3G

Componente	1x	Concentración final
Buffer 10x	5.0	1x
MgCl₂ 50 mM	2.0	2.0 mM
dNTP's 1.25 mM	8.0	0.2 mM
Taq 5U/μL	0.2	0.02 U/μL
Primers 20pmol/μL	1	0.4 pmol/μL

Agua [μL]	-----	-----
ADN		[100 ng/ μL]
Volumen final [μL]	50	

---- Cantidad variable, de acuerdo al volumen al que se tenga que ajustar el ADN, para que se obtenga una concentración de 100 ng/ μL

Tabla 4 Programa de amplificación de la región promotora de hA3G

Paso	Temperatura [$^{\circ}\text{C}$]	Tiempo [s]	Ciclos
Desnaturalización	94	120	1
	94	30	
Alineación	65	30	35
	72	150	
Extensión final	72	420	1
Conservación	4	∞	

6.6. SECUENCIACIÓN

Su fundamento se basa en la técnica de Sanger, actualmente se colocan marcadores fluorescentes durante la extensión del ADN, utilizando didesoxinucleótidos trifosfato (ddNTPs) como terminadores. Los fragmentos generados son separados por electroforesis capilar en un secuenciador. Los fluorocromos son excitados para que un sistema óptico capte la fluorescencia y un sistema de cómputo traduzca estas señales a electroferogramas.

Este procedimiento se lleva a cabo mediante diversos pasos:

6.6.1. Purificación de productos de PCR

Para llevar a cabo la reacción de secuenciación de amplificados del promotor de hA3G, deben de estar previamente purificados, es decir libres de restos de primers, dNTPs, enzimas y demás compuestos utilizados en la PCR, para ello se manejó el Kit *QIAquick PCR purification*[®] (QIAGEN, México).

Posteriormente a la purificación, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1,0% y de acuerdo a la intensidad de la banda comparada con la de los

marcadores de peso molecular y el volumen que se tomó de las muestras, se calculó la concentración de ADN.

6.6.2. Reacción de secuenciación.

Se llevó a cabo con los amplicones purificados, el kit *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems, USA) y los primers: 902F, 1581F, 930R, 1617R, 2373R, este arreglo de primers se asegura que la mayor parte del fragmento del promotor este cubierto.

Se realizó la mezcla de reacción para secuenciación como sigue:

Tabla 5 Mezcla de reacción de secuenciación.

Componente	1x	Concentración final
Big Dye 3.1	2.0	-----
Primers 2pmol/μL	1.0	0.4 pmol/μL
Agua [μL]	-----	-----
ADN		[20 ng/μL]
Volumen final [μL]	5.0	

---- Cantidad variable, de acuerdo al volumen al que se tenga que ajustar el ADN.

Tabla 6. Programa de amplificación de la reacción de secuenciación.

Paso	Temperatura [°C]	Tiempo [s]	Ciclos
Desnaturalización	96	60	1
	96	10	
Alineación	50	0.05	35
	60	4	
Extensión final	4	∞	1

6.6.3. Purificación de reacción de secuenciación

Para llevar a cabo la secuenciación, los productos de la reacción de secuenciación deben de estar previamente purificados de los ddNTPs no empleados en la reacción, para ello se colocaron 13µL de una mezcla de Etanol/Acetato (2.5 volúmenes de etanol al 100% y 10% de acetato de sodio 3M pH=5.2) y se centrifugaron a 2000g por 20 minutos, posteriormente se retiró el exceso de la mezcla y se añadieron 35µL de etanol al 70%, se centrifugó a 2000g por 5 minutos, a continuación se retiró el exceso de etanol y se colocaron 20 µL de formamida en los carriles ocupados para evitar la formación de estructuras secundarias y permitir la separación de los fragmentos por tamaño. A continuación se colocó la placa en el secuenciador.

6.6.4 Secuenciación automatizada

Se utilizó el equipo *ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, USA) con el polímero *POP-6* como fase estacionaria. Todo el procedimiento se llevó a cabo de acuerdo a las instrucciones en el manual de operación.

6.6.5. Análisis y alineación de secuencias

Los electroferogramas obtenidos con los primers 902F, 1581F, 930R, 1617R, 2373R, se revisaron individualmente con el objetivo de observar que la secuencia fuera legible. Para el posterior ensamblaje e identificación de polimorfismos, se utilizaron los programas BioEdit y Staden Package.

Posteriormente se realizaron las alineaciones con el programa, Clustal X2, en donde se identificaron los polimorfismos en las poblaciones de estudio, comparando los consensos de las muestras con la secuencia reportada en el sitio electrónico del NCBI.

6.7 DISOCIACIÓN DE ALTA RESOLUCIÓN DE DNA (HIGH-RESOLUTION MELTING, HRM).

La técnica caracteriza muestras de ADN bicatenario según su comportamiento de disociación. Este análisis es similar al de la curva de qPCR, pero proporciona información para una gama más amplia de aplicaciones.

Las muestras pueden ser discriminadas de acuerdo a diversos parámetros: arreglos a la secuencia, longitud, contenido de Guaninas-Citocinas o cambios de una base. Es por ello, que esta metodología fue utilizada para detectar el polimorfismo H186R ubicado en el exón 4.

Antes de realizar análisis de HRM, la secuencia debe amplificarse para alcanzar un alto número de copias, además para que el colorante EvaGreen se enlace al ADN de doble cadena y fluoreszca. De tal manera que el cambio de fluorescencia puede utilizarse para medir el aumento de la concentración de ADN.

Para realizar el análisis de HMR, se aumenta la temperatura y la fluorescencia del colorante EvaGreen se mide continuamente conforme a este incremento.

EvaGreen

EvaGreen es un colorante fluorescente que se enlaza selectivamente a ADN de doble cadena. La absorbancia máxima es de 500 nm (con DNA enlazado) y la emisión máxima es de 530 nm. Esto permite una fácil detección de EvaGreen en los filtros de programación para el análisis de HRM. Tiene una afinidad de enlace similar para las regiones que son ricas en guanina-citocina y en adenina-timina, aparentemente con ninguna preferencia. Por ello EvaGreen es un colorante ideal para realizar el análisis de HRM.

6.7.1. Mezcla de reacción para PCR de HRM

Los componentes incluyen la polimerasa, buffer para PCR, soluciones-Q y dNTPs. La polimerasa *HotStarTaq Plus*, es una forma modificada de QIAGEN de la Taq polimerasa, se proporciona en un estado inactivo y no hay actividad enzimática en temperatura ambiente, por lo tanto evita artefactos, lo que permite alta especificidad.

Los primers utilizados fueron: 186FHRM (8468 Forward) Y 186FHRM (8469 Reverse)

Tabla 7 Programa de amplificación del exón 4 en el equipo de HRM

Componente	1x	Concentración final
2x HRM	12.5	-----
Primers 20 pmol/ μ L	0.875	0.7 pmol/ μ L
Agua [μ L]	-----	-----
ADN		[100 ng/ μ L]
Volumen final [μ L]	25.0	

---- Cantidad variable, de acuerdo al volumen al que se tenga que ajustar el ADN.

Los ensayos para detectar el polimorfismo H186R se corrieron en el equipo Rotor-Gene Q® de Qiagen, como controles se utilizaron: secuencia Homocigota dominante (AA), heterocigota (AG) y homocigota recesiva (GG).

Las secuencias de las cuales se tenían duda, se secuenciaron llevando a cabo el procedimiento anterior, para confirmar la identidad de la base relacionada con el polimorfismo.

6.8. Recopilación de datos de expresión de hA3G, CD4⁺ y carga viral.

Los niveles de hA3G de los pacientes conteo de células CD4⁺, y carga viral se obtuvieron del trabajo de Vázquez *et al.* [67], que se realizó con estas mismas muestras.

6.9. Análisis estadístico.

Los datos de los polimorfismos identificados en el promotor y en el exón 4 en las poblaciones de estudio, se analizaron con ayuda del software StatView® mediante la prueba estadística de Kruskal Wallis, relacionándolos con la carga viral, conteo de células CD4 y expresión del gene hA3G. Tratando de agrupar los polimorfismos por grupos de estudio y observando si se presentaba diferencia significativa.

6.10. Cálculo de frecuencias alélicas y genómicas.

Se realizó de acuerdo a las siguientes fórmulas:

$$\text{Frecuencia genómica} = \frac{\text{Número de personas que presentan ese genotipo}}{\text{Número de personas totales}}$$

Frecuencia alélica para el alelo 1

$$= \frac{2(\text{Frecuencia del alelo homocigoto 1}) + \text{frecuencia del alelo heterocigoto}}{2(\text{Frecuencia del alelo homocigoto 1} + \text{frecuencia del alelo homocigoto 2})}$$

Frecuencia alélica para el alelo 2

$$= \frac{2(\text{Frecuencia del alelo homocigoto 2}) + \text{frecuencia del alelo heterocigoto}}{2(\text{Frecuencia del alelo homocigoto 1} + \text{frecuencia del alelo homocigoto 2})}$$

Las frecuencias obtenidas, se compararon con las reportadas en otras poblaciones.

7. RESULTADOS.

7.1 Población de estudio.

El número de pacientes en las cohortes de estudio, tuvieron la siguiente distribución:

Distribución de Cohortes	
Cohorte	Personas
Donadores sanos (DS)	50
Expuestos seronegativos (HEPS)	54
VIH+ con baja carga viral (LVC)	12
VIH +	48
Total	164

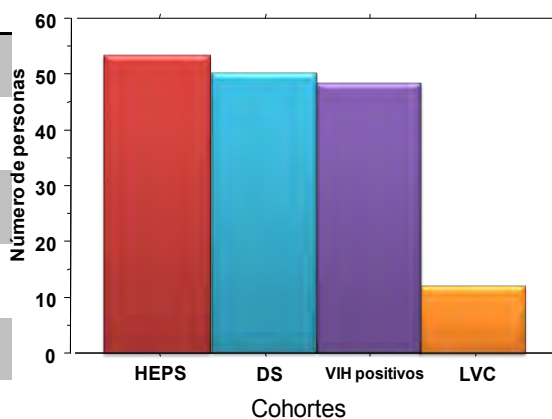


Tabla 10 y Gráfica 1. Número de personas distribuidas en cada cohorte de estudio.

7.2 Identificación de polimorfismos en el promotor de APOBEC3G

Para comprobar la integridad del DNA de las muestras se amplificó el gene de la β -globina. En todas las muestras se amplificó este gene constitutivo, lo cual nos permitió la posterior identificación de los polimorfismos en el promotor y el exón 4

de hA3G. En la figura 10 se ejemplifica la amplificación de β -globina en 6 muestras de donadores sanos

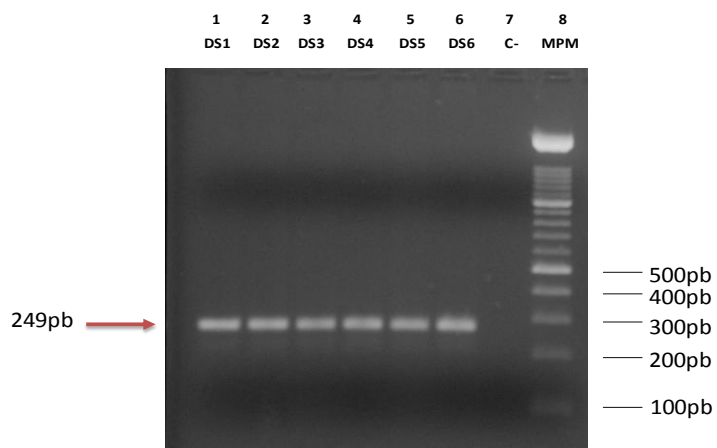


Figura 10. Gel representativo de la amplificación del gene de la β -globina con 249 pb. Se exponen muestras de donadores sanos, las bandas representan la presencia del gene antes mencionado

Posteriormente se amplificó el gene del promotor de hA3G en las muestras a analizar. El producto de amplificación obtenido con los iniciadores 154F y 2373R fue de 2219 pb el cual comprende la mayoría del promotor de la proteína y el inicio de la transcripción. Con los amplicones obtenidos se realizó la secuenciación.

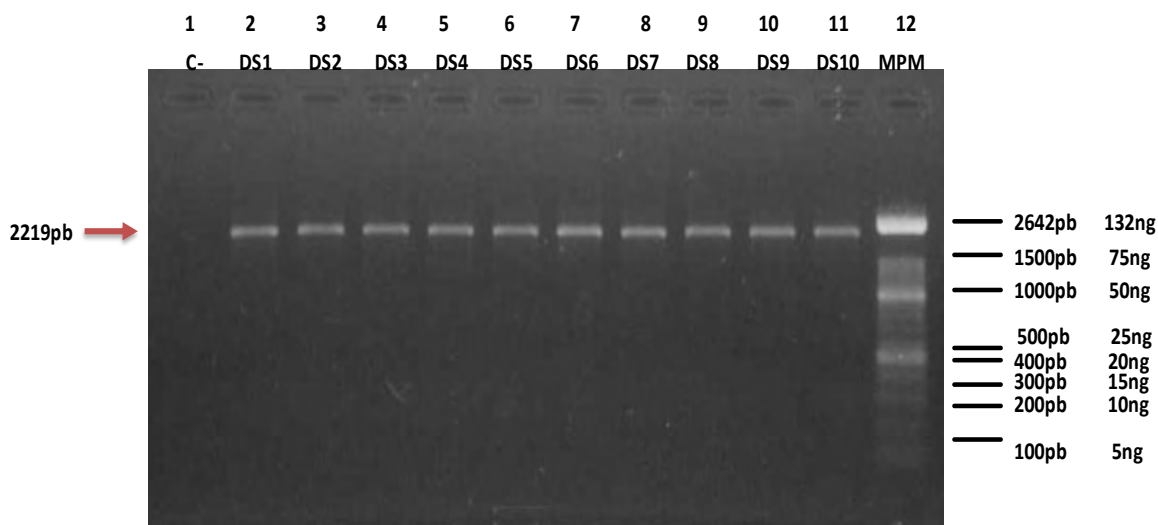


Figura 11 Gel representativo de la amplificación del gene del promotor de hA3G, que cuenta con 2219 pb. Se exponen muestras de donadores sanos, las bandas representan la presencia del gene antes mencionado. Al costado derecho se muestran las concentraciones de las bandas del marcador de peso molecular XVI de Roche®

A continuación, se realizó la reacción de secuenciación y purificación, para su posterior análisis en el secuenciador. Los gráficos de secuencia de ADN o electroferogramas se ensamblaron en los programas BioEdit y Staden Package, en donde se creó una secuencia consenso que cubre el gene promotor de hA3G. Para la identificación de los polimorfismos se empleó la nomenclatura de la IUPAC: G o A=R; C o T=Y; C o A=M; T o A=W; G o T=K; G o C=S; A o G o C o T=N



Figura 12. Detección de polimorfismos en el software Staden Package. Se muestran electroferogramas con la secuencia consenso de una persona expuesta seronegativa, se muestran dos polimorfismos, señalados por el rectángulo, el primero ubicado en la posición 344 del consenso donde se observa una sobre posición de las bases G y C, por lo cual se le denominó “S” y el segundo en la posición 346, se observa que las bases sobrepuestas son A y C, de acuerdo a la nomenclatura se le denominó “M”.

Posteriormente se utilizó el programa Clustal X2 y Bioedit para la alineación e identificación de polimorfismos.



Figura 13. Muestra de alineamiento realizado en Clustal X2 y visualizado en el programa Bioedit. En la posición 868 se muestra un polimorfismo resaltado en color púrpura, denominado con la letra “R”.

A partir del análisis de las secuencias se detectaron 14 polimorfismos en la región promotora de hA3G, sin embargo se analizaron solo los 7 polimorfismos (Figura 14) que tuvieron una frecuencia de al menos 3.0%.

La mayoría de los polimorfismos analizados se encontraron reportados en la base de datos del NCBI.

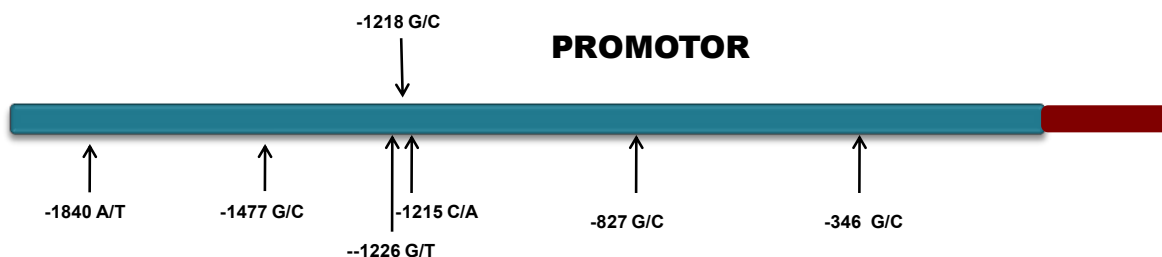
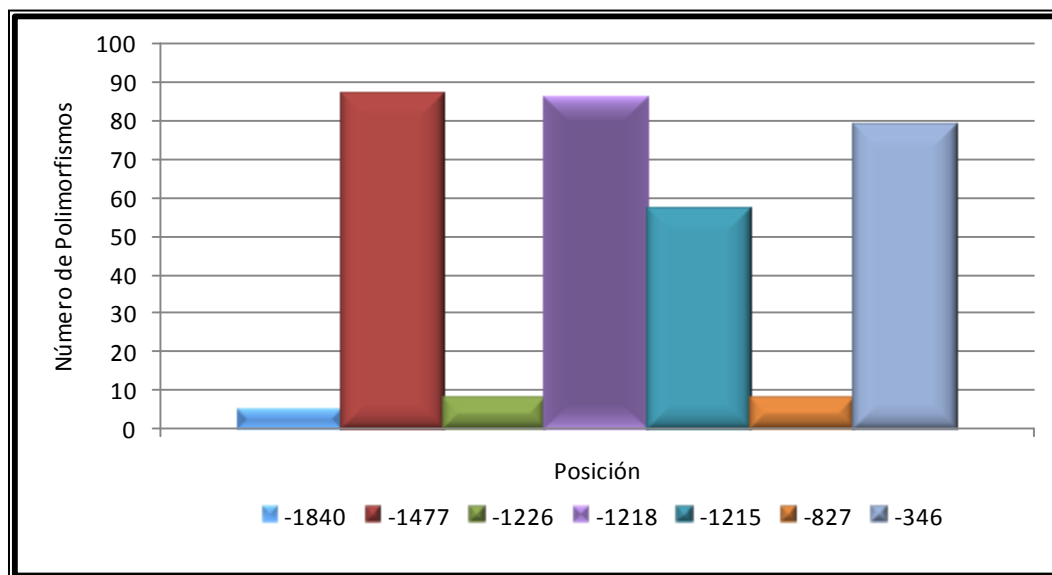


Figura 14. Polimorfismos identificados en la población de estudio, en el promotor. Se muestran los siete polimorfismos estudiados y los nucleótidos implicados.



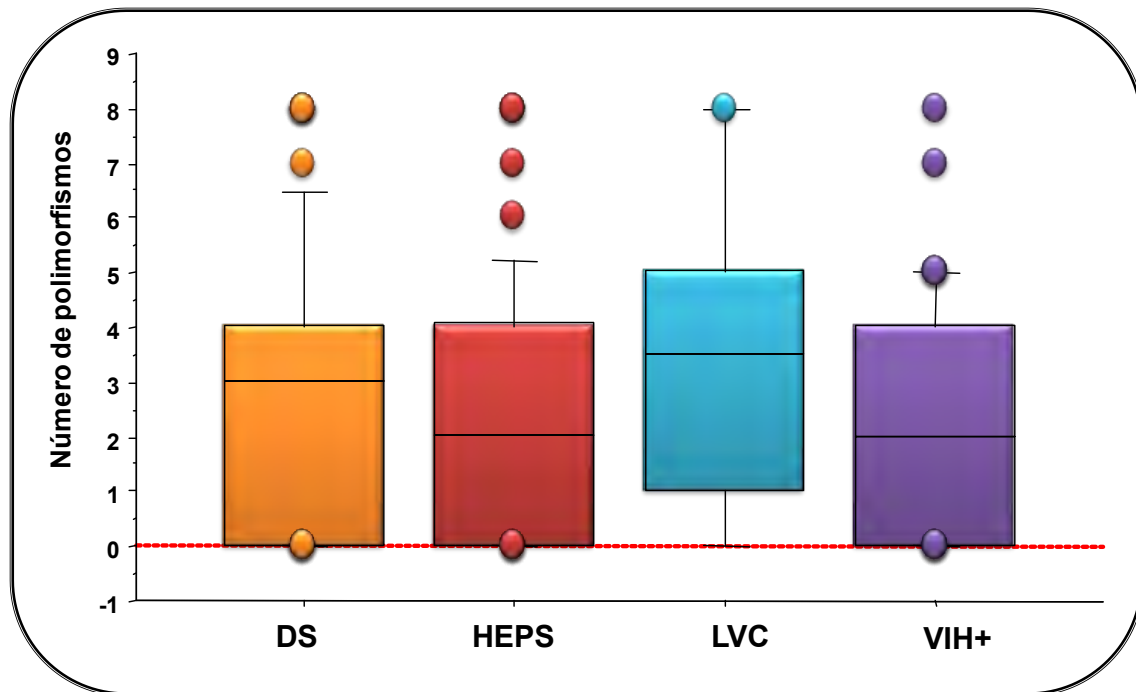
Gráfica 2 Frecuencia de los polimorfismos identificados en el promotor en toda la población de estudio.

7.3 Análisis estadístico de los polimorfismos en el promotor de hA3G presentes en las diferentes cohortes de pacientes.

Para conocer si había relación entre la cantidad de polimorfismos y los grupos de pacientes en estudio, se comparó el número de los polimorfismos en los pacientes

que son VIH+ con baja carga viral y en personas expuestas no infectadas con respecto a personas infectadas con el VIH con progresión normal. Como control se emplearon a personas sanas sin exposición al VIH.

En la siguiente gráfica se muestra el número de polimorfismos encontrados en cada cohorte estudiada.



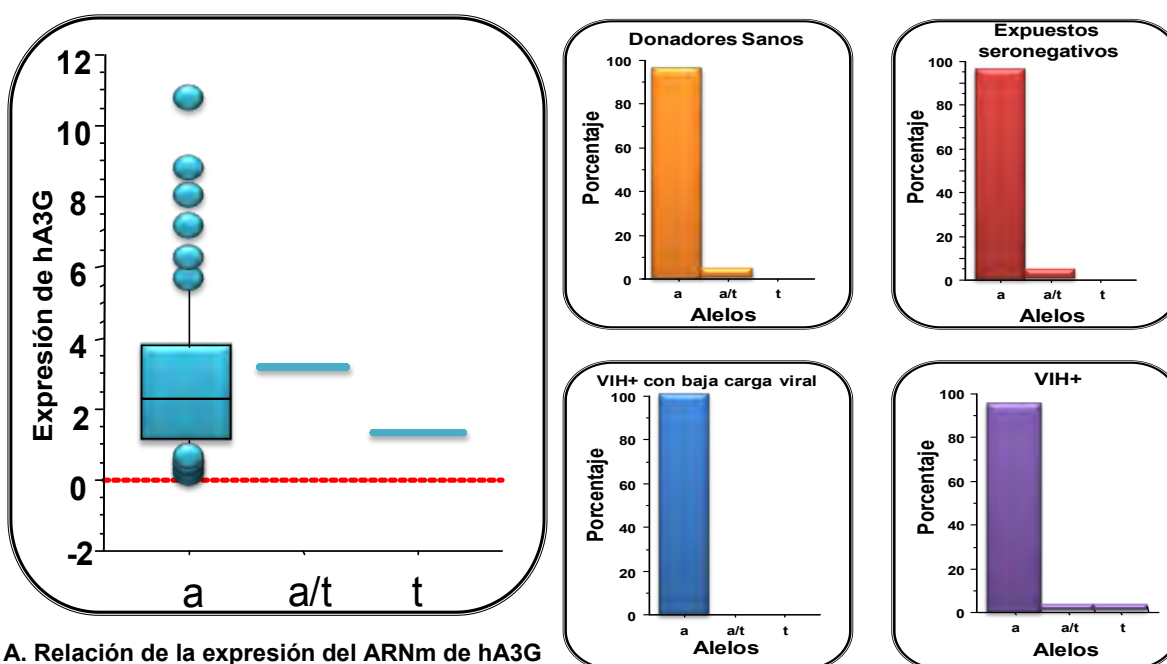
Gráfica 3. Número de polimorfismos del promotor en cada cohorte.
DS: Donadores Sanos; HEPS: Expuestos seronegativos expuestos o altamente expuestos; LVC: VIH+ con baja carga viral; VIH+: personas infectadas con VIH.

Podemos observar que no hay diferencias significativas ($p=0.11$) entre las diferentes cohortes y el número de polimorfismos. Lo cual significa que no hay una relación entre el número de polimorfismos y las diferentes cohortes.

Para conocer si la expresión de hA3G era determinada por la presencia o ausencia de alguno de los polimorfismos encontrados en el promotor, se relacionó la expresión del ARN mensajero (ARNm) con la presencia de cada uno de los polimorfismos estudiados.

En las siguientes gráficas (4-10) se muestra la expresión de hA3G con respecto a cada polimorfismo, así como el porcentaje de los alelos formados en cada grupo de pacientes.

Gráfica 4. Análisis del polimorfismo A-1840T.



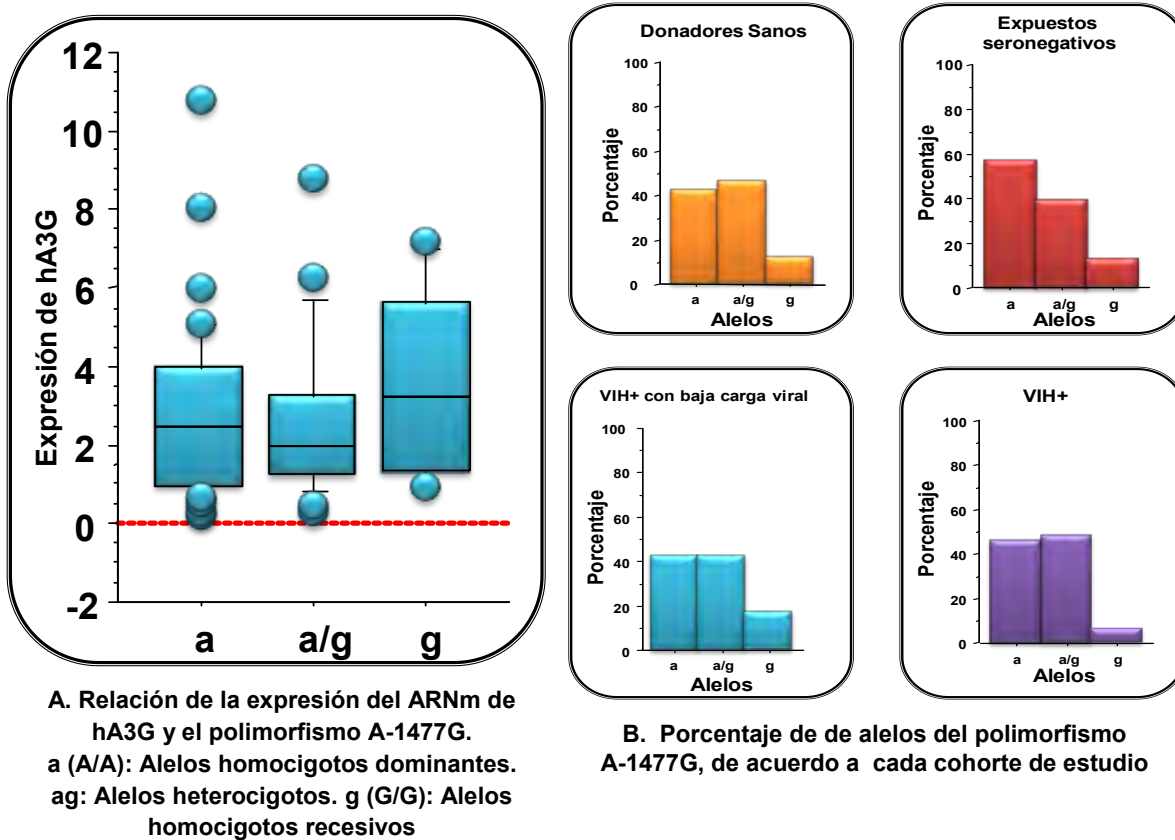
A. Relación de la expresión del ARNm de hA3G y el polimorfismo A-1840T.

a (A/A): Alelos homocigotos dominantes. at: Alelos heterocigotos. t(T/T): Alelos homocigotos recesivos

B. Porcentaje de de alelos del polimorfismo A-1840T, de acuerdo a cada cohorte de estudio

Al relacionar la expresión del ARNm de hA3G con la presencia del polimorfismo A-1840T, no se encontró diferencia significativa entre las personas con diferentes alelos AA, AT o TT y la expresión de hA3G ($p=0.66$). Así mismo se observó que no hay diferencias en los grupos de estudio y la frecuencia de alelos con este polimorfismo.

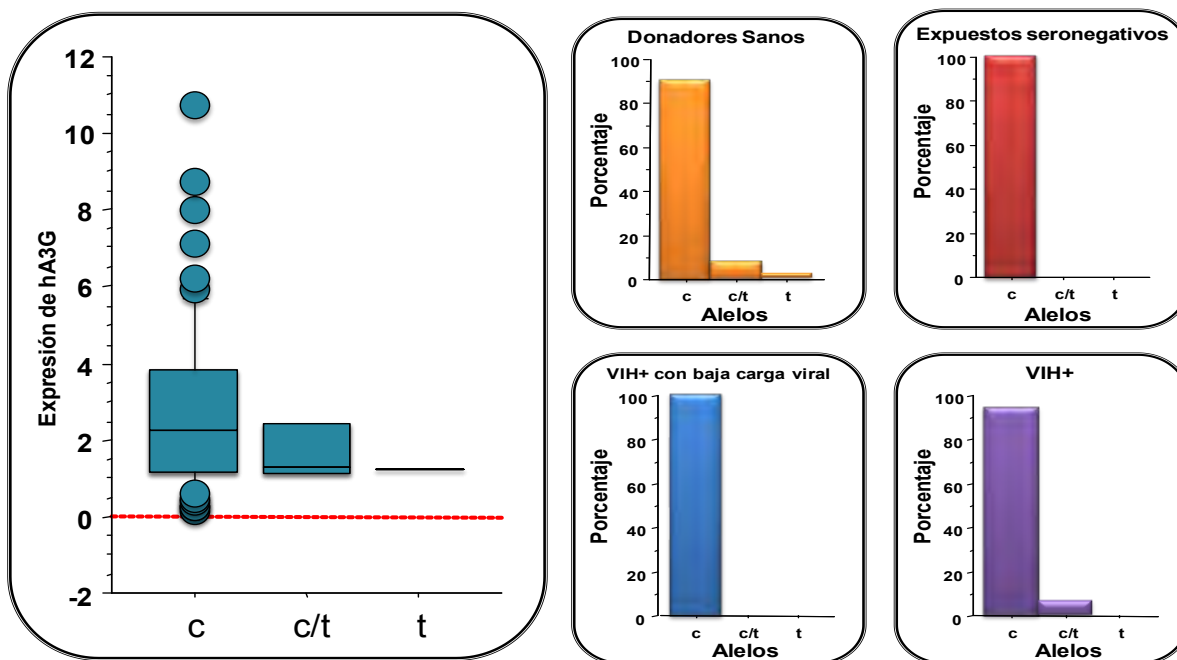
Gráfica 5. Análisis del polimorfismo A-1477G.



Al relacionar la expresión del ARNm de hA3G con la presencia del polimorfismo A-1447G, no se encontró diferencia significativa entre las personas con diferentes alelos AA, AG o GG y la expresión de hA3G ($p=0.56$).

Se observó que hay diferencias en la frecuencia de alelos en el grupo de los expuestos seronegativos con respecto a los demás grupos.

Gráfica 6. Análisis del polimorfismo C-1226T.

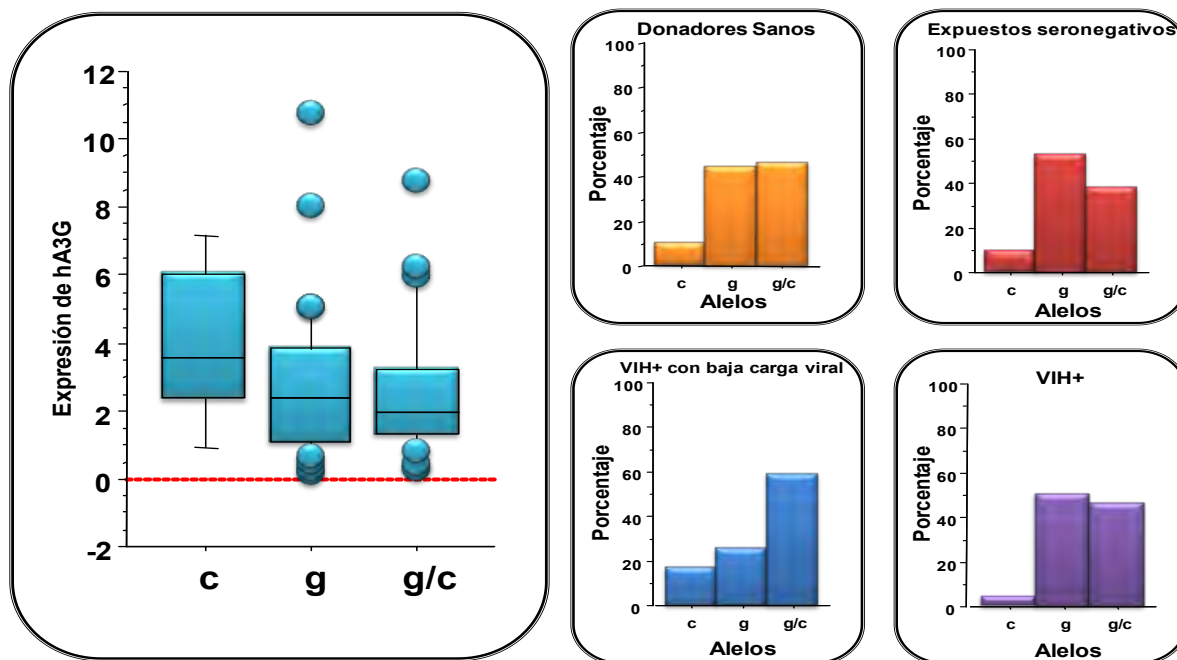


A. Relación de la expresión del ARNm de hA3G y el polimorfismo C-1226T.
 c (C/C): Alelos homocigotos dominantes. ct: Alelos heterocigotos. t (T/T): Alelos homocigotos recesivos

B. Porcentaje de de alelos del polimorfismo C-1226T, de acuerdo a cada cohorte de estudio

Al relacionar la expresión del ARNm de hA3G con la presencia del polimorfismo C-1226T, no se encontró diferencia significativa entre las personas con diferentes alelos CC, CT o TT y la expresión de hA3G ($p=0.51$). Así mismo no se observaron diferencias entre los grupos de estudio y la frecuencia de alelos con este polimorfismo.

Gráfica 7. Análisis del polimorfismo C-1218G.



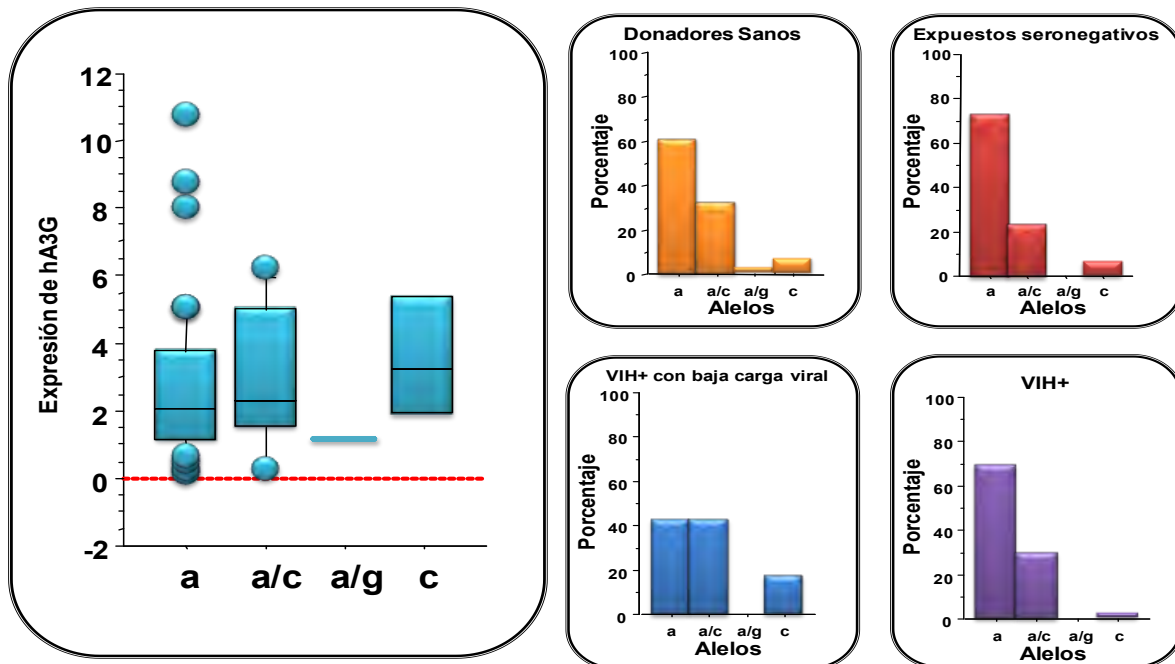
A. Relación de la expresión del ARNm de hA3G y el polimorfismo C-1218G.
 c (C/C): Alelos homocigotos dominantes.
 gc: Alelos heterocigotos. g (G/G): Alelos homocigotos recesivos

B. Porcentaje de de alelos del polimorfismo C-1218G, de acuerdo a cada cohorte de estudio

Al relacionar la expresión del ARNm de hA3G con la presencia del polimorfismo C-1218G, no se encontró diferencia significativa entre las personas con diferentes alelos CC, CG o GG y la expresión de hA3G ($p=0.36$).

Se observaron diferencias en la frecuencia de alelos en el grupo de las personas VIH+ con baja carga viral, con respecto a los demás grupos.

Gráfica 8. Análisis del polimorfismo A-1215C.



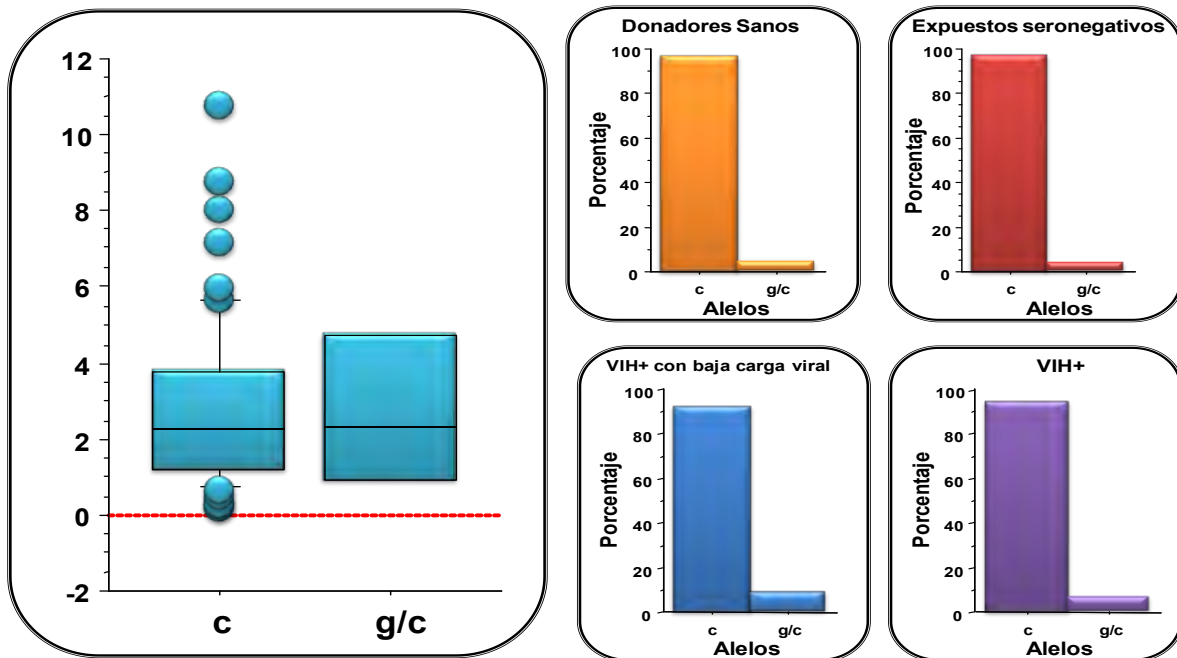
A. Relación de la expresión del ARNm de hA3G y el polimorfismo A-1215C.
a (A/A): Alelos homocigotos dominantes.
ac: Alelos heterocigotos. ag: Alelos heterocigotos. c (C/C): Alelos homocigotos recesivos

B. Porcentaje de de alelos del polimorfismo A-1215C, de acuerdo a cada cohorte de estudio

Al relacionar la expresión del ARNm de hA3G con la presencia del polimorfismo A-1215C, no se encontró diferencia significativa entre las personas con diferentes alelos AA, AC, AG o CC y la expresión de hA3G ($p=0.51$).

Se observaron diferencias en la frecuencia de alelos en el grupo de las personas VIH+ con baja carga viral, con respecto a los demás grupos.

Gráfica 9. Análisis del polimorfismo C-827G

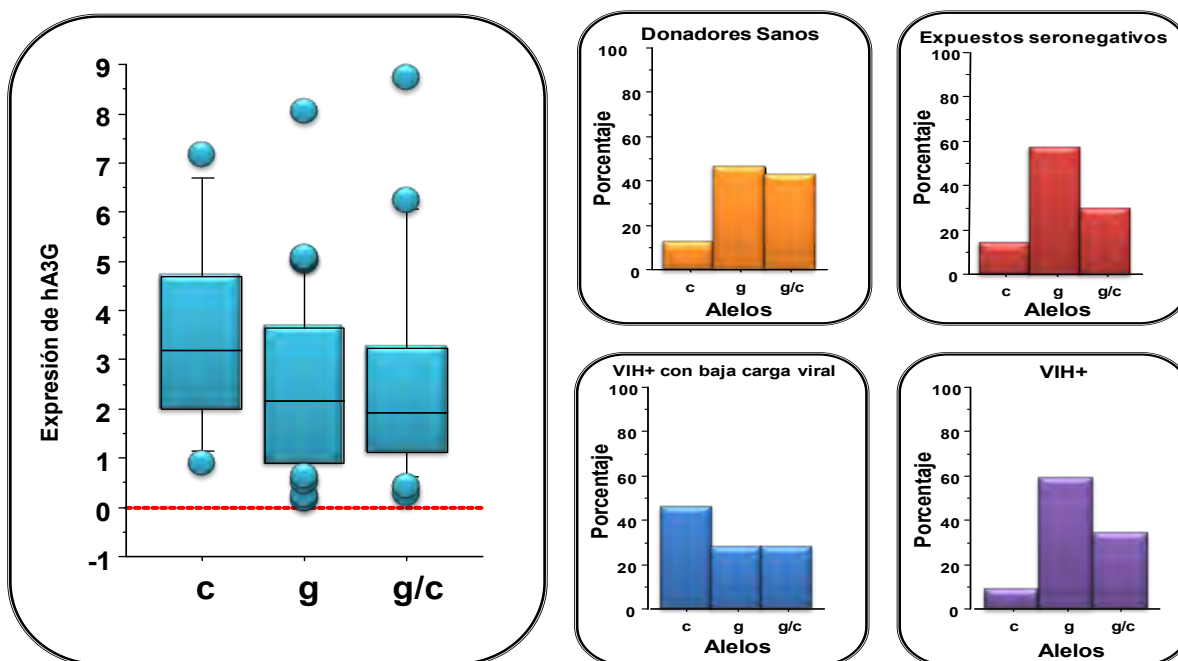


A. Relación de la expresión del ARNm de hA3G y el polimorfismo C-827G.
 c (C/C): Alelos homocigotos dominantes.
 gc: Alelos heterocigotos

B. Porcentaje de de alelos del polimorfismo C-827G, de acuerdo a cada cohorte de estudio

Al relacionar la expresión del ARNm de hA3G con la presencia del polimorfismo C-827G, no se encontró diferencia significativa entre las personas con diferentes alelos CC o CG y la expresión de hA3G ($p=0.95$). Así mismo se observó que no hay diferencias en los grupos de estudio y la frecuencia de alelos con este polimorfismo.

Gráfica 10. Análisis del polimorfismo C-346G



A. Relación de la expresión del ARNm de hA3G y el polimorfismo C-346G.
 c (C/C): Alelos homocigotos dominantes.
 g/c: Alelos heterocigotos. g (G/G): Alelos homocigotos recesivos

B. Porcentaje de alelos del polimorfismo C-346G, de acuerdo a cada cohorte de estudio

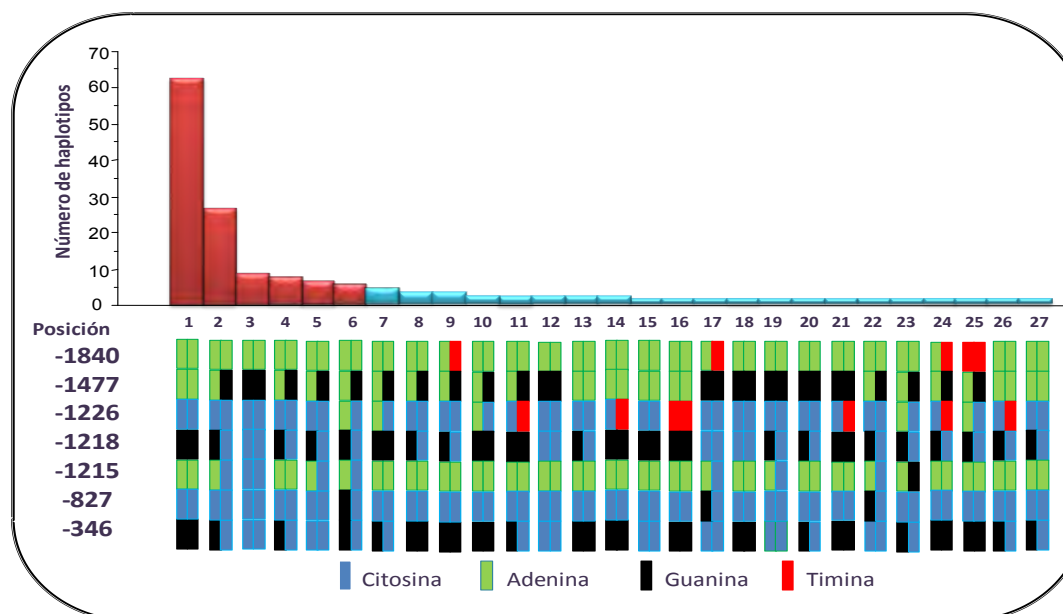
Al relacionar la expresión del ARNm de hA3G con la presencia del polimorfismo C-346G, no se encontró diferencia significativa entre las personas con diferentes alelos CC, CG o GG y la expresión de hA3G ($p=0.32$).

Se observaron diferencias en la frecuencia de alelos en el grupo de las personas VIH+ con baja carga viral, con respecto a los demás grupos.

7.4 Análisis estadístico de los haplotipos elaborados a partir de los polimorfismos en el promotor de hA3G presentes en la población estudiada

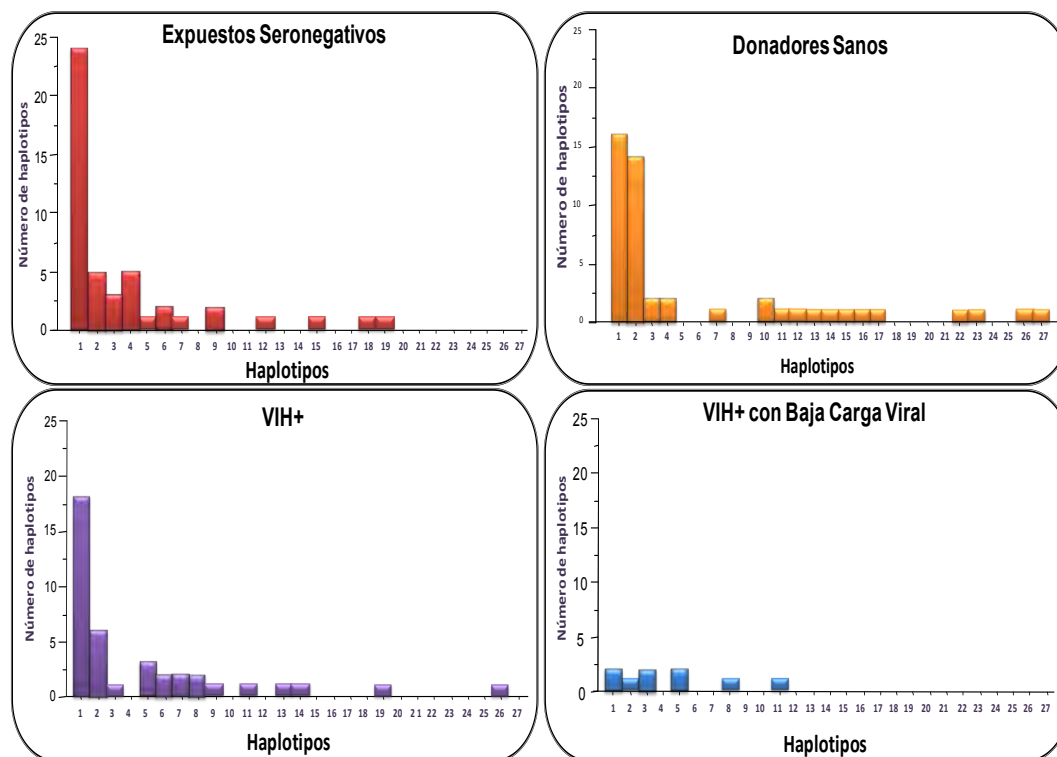
Para conocer si la asociación de diferentes polimorfismos afecta la expresión de hA3G, se formaron haplotipos y se analizó la presencia de estos en los diferentes grupos de pacientes.

En la gráfica 11 se muestran los haplotipos encontrados, en primer lugar se encuentra el haplotipo que tiene los alelos homocigotos dominantes, que fue el más frecuente en la población estudiada.



Gráfica 11. Frecuencia de haplotipos que se realizaron con los polimorfismos encontrados en el promotor. En color rojo se muestran los seis más frecuentes. En color azul los que no son tan representativos. En la parte inferior de muestran las bases relacionadas con los sitios de los polimorfismos.

Para conocer si alguno de los haplotipos estaba relacionado con una cohorte en específico, se revisó la distribución de los haplotipos en los diversos grupos de estudio (gráfica 12)



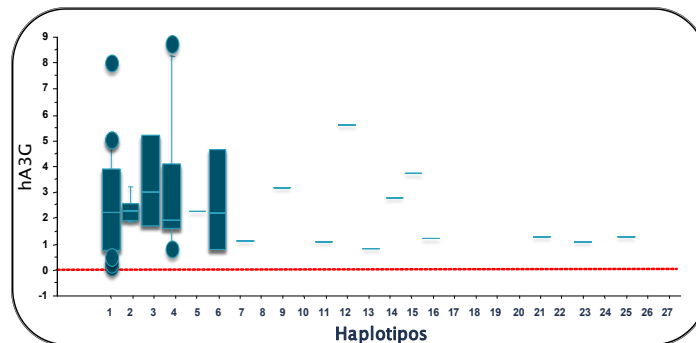
Gráfica 12. Frecuencia de haplotipos en las diferentes cohortes. Los haplotipos esta numerados, según la gráfica 11.

Al relacionar las variables, se encontró que la frecuencia del haplotipo homocigoto dominante es predominante entre las cohortes, con excepción de las personas que son VIH+ con baja carga viral, en donde se observa una distribución homogénea entre los haplotipos que hay en la cohorte.

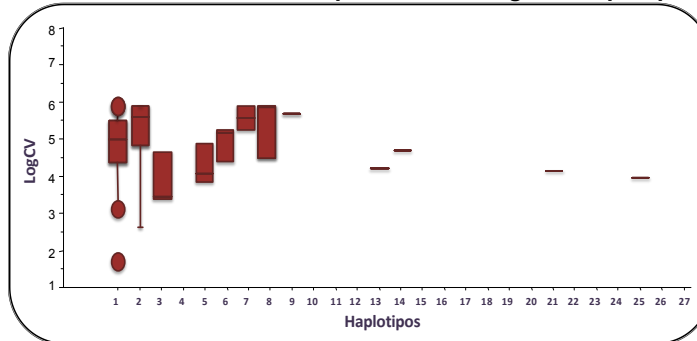
Con respecto a las demás cohortes, se observa que siguen el mismo patrón de comportamiento de frecuencias que tiene la gráfica 11, en donde los primeros haplotipos son los que tienen mayor frecuencia y va disminuyendo conforme el número de haplotipo va aumentando.

Para conocer si existe correlación entre los haplotipos formados con la expresión de ARNm de hA3G, carga viral y conteo de células T CD4⁺, se analizaron los haplotipos con cada uno de estos parámetros (gráficas 13, 14 y 15).

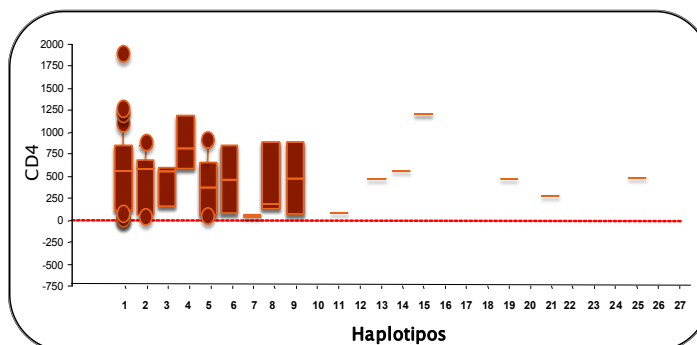
Los haplotipos mostrados en las gráficas se encuentran numerados de acuerdo a la gráfica 11.



Gráfica 13. Relación de la expresión de hA3G con haplotipos.



Gráfica 14. Relación de la carga viral con haplotipos



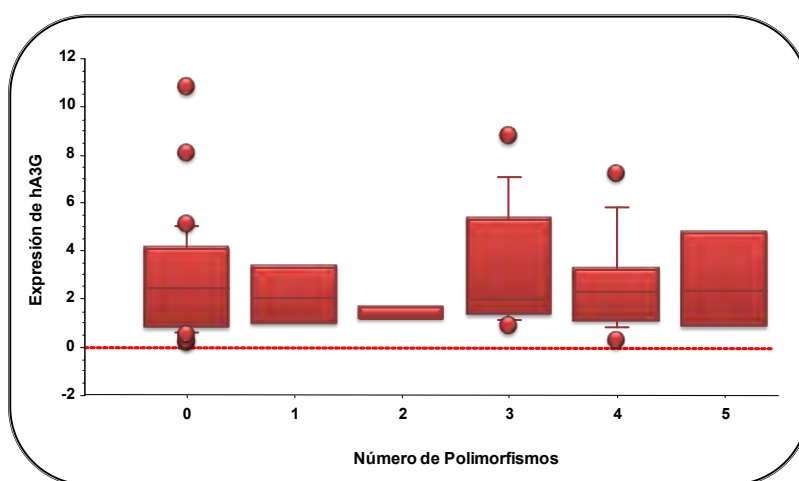
Gráfica 15. Relación de conteo de células T CD4⁺ con haplotipos

Al realizar la correlación de los haplotipos con la expresión de ARNm de la proteína hA3G ($p=0.89$), la carga viral ($p=0.26$) y con el conteo de células T CD4⁺ ($p=0.69$), no

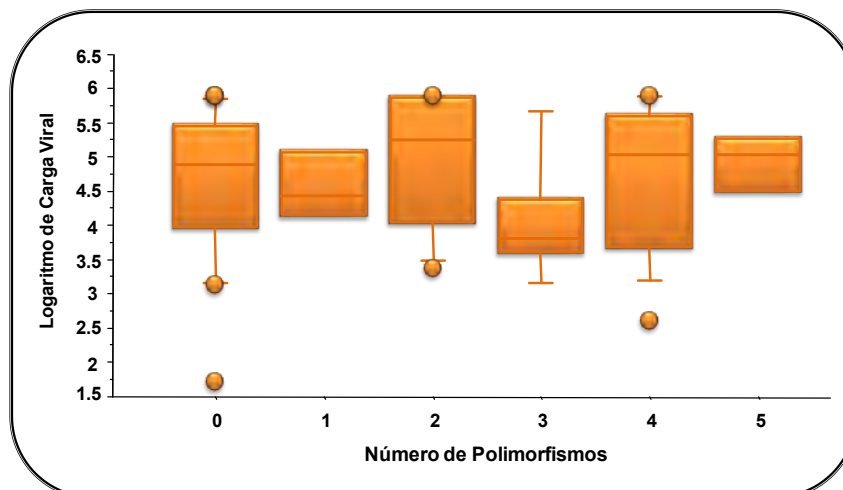
se encontró alguna diferencia significativa, lo cual nos indica que los haplotipos no se asocian con la protección o progresión a la infección por VIH.

Para conocer si el número de polimorfismos presentes en un haplotipo estaban asociados con la expresión de hA3G, se analizaron los haplotipos con la cantidad de polimorfismos y se relacionaron con la expresión de ARNm de hA3G. En las siguientes gráficas (16 y 17), se tomaron en cuenta los polimorfismos en los seis haplotipos con mayor frecuencia y se compararon con la secuencia consenso (el haplotipo homocigoto dominante), considerando los siete polimorfismos.

Para la interpretación de estas gráficas, se puede analizar el siguiente ejemplo: en el caso del haplotipo homocigoto dominante (número 1 en la gráfica 11) los pares de alelos implicados son: A-A; A-A; C-C; G-G; A-A; C-C; G-G. De tal manera que si hay cambio en alguna de las bases de los pares de alelos, este cuenta como polimorfismo. En el haplotipo 9 de la gráfica 11: A-T; A-G; C-C; G-C; A-A; C-C; G-G se tienen 3 polimorfismos, este resultado coloca a este haplotipo en la barra denominada con el número tres del eje que representa el número de polimorfismos. Posteriormente, estos se relacionaron con expresión de hA3G y carga viral, para observar si se presentaba alguna correlación.



Gráfica 16. Relación de Numero de polimorfismos de haplotipos más frecuentes con la expresión de hA3G.

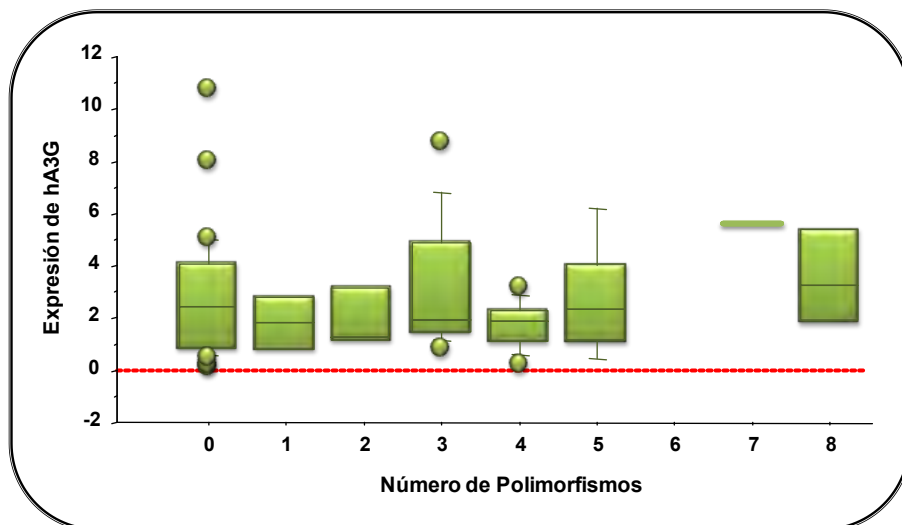


Gráfica 17. Relación de Numero de polimorfismos de haplotipos más frecuentes con la carga viral.

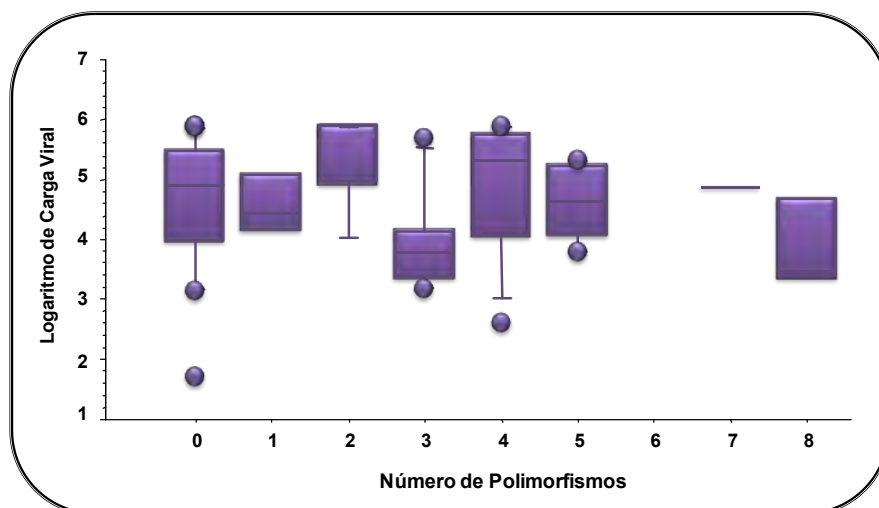
Al relacionar los haplotipos más frecuentes con la expresión de ARNm de la proteína hA3G ($p=0.81$) y con la carga viral ($p=0.67$), no se encontró alguna diferencia significativa, lo cual nos indica que estos haplotipos no se asocian con la protección o progresión a la infección por VIH.

Al observar que los haplotipos de mayor frecuencia contaban con alelos que se repetían en las mismas posiciones, se decidió omitirlos y tomar en cuenta los primeros cuatro polimorfismos (-1840, -1477, -1226, -1218), para determinar si estos se asociaban con la expresión de ARNm de hA3G y/o con la carga viral. Para ello, se compararon con la secuencia consenso (primeros cuatro polimorfismos del haplotipo homocigoto dominante); en este caso, se consideraron los alelos de forma individual, esto quiere decir que se tomaron en cuenta ocho sitios para el polimorfismo.

Para la interpretación de estas gráficas, se puede analizar el siguiente ejemplo: en el caso del haplotipo homocigoto dominante, los alelos son: A-A; A-A; C-C; G-G. De tal manera que si hay cambio en alguna de las bases de los alelos, este cuenta como polimorfismo. En el haplotipo 9 de la gráfica 11: A-T; A-G; C-C; G-C se contaría con 3 polimorfismos, este resultado coloca a este haplotipo en la barra denominada con el número tres del eje que representa el número de polimorfismo, (gráficas 18 y 19).



Gráfica 18. Relación de Número de polimorfismos de los haplotipos más frecuentes con los cuatro polimorfismos más variables con la expresión de hA3G.



Gráfica 19. Relación de Número de polimorfismos de los haplotipos más frecuentes con los cuatro polimorfismos más variables con la carga viral.

Al relacionar los cuatro polimorfismos más variables de los haplotipos más frecuentes, con la expresión de ARNm de la proteína hA3G ($p=0.55$) y con la carga viral ($p=0.43$), no se encontró alguna diferencia significativa, lo cual nos indica que no se asocian con las la protección a la infección por VIH o progresión a SIDA.

7.5 Identificación de polimorfismos en el exón 4 de hA3G.

Como se mencionó con anterioridad, la detección de este polimorfismo se realizó con el análisis de HRM, introduciendo un control homocigoto dominante A/A, un heterocigoto A/G y un homocigoto recesivo G/G (ver figura 15).

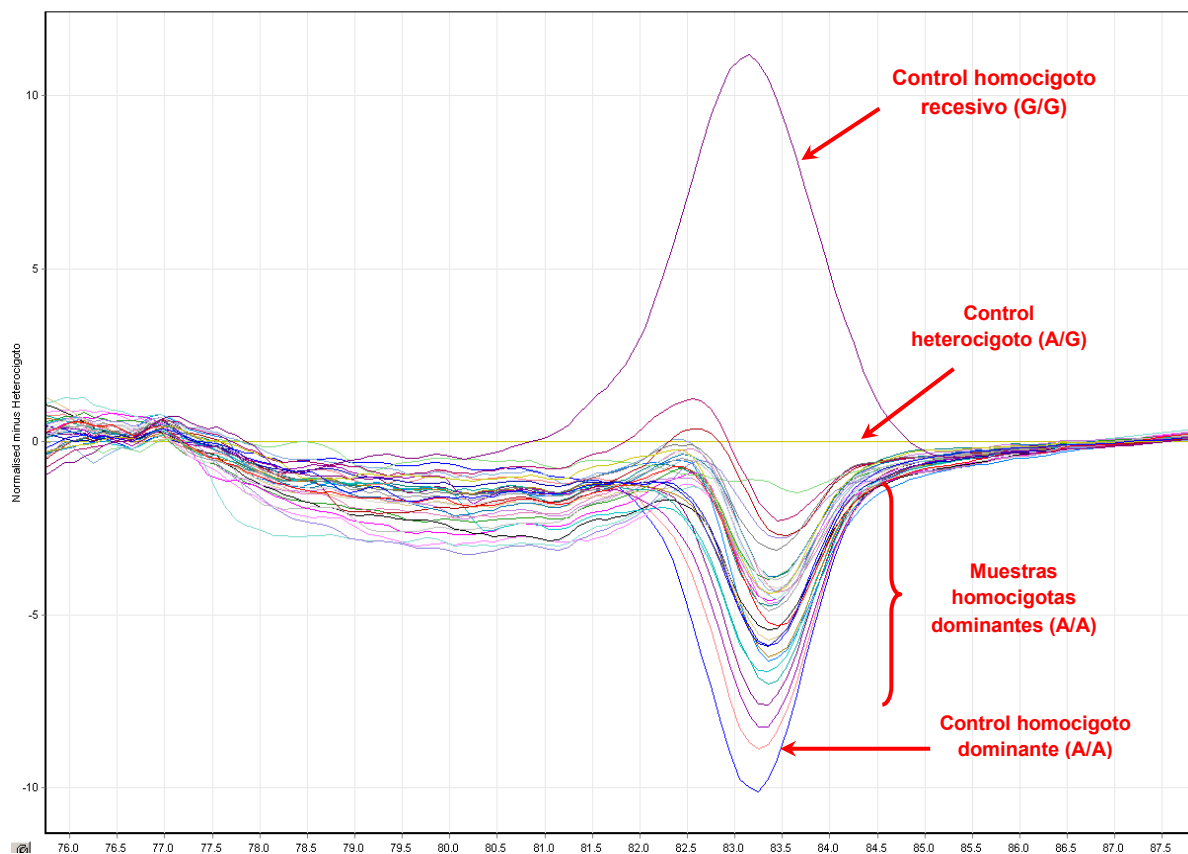


Figura 15. Análisis de HRM para la identificación del polimorfismo H186R. Se introdujeron tres controles, la gráfica se muestra normalizada por el control heterocigoto (AG) localizado en el centro, en la parte superior el homocigoto recesivo (GG) y en la parte inferior el homocigoto dominante (A/A), se observa que las muestras en esta corrida tienen el mismo patrón de comportamiento que el control anteriormente mencionado.

En la figura anterior se ejemplifica una corrida con el equipo de HRM, en donde la detección del polimorfismo se basó en los tres controles introducidos, en la gráfica se muestra el control heterocigoto (AG) localizado en el centro, en la parte superior el homocigoto recesivo (GG) y en la parte inferior el homocigoto dominante (A/A), se observa que las muestras de esta corrida tienen el mismo patrón de comportamiento que el control anteriormente mencionado, por lo cual se puede concluir que estas muestras tienen en su secuencia los alelos homocigotos dominantes (A/A).

En algunos casos, se confirmó la identidad de la base que estaba involucrada en el polimorfismo H186R del exón 4, por medio de secuenciación de un fragmento del gene en el exón 4.

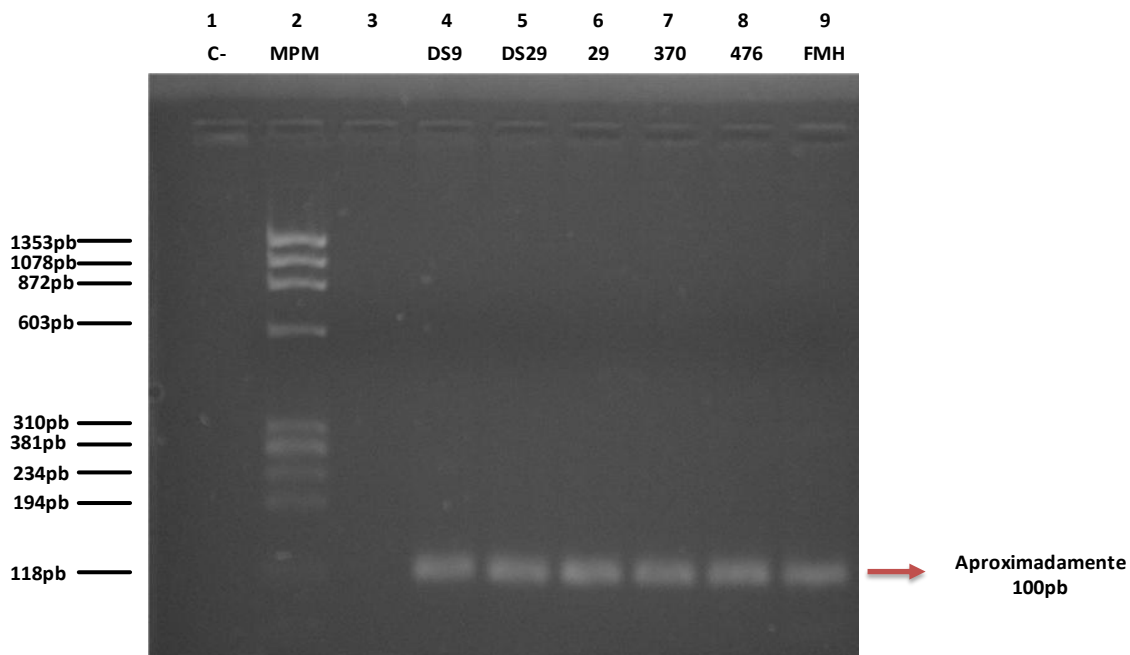


Figura 16. Amplificación de una región del exón 4 que contiene el polimorfismo H186R, El producto de amplificación obtenido con los iniciadores 8468F y 8469R fue de aproximadamente 100 pb. Se exponen algunas muestras, en las cuales no quedó clara la identificación de la base relacionada con el polimorfismo, para llevar a cabo la secuenciación.

Posteriormente de que se confirmó la identidad de la base, se observó la distribución de alelos en el polimorfismo del exón 4 en la población de estudio, esta se muestra en la siguiente tabla y gráfica.

Alelos	Personas
Homocigoto dominante (A/A)	155
Heterocigoto (A/G)	8
Homocigoto recesivo (G/G)	1
Total	164

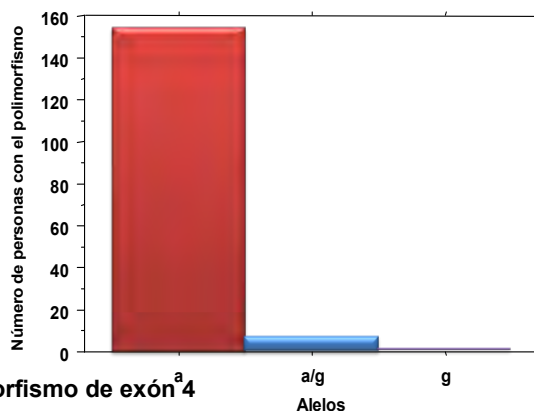


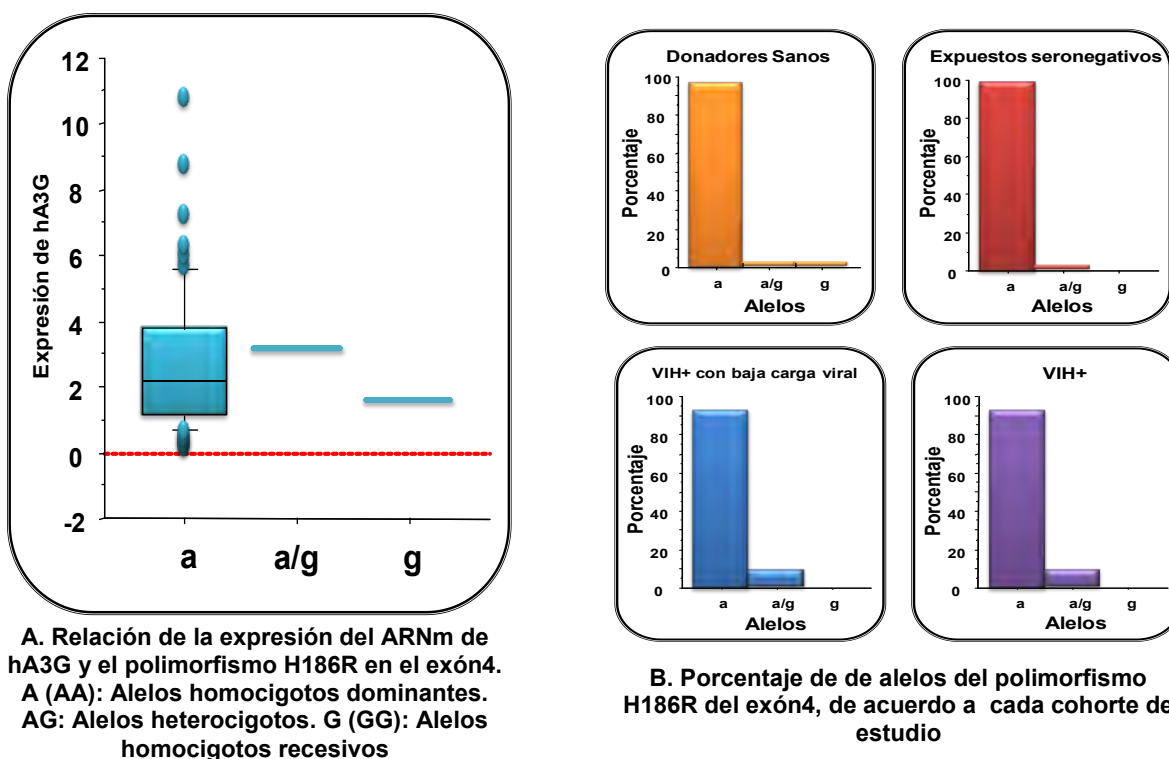
Tabla 11 y Gráfica 20. Distribución de alelos en polimorfismo de exón 4

7.6 Análisis estadístico del polimorfismo H186R en el exón 4 de hA3G presentes en las diferentes cohortes de pacientes.

Para saber si la expresión de hA3G es afectada por la presencia o ausencia del polimorfismo H186R en el exón 4, se relacionó la expresión del ARN mensajero (ARNm) con la presencia del polimorfismo.

En la gráfica 21 se muestra la expresión de hA3G con respecto a cada polimorfismo, así como el porcentaje de los alelos formados en cada grupo de pacientes.

Gráfica 21. Análisis del polimorfismo H186R en el exón 4.



Al relacionar la expresión del ARNm de hA3G con la presencia del polimorfismo H186R en el exón 4, no se encontró diferencia significativa entre las personas con diferentes alelos AA, AG o GG y la expresión de hA3G ($p=0.70$). Así mismo podemos observar que no hay diferencias en los grupos de estudio y la frecuencia de alelos con este polimorfismo.

7.7. Cálculo de frecuencia alélica y genómica de los polimorfismos

Con los datos de frecuencia poblacional que se obtuvieron acerca de los polimorfismos, se realizó el cálculo de proporciones de los diferentes alelos en cada locus, para poder compararlos con las frecuencias genómica y alélica de otras poblaciones, que se encuentran reportadas en la base de datos del NCBI. En las tablas 12 y 13 se pueden observar las frecuencias alélicas y genómicas de nuestra población comparadas con poblaciones europeas y africanas.

7.7.1. En promotor de hA3G

Tabla 12. Frecuencia alélica y genómica de polimorfismos en el promotor

Posición del polimorfismo	Grupo	N	Frecuencia genómica			Frecuencia Alélica			
			C/C	C/G	G/G	C	G		
-346	Europeo	36	0.091	0.455	0.455	0.318	0.682		
	Africano	30	0.250	0.375	0.375	0.438	0.562		
	Mexicano	164	0.139	0.351	0.51	0.363	0.637		
			C/C	C/G	G/G	C	G		
-827	Europeo	44	0.800	0.200	0	0.318	0.682		
	Africano	44	0.929	0.071	0	0.438	0.562		
	Mexicano	164	0.952	0.048	0	0.954	0.046		
			A/A	A/C	A/G	C/C	A	G	C
-1215	Mexicano	164	0.649	0.29	0.006	0.0548	0.729	0.005	0.266
			G/G	C/G	C/C	G	C		
-1218	Mexicano	164	0.476	0.439	0.085	0.636	0.364		
			C/C	C/T	T/T	C	T		
-1226	Mexicano	164	0.951	0.043	0.006	0.953	0.047		

			A/A	A/G	G/G	A	G
-1477	Europeo	36	0.278	0.500	0.222	0.528	0.472
	Africano	30	0	0.067	0.933	0.033	0.967
	Mexicano	164	0.465	0.432	0.103	0.629	0.371
			A/A	A/T	T/T	A	T
-1840	Europeo	44	0.955	0.045	0	0.977	0.023
	Africano	44	0.727	0.276	0	0.864	0.136
	Mexicano	164	0.96	0.033	0.007	0.961	0.039

7.7.2. En el exón 4 de hA3G

Tabla 13. Frecuencia alélica y genómica del polimorfismo en el exón 4

Grupo	N	Frecuencia genómica			Frecuencia Alélica	
		A/A	A/G	G/G	A	G
Europeo	120	0.933	0.050	0.017	0.958	0.042
Asiático	88	0.932	0.068	0	0.966	0.034
Africano	120	0.283	0.500	0.217	0.533	0.467
Mexicano	164	0.903	0.091	0.006	0.911	0.089

Se pueden observar diferencias en las frecuencias alélicas y genómicas en los polimorfismos A-1477G del promotor y el H186R del exón 4, los contrastes se observan con respecto a la población africana.

Cabe señalar que de acuerdo con la base de datos de la NCBI, se encontró un nuevo polimorfismo (C-1226T) en la población mexicana analizada.

8- DISCUSIÓN.

8.1. Población de estudio

Está bien caracterizado, que la proteína intracelular hA3G es un factor protector contra el VIH *in vitro*, pero aún falta precisar cuál es su comportamiento *in vivo*. Es por ello que en este trabajo se describe la caracterización genética de la proteína, analizando los diferentes polimorfismos en varias cohortes de pacientes: *donadores sanos*, en los cuales se observó la distribución de polimorfismos y se compararon con los de las demás cohortes; *personas VIH positivas* sin tratamiento antirretroviral, con quienes se comparó si el efecto de los polimorfismos encontrados podía relacionarse con la infección de manera negativa o positiva; las *personas VIH+ con baja carga viral (LVC)*, se incluyeron en este estudio debido a que han mantenido niveles bajos de virus en plasma durante prolongados periodos de tiempo sin tratamiento antirretroviral, razón por la cual se analizó si los polimorfismos en la proteína hA3G estaba asociados con baja carga viral y una progresión lenta hacia el SIDA; y por último a las *personas altamente expuestas seronegativas (HEPS)*, que como se ha mencionado, han estado expuestas al virus y no se han infectado, con esta cohorte se analizó si los polimorfismos están asociados con una mayor expresión de la proteína y por lo tanto como un factor protector ante el VIH.

8.2. Polimorfismos en el promotor de hA3G

Los polimorfismos se examinaron en diferentes locus de la proteína hA3G. En la región promotora, se analizaron siete polimorfismos que obtuvieron una frecuencia mínima del 3%; cabe señalar que se encontraron en total 14 polimorfismos, pero la selección de los que se analizaron se realizó en base a la frecuencia y a que se encontraran reportados en la base de datos del NCBI. En el caso del polimorfismo C-1226T, se analizó debido a la frecuencia que presentaba en la población de estudio (5%), aunque no se encontrara reportado.

Se analizó la región promotora, debido a que es un sitio de gran importancia para la transcripción de la proteína, en la que podrían implicarse algunos polimorfismos

en sitios de activación transcripcional, que pueden relacionarse con la alta o baja expresión de hA3G [69] en las cohortes de pacientes.

Se deseaba observar el efecto de los polimorfismos en los grupos de pacientes debido a que Vázquez y colaboradores mostraron que los niveles de expresión de hA3G fueron mayores en personas VIH+ con baja carga viral y en expuestos seronegativos, en comparación con individuos sanos e infectados por VIH, además se encontró una significativa correlación inversa entre niveles de ARNm de hA3G -carga viral y una correlación positiva con el conteo de células T CD4⁺ [67], en base a ello se realizó el análisis estadístico para observar si este efecto estaba asociado a los polimorfismos encontrados en cada una de las cohortes estudiadas, sin embargo no se encontró diferencia significativa entre las cuatro cohortes manejadas y el número de polimorfismos (gráfica 3).

Posteriormente se realizó un análisis con cada sitio polimórfico, relacionándolo con la expresión de hA3G, para observar si de manera individual, los polimorfismos podrían afectar la transcripción de la proteína y por lo tanto sus niveles de expresión, pero no se encontró alguna asociación relacionada a los sitios examinados. Lo cual nos indica que ninguno de estos polimorfismos afecta de manera clave en algún sitio de inicio de transcripción de la proteína.

De igual manera, con cada sitio de los polimorfismos, se realizaron gráficas de frecuencia, para observar la distribución de alelos entre las diferentes cohortes y saber si existía una relación entre el polimorfismo y los grupos, sin embargo en la mayoría de los casos se observó que el patrón de distribución de alelos era similar entre los grupos de estudio, excepto el de expuestos seronegativos en el polimorfismo A-1447G y en el de VIH+ con baja carga viral, los cuales presentaron tendencias diferentes con respecto a los otros grupos en los polimorfismos C-1218G, A-1215C y C-346G. En estudios previos, se había identificado a una cohorte similar de personas VIH+ con baja carga viral, con un comportamiento diferente ante la infección de VIH en comparación a donadores sanos y personas VIH positivas, este grupo presentaba baja carga viral, un conteo normal de células T CD4⁺ y altos niveles de expresión de la proteína hA3G [66, 67]. Probablemente,

esta es la razón por la cual en los polimorfismos anteriormente mencionados, se tenga un patrón de distribución de alelos diferente en este grupo, aunque cabe señalar, que no tuvo influencia en una mayor o menor expresión de la proteína.

Posteriormente con los polimorfismos, se realizaron haplotipos reuniendo los resultados de todas las cohortes para poder determinar un fenotipo relacionado en toda la población de estudio (gráfica 11), el haplotipo más frecuente fue el homocigoto dominante, cabe resaltar que los haplotipos que contienen en su totalidad alelos heterocigotos y homocigotos recesivos no se encontraron en la población de estudio, este resultado podría ser producto de la evolución poblacional y variabilidad biológica característica.

A continuación los haplotipos se relacionaron con las diferentes cohortes para observar si alguno estaba asociado a un grupo, pero la mayoría de las cohortes presentaron el mismo comportamiento de frecuencias que en la gráfica general, con excepción de las personas VIH+ con baja carga viral, en cuyo histograma se observa una distribución homogénea de la frecuencia, posiblemente con un mayor número de pacientes se podría encontrar una diferencia significativa con respecto a las demás cohortes.

Posteriormente, los haplotipos se relacionaron con la expresión de hA3G, carga viral y conteo de células T CD4⁺, (gráficas 13, 14 y 15) no encontrándose alguna diferencia significativa, lo cual nos indica que no hay alguna asociación entre los haplotipos realizados con las variables y por lo tanto no se relacionan con la protección o progresión a la infección por el VIH. Estos hallazgos concuerdan con los ya reportados en el trabajo de Ping An y colaboradores en el cual también observaron que haplotipos en el promotor no se relacionaban con la infección de VIH.[4]

Al observar que en los haplotipos más frecuentes, se contaban con alelos que se repetían, se decidió omitirlos y tomar solo los cuatro sitios que eran variables, para observar si existía alguna relación con la expresión de la proteína hA3G y la carga viral, pero no se encontró alguna diferencia significativa. Lo cual nos indica, que ni

aún en la parte más variable de los haplotipos existe alguna relación con la protección al VIH o a la progresión de SIDA.

En resumen, no pudo asociarse algún polimorfismo o haplotipo con la carga viral, conteo de células T CD4⁺ o con la expresión de la proteína, esto implica que no se les relaciona con la protección ante el VIH o la progresión a SIDA.

8.3. Polimorfismo H186R en el exón 4 de hA3G

El análisis también se realizó en el exón 4, debido a que en esta región se encuentra el polimorfismo H186R que está relacionado con los alelos heterocigotos (AG) y homocigotos recesivos (GG) que induce un cambio no sinónimo en el codón 186 (H-R; histidina a arginina). Este cambio se ha asociado con un menor tiempo de progresión a SIDA en la población afroamericana [70, 71] y se deseaba saber, si en la población mexicana se encontraba el mismo patrón de comportamiento.

Para realizar el análisis del polimorfismo en el exón 4, se relacionaron los alelos implicados en el polimorfismo con la expresión de hA3G, pero no se obtuvo alguna diferencia significativa, debido a que en la población estudiada solo se encontró un individuo con los alelos homocigotos recesivos (GG) y ocho con los alelos heterocigotos (AG), de una población de 164 personas, razón por la cual no puede asociarse con el tiempo de progresión a SIDA, como se ha reportado con anterioridad en la población afroamericana[72].

8.4. Calculo de frecuencias alélicas y genómicas

Se realizó la comparación de las frecuencias alélicas y genómicas de otras poblaciones, que se encuentran reportadas en la base de datos del NCBI. En ella, se pudo confirmar que mediante este estudio se encontró el polimorfismo C-1226T, que no se encuentra reportado en alguna otra población de estudio [73], también se puede confirmar que no se ha descrito en estudios previos.

Al observar las frecuencias del polimorfismo C-1226T, podemos notar que recién se introdujo en nuestra población, ya que la frecuencia mayoritaria la tiene el alelo homocigoto dominante (C/C=0.95), seguida por los alelos heterocigotos (C/T=0.043) y finalmente el alelo homocigoto recesivo (T/T=0.006).

De las tablas 12 y 13 se pueden observar diferencias evidentes en las frecuencias alélicas y genómicas en los sitios A-1477G del promotor de hA3G y en el exón 4, ambas con respecto a la población africana.

En el caso del polimorfismo A-1477G, no se ha reportado alguna relación con la protección, el riesgo a la infección por el VIH o la progresión a SIDA en otras poblaciones, parece ser que en nuestra población existe una frecuencia homogénea entre los alelos homocigotos dominantes (AA) y heterocigotos (AG), con una frecuencia menor el homocigoto resultante (GG), cabe resaltar que este polimorfismo no se encontró relacionado con la expresión de la proteína, la carga viral o el conteo de células T CD4⁺.

Referente a la frecuencia alélica y genómica en el exón 4 en nuestra población, se puede observar una gran diferencia en la distribución de alelos comparándola con población africana, reafirmando que es necesaria la presencia de los alelos heterocigotos (AG) y homocigotos recesivos (GG) para que el polimorfismo H186R se asocie con un menor tiempo de progresión a SIDA. Anurag Rathore y colaboradores estudiando una población hindú hallaron que tampoco se encontraba frecuentemente el alelo heterocigoto y homocigoto recesivo de este polimorfismo y que no se asociaba con la susceptibilidad a la infección de VIH y a la progresión a SIDA.[72]

Con base en la información presentada, podemos indicar que nuestros resultados son consistentes con estudios anteriores. Por lo cual, para tener una caracterización *in vivo* de la proteína hA3G, es necesario considerar otros factores, entre los que podrían destacar los celulares, virales y epigenéticos que probablemente estarían involucrados contundentemente en la expresión de la proteína entre las diferentes cohortes de estudio.

Ha sido demostrado que hay moléculas que regulan de manera positiva la síntesis de hA3G, como el interferon alfa (IFN- α), que puede mejorar de forma significativa la expresión de hA3G en células T CD4⁺, macrófagos y hepatocitos, disminuyendo su susceptibilidad viral [74]. La vía de señalización por la cual se lleva a cabo la activación transcripcional de hA3G en células TCD4⁺ y en macrófagos aún no queda clara, pero en el caso de hepatocitos se elucidó que la vía de activación transcripcional por el IFN- α utiliza una vía independiente STAT1 que puede utilizarse en paralelo con vía clásica JAK /STAT [75]. También algunas otras citocinas como la interleucina-2 (IL-2), IL-15 y en menor medida IL-7 que mejoran la expresión de hA3G [76], sin embargo, como anteriormente se había mencionado, estas moléculas transforman el complejo de bajo peso molecular de hA3G que es enzimáticamente activo en células T, a uno de alto peso molecular inactivo. Esto demuestra que existen muchos factores que no solo afectan de manera inmune, sino que conjuntamente repercuten en otras áreas, como la genética.

Pero no solo las citocinas regulan la transcripción de la proteína, también se han encontrado otros factores de transcripción específicos de la proteína, como el Sp1 y Sp3, que son importantes para el aumento de la transcripción [69].

En cuanto a las proteínas virales, se han realizado metodologías para comprobar si estas aumentan la transcripción de hA3G, expresando a las proteínas del VIH Vif y Tat, pero los ensayos demostraron que la actividad transcripcional de hA3G no fue alterado significativamente por su presencia en líneas celulares [69].

Aunque en estudios *in vitro*, las proteínas Vif y Tat no se encontraron relacionadas con una mayor o menor expresión de la proteína hA3G, posiblemente *in vivo* algunas proteínas virales de superficie si lo hagan, debido a que estas son las que tienen el primer contacto con la célula del hospedero y posiblemente desencadenen alguna vía de señalización que aumente la expresión de la proteína hA3G.

Aún faltan por explorar otras posibilidades, como la activación de vías de señalización mediante los TLR (Toll Like Receptors), se sabe que estas proteínas actúan como receptores de reconocimiento de patrones. Recientemente se ha demostrado que secuencias de ARN derivadas del genoma del VIH-1 inducen la activación de células T a través de interacciones con el TLR 7 / 8 [77]. Posiblemente también estén involucrados en la activación de la expresión de la proteína hA3G.

Teniendo todo este panorama, se observa que la expresión de la proteína está regulada por diversos factores, que pueden interactuar entre sí, para aumentar o disminuir la actividad transcripcional. Es por ello que se podrían empezar a dilucidar algunos factores de transcripción específicos (ya que la proteína hA3G tiene varios sitios que son transcripcionalmente activos) y relacionar con vías de señalización que puedan activarlos, para conocer cuáles son los factores que influyen de manera contundente.

9. CONCLUSIONES:

En este proyecto, se caracterizó genéticamente a la proteína hA3G en población Mexicana:

1. Se detectaron siete polimorfismos en la región promotora, con una frecuencia mínima del 3.0%, estos no se relacionaron con la expresión de hA3G, ni con la susceptibilidad a la infección así como con el tiempo de progresión a SIDA.
 2. No se encontró una asociación entre número de polimorfismos y las diferentes cohortes de pacientes estudiadas.
 3. Se encontró un polimorfismo no reportado de la región promotora C-1226T, con una frecuencia poblacional de 0.043.
 4. Se pueden observar diferencias de la frecuencia genómica poblacional en dos sitios polimórficos: A -1477G en el promotor y el que se ubica en el exón 4 ambos con respecto a la población africana; en este último, se confirma que es necesaria la presencia de los alelos heterocigotos (AG) y homocigotos recesivos (GG) para que el polimorfismo H186R se asocie con un menor tiempo de progresión a SIDA.
 5. No se pudo relacionar el tiempo de progresión a SIDA con el polimorfismo H186R, debido a que en la población de estudio, se tiene una baja frecuencia de este alelo.
 6. Este estudio provee de información suficiente, para reafirmar que la expresión de la proteína hA3G no es influida positiva o negativamente por los SNP's del promotor, debido a que no se encontró una relación entre los polimorfismos y haplotipos con la expresión de hA3G.
 7. En este proyecto se consideró la caracterización genética, pero aun faltan por explorar otros factores que podrían afectar la inducción de la expresión de la proteína, entre los que se encuentran los celulares, virales y epigenéticos.
-

8. La investigación referente a la proteína con actividad antirretroviral hA3G, es importante, ya que forma parte de la respuesta innata, que es clínica y biológicamente relevante para tener una nueva perspectiva para el área de la terapéutica de la infección por VIH/SIDA.

10. REFERENCIAS

1. <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>, 2KEM. 2009.
 2. <http://www.nejm.org>, *Structure of HIV*. 2009.
 3. <http://caibco.ucv.ve/caibco/vitael/>, *Estructura genómica*. 2008.
 4. Ping An, e.a., *APOBEC3G Genetic Variants and Their Influence on the Progression to AIDS*. *J. of Virology*, 2004. **78**(20): p. 11070-11076.
 5. <http://www.iayork.com/>, *HIV and T cell activation*. 2007.
 6. Greene, Y.-L.C.a.W.C., *The APOBEC3 Cytidine Deaminases: An innate Defensive Network Opposing Exogenous Retroviruses and Endogenous Retroelements*. *Annu. Rev. Immunol*, 2008. **26**: p. 317-353.
 7. A., L.J., *Descubrimiento, estructura, heterogeneidad y origen del VIH in El VIH y la patogénesis del SIDA*, I.N.E.R. Fondo de Cultura Económica, Editor. 2008: México D.F. p. 749.
 8. Cherman, J.C.e.a., *Isolation of a new retrovirus in a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome*. *Antibiot Chemother*, 1983. **32**: p. 48-53.
 9. Coffin J., e.a., *Human immunodeficiency viruses*. *Science*, 1986. **232**(4751): p. 697.
 10. Salma Nowroozalizadeh, F.M., Zacarias da Silva, Johanna Repits, Braima Dabo, Carla Pereira, Antonio Biague, Jan Albert, Jens Nielsen, Peter Aaby, Eva Maria Fenyö, Hans Norrgren, Birgitta Holmgren and Marianne Jansson *Studies on toll-like receptor stimuli responsiveness in HIV-1 and HIV-2 infections* *Cytokine*, June 2009. **46**(3): p. 325-331.
 11. Gao F., e.a., *Human infection by genetically diverse SIVSM-related HIV-2 in west Africa*. *Nature*, 1992. **358**(6386): p. 495-9.
 12. David M. Knipe; Peter M. Howley; Diane E. Griffin; Robert A. Lamb; Malcolm A. Martin; Bernard Roizman; Stephen E. Straus, *HIVs and their replication*, in *Fields Virology*, L.W. Wilkins, Editor. 2007: Philadelphia. p. 3177.
 13. Murray Patrick R., e.a., *Virología*, in *Microbiología médica*, Elsevier, Editor. 2006: España. p. 657-674.
 14. Abbas, L.y., *Inmunodeficiencias congénitas y adquiridas*, in *Inmunología celular y molecular*, Elsevier, Editor. 2005: Madrid, España.
 15. Jacobo-Molina, A.A., E., *HIV reverse transcriptase structure-function relationships*. *J. Biol. Chem.*, 1991. **30**(6351-6).
 16. Kwong, P.D.W.R., Robinson J., Sweet R. W. , *Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody*. *Nature*, 1998. **393**(648-659).
 17. Clements, J.P., S., *Molecular basis of the pathobiology of lentivirus*. *Virus Res.*, 1994. **32**: p. 97-107.
 18. Haseltine, W., *Molecular biology of HIV*, in *AIDS and the new viruses*. 1990, Ed. AG. Dalgleish & RA. Weiss. p. 11-40.
 19. Emerman, M.M., M., *HIV-1 regulatory/accessory genes: Keys to unraveling viral and host cell biology*. *Science*, 1998. **280**: p. 1880-1884.
 20. Meyer, B., Meinkoth, J.L. & Malim, MH *Nuclear transport of the human immunodeficiency virus type 1, Visna virus, and equine infectious anemia virus Rev proteins: identification of a family of transferable nuclear export signals*. *J. Virol*, 1996. **70**: p. 2350-2359.
 21. A., L.J., *Proteínas virales que determinan las características biológicas del VIH*, in *El VIH y la patogénesis del SIDA*, I.N.d.E.R. Fondo de Cultura Económica, Editor. 2008: México D.F. p. 749.
 22. Knipe David M., e.a., *HIVs and Their Replication*, in *Fiel's Virology*, L.-R. Publishers, Editor. 2007: Philadelphia. p. 2107-2183.
 23. Marin, M., K. M. Rose, S. L. Kozak, y D. Kabat, *HIV-1 Vif protein binds the editing enzyme APOBEC3G and induces its degradation*. *Nat. Med.*, 2003. **9**: p. 1398-1403.
-

24. Popov, S., M. Rexach, L. Ratner, G. Blobel, y M. Bukrinsky, *Viral protein R regulates docking of the HIV-1 reintegration complex to the nuclear pore complex* J. Biol. Chem., 1998. **273**: p. 13347-13352.
25. Stevenson, M., *HIV-1 pathogenesis*. 2003.
26. Kim, C.D.C.a.P.S., *HIV entry and its inhibition* Cell, 1998. **93**(5): p. 681-4.
27. J.A., P., *Mechanism of DNA strand transfer reactions catalyzed by HIV reverse transcriptase*. Science, 1992. **258**(5085): p. 1112-8.
28. A., L.J., *Control intracelular de la replicación del VIH*, in *El VIH y la patogénesis del SIDA*, I.N.d.E.R. Fondo de Cultura Económica, Editor. 2008: México D.F. p. 749.
29. Marshall HM, R., Berry C, Llano M, Sutherland H, Saenz D, BikmoreW, Poeschla E, Bushman FD, *Role of PSIP1/LEDGF/p75 in Lentiviral Infectivity and Integration Targeting*. PLoS ONE, 2007. **2e**(1340).
30. Cao Y., e.a., *Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection*. New England Journal Medicine, 1995. **332**(4): p. 201-8.
31. Ganesh, L.e.a., *Infection of specific dendritic cells by CCR5-tropic human immunodeficiency virus type 1 promotes cell-mediated transmission of virus resistant to broadly neutralizing antibodies*. J. Virol, 2004. **78**(21): p. 11980-7.
32. M., G., *Infección por el VIH, Epidemiología, etiopatogenia e historia natural*, in *Infección por el VIH*, Emisa, Editor. 1996: Barcelona. p. 9-28.
33. Zaitseva, M.B.e.a., *CXCR4 and CCR5 on human thymocytes: biological function and role in HIV-1 infection* J. Immunol, 1998. **161**(6): p. 3103-13.
34. Berkowitz, R.D., et. al. , *CCR5-andCXCR4-utilizing strains of human immunodeficiency virus type 1 exhibit differential tropism and pathogenesis in vivo*. J. Virol, 1998. **72**(12): p. 10108-17.
35. <http://www.microbiologybytes.com/virology/AIDS1.html>, *The Pathogenesis of AIDS*. 2009.
36. Janeway, C.A., Shlomchik, M.J., Travers, P. , Walport, M., *Fallos en los mecanismos de defensa*, in *Inmunobiología*, Elsevier, Editor. 2003: Barcelona. p. 752.
37. Montoya Guarín, E.A., *Reacciones y alteraciones del sistema inmune durante la infección por el VIH-1*. Infectio, 2006. **10**(4): p. 250-265.
38. A., L.J., *Respuestas inmunes innatas en la infección por VIH*, in *El VIH y la patogénesis del SIDA*, I.N.d.E.R. Fondo de Cultura Económica, Editor. 2008: México D.F. p. 749.
39. Sullivan BL, K.E., Saifuddin M, Takefman DM, Saarloos MN, Sha BE, *Susceptibility of HIV-1 plasma virus to complement-mediated lysis*. J Immunol., 1996. **157**: p. 1791-8.
40. Cocchi F, D.A., Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P., *Identification of RANTES, MIP-1alpha, and MIP-1beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells*. Science, 1995. **210**: p. 1811-5.
41. Altfeld M, A.M., Kreuzer KA, Rockstroh JK, Dumoulin FL, Schliefer K et al, *T(H)1 to T(H)2 shift of cytokines in peripheral blood of HIV-infected patients is detectable by reverse transcriptase polymerase chain reaction but not by enzyme-linked immunosorbent assay under nonstimulated conditions* J Acquir Immune Defic Syndr, 2000. **23**(4): p. 287-94.
42. Moretta A, B.C., Mingari MC, Biassoni R, Moretta L., *What is a natural killer cell?* Nature Immunol, 2002. **3**(1): p. 6-8.
43. Ahmad A, M.R., Thomas R, Menezes J, *Evidence for a defect of antibody-dependent cellular cytotoxic (ADCC) effector function and anti-HIV gp120/41-specific ADCC-mediating antibody titres in HIV-infected individuals*. J Acquir Immune Defic Syndr., 1994. **7**(5): p. 428-437.
44. Biron CA, N.K., Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP., *Natural killer cells in antiviral defence: function and regulation by innate cytokines*. Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 189-220.
45. Emilie D, M.M., Nicolas JF, Fior R, Galanaud P, *Antagonistic effect of interferon-gamma on tat-induced transactivation of HIV long terminal repeat*. J Biol Chem, 1992. **267**(29): p. 20565-70.

46. Soumelis V, S.I., Liu YJ, Levy JA., *Natural type I interferon producing cells in HIV infection*. Hum Immunol, 2002. **63**: p. 1206-12.
47. Brassard DL, G.M., Bordens RW., *Interferon alpha as an immunotherapeutic protein*. J Leukoc Biol, 2002. **71**: p. 565-581.
48. Mackewicz CE, Y.L., Lifson JD, Levy JA, *Non-cytolytic CD8 Tcell anti-HIV responses in primary infection*. Lancet, 1994. **344**: p. 1671-3.
49. Montero, A.L., *Factores del huésped que afectan a la progresión de la infección por el virus de la inmunodeficiencia Humana de tipo I (VIH-I)*, in *Inmunología de la Universidad Autónoma de Barcelona*. 2004, Universidad Autónoma de Barcelona: Barcelona. p. 130.
50. A., L.J., *Respuestas inmunes de los linfocitos T a la infección por VIH*, in *El VIH y la patogénesis del SIDA*, I.N.d.E.R. Fondo de Cultura Económica, Editor. 2008: México D.F. p. 749.
51. Kalams, S.A.e.a., *Association between Virus-Specific Cytotoxic T-Lymphocyte and Helper Responses in Human Immunodeficiency Virus Type I Infection*. J. Virol, 1999. **73**(8): p. 6715-6720.
52. A., L.J., *Tratamiento antiviral*, in *El VIH y la patogénesis del SIDA*, I.N.d.E.R. Fondo de Cultura Económica, Editor. 2008: México D.F. p. 749.
53. Ezzell, C., *AIDS drugs get green light*. Nature, 1987. **329**(6142): p. 751.
54. Huang P, F.D., Plunkett W, *Selective action of 2', 3'- dideoxy-2', 3'-dideoxythymidine triphosphate on human immunodeficiency virus reverse transcriptase and human DNA polymerases*. J Biol Chem, 1992. **276**(4): p. 2817-22.
55. E., D.C., *What can be expected from Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) in the treatment of human immunodeficiency virus type I (HIV-1) infections?* Med Virol, 1996. **6**: p. 97-117.
56. Lalezari, J.P.e.a., *Enfuvirtide, an HIV-1 fusion inhibitor, for drug resistant HIV infection in North and South America*. N Engl J Med, 2003. **348**(22): p. 2175-85.
57. FDA. *Antiretroviral drugs used in the treatment of HIV infection; Drugs Used in the Treatment of HIV Infection*. 2009 [cited 2009 091109].
58. J.Levy, *What can be achieved with an HIV vaccine?* The Lancet, 2001. **357**(9251): p. 223-224.
59. Gaschen B., e.a., *Diversity Considerations in HIV-1 Vaccine Selection Science*, 2002. **296**(5577): p. 2354-2360.
60. A., L.J., *Desarrollo de vacunas*, in *El VIH y la patogénesis del SIDA*, I.N.d.E.R. Fondo de Cultura Económica, Editor. 2008: México D.F. p. 749.
61. Sheehy A., e.a., *insolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral vif protein*. Nature, 2002. **418**(8): p. 646-650.
62. Greene, Y.-L.C.a.W.C., *APOBEC3 Cytidine Deaminases:Distinct Antiviral Actions along the Retroviral Life Cycle*. J Biol Chem, 2006. **281**(13): p. 8309-8312.
63. Han S. V., e.a., *APOBEC3G genetic variants and their association with risk of HIV infection in highly exposed Caucasians*. AIDS, 2006. **20**: p. 1984-86.
64. Xia Jin, H.W.a.H.S., *APOBEC3G levels predict rates of progression to AIDS*. Retrovirology, 2007. **4**(20).
65. NCBI. *Homo sapiens chromosome 22 genomic contig, reference assembly*. 2009 [cited 2009 091109].
66. Xia Jin, A.B., Huiyuan Chen, Ryan Bennett, Richard Reichman, and Harold Smith, *APOBEC3G/CEM15 (hA3G) mRNA Levels Associate Inversely with Human Immunodeficiency Virus Viremia*. J. of Virology, 2005. **79**(17): p. 11513-11516.
67. Vázquez-Pérez, O., Hernández-Juan, Torres and Reyes-Terán, *APOBEC3G mRNA expression in exposed seronegative and early stage HIV infected individuals decreases with removal of exposure and with disease progression*. Retrovirology, 2009. **6**(23).
68. <http://www.unaids.org/>. 2009 [cited 2009 011209].

-
69. Heide Muckenfuss, J.K.K., Erika Krebil, Marion Battenberg, Christina Schwer, Klaus Cichutek, Carsten Münk and Egbert Flory, *Sp1 and Sp3 regulate basal transcription of the human APOBEC3G gene*. Nucleic Acids Research, 2007. **35**(11): p. 3784-3796.
 70. Ariana Harari, M.O., Lubbertus C. F. Mulder, and Viviana Simon, *Polymorphisms and Splice Variants Influence the Antiretroviral Activity of Human APOBEC3H*. J. Virol, 2009. **83**(1): p. 295-303.
 71. Craig P., e.a., *Population Level Analysis of human Immunodeficiency Virus Type 1 Hipermutacion and Its Relationship with APOBEC3G and vif Genetic variation*. J. of Virology, 2006. **80**(18): p. 9259-9269.
 72. Anurag Rathore, A.C., Naohiko Yamamoto, Tapan N. Dhole, *Absence of H186R Polymorphism in Exon 4 of the APOBEC3G Gene among North Indian Individuals*. Genetic Testing, 2008. **12**(3): p. 453.
 73. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>. 2010 [cited 2010 290110].
 74. Feng-xiang Wang, J.H., Hangxiang Zhang, Xinliang Ma and Hui Zhang, *APOBEC3G upregulation by alpha interferon restricts human immunodeficiency virus type 1 infection in human peripheral plasmacytoid dendritic cells*. Journal of General Virology, 2008. **88**: p. 722-730.
 75. Phuong Thi Nguyen Sarkis, S.Y., Rongzhen Xu y Xiao-Fang Yu, *STAT1-Independent Cell Type-Specific Regulation of Antiviral APOBEC3G by IFN- α* . J. Immunol, 2006. **177**: p. 4530-4540.
 76. Kim S. Stopak, Y.-L.C., Jerry Kropp, Robert M. Grant, and Warner C. Greene, *Distinct Patterns of Cytokine Regulation of APOBEC3G Expression and Activity in Primary Lymphocytes, Macrophages, and Dendritic Cells* J. Biol. Chem., 2007. **282**(6): p. 3539-3546.
 77. Nicholas Funderburg, A.A.L., Wei Jiang, Benigno Rodriguez, Scott F. Sieg, Michael M. Lederman, *Toll-Like Receptor Ligands Induce Human T Cell Activation and Death, a Model for HIV Pathogenesis*. PLoS ONE, 2008. **3**(4): p. 1-7.
-

11. ANEXOS.

En esta sección se muestran los polimorfismos encontrados en las cohortes de estudio.

Polimorfismos encontrados en donadores sanos

Posición:	-1840	-1477	-1226	-1218	-1215	-827	-346	H186R
hA3Gpromotor	a/t	a/g	c	g/c	a/c	b	g/c	a/g
DS1	a	a	c	g	a	c	g	a
DS2	a	g	c	g/c	a	c	g/c	a
DS3	a	a/g	c	g/c	a	c	g/c	a
DS4	a	a/g	c	g/c	a/c	c	g/c	a
DS5	a	a	t	g	a	c	g	a
DS6	a	a	c	g	a	c	g	a
DS7	a	a/g	c	g/c	a	c	g/c	a
DS8	a	a	c/t	g	a	c	g	a
DS9	a	a	c	g	a	c	g	g
DS10	a	a	c	g	a	c	g	a
DS11	a	a/g	c	g/c	a/g	c	g/c	a
DS12	a	a/g	c	g/c	a/c	c	g/c	a
DS13	a	a/g	c	g/c	a/c	c	g/c	a
DS14	a/t	g	c	c	a	g/c	c	a
DS15	a	a/g	a/g	g/c	a	c	g/c	a
DS16	-	a/g	c	g/c	a/c	c	g/c	a
DS17	-	a/g	c	g/c	a/c	c	g/c	a
DS18	-	a/g	c	g/c	a/c	c	g/c	a
DS19	-	a/g	c	g/c	a/c	c	g/c	a
DS20	a	a	c	g	a	c	g	a
DS21	a	a/g	c	g/c	a/c	g/c	c	a
DS22	a	a/g	c	g	a	c	g	a
DS23	a	a/g	c	g	a	c	g	a
DS24	a	a	c	g/c	a	c	g	a
DS25	a	a	c	g	a	c	g	a
DS26	a	a	c/t	g/c	a	c	g/c	a
DS27	a	a	c	g	a	c	g	a
DS28	-	g	c	c	c	c	c	a
DS29	a	a/g	c	g	a	c	g/c	a/g
DS30	a/t	a/g	c/t	g/c	a	c	g	a
DS31	a	g	c	c	c	c	c	a
DS32	-	a/g	c	g/c	a/c	c	g/c	a
DS33	a	a	c	g	a	c	g	a

DS34	-	g	c	c	c	c	c	a
DS35	a	a	c	g	a	c	g	a
DS36	-	a/g	c	g/c	a/c	c	g/c	a
DS37	-	a/g	c	g/c	a/c	c	g/c	a
DS38	a	a	c	g	a	c	g	a
DS39	-	a	c	g	a	c	g	a
DS40	-	a	c	g	a	c	g	a
DS41	-	a/g	c	g/c	a/c	c	g/c	a
DS42	-	a	c	g	a	c	g	a
DS43	-	a/g	c	g/c	a/c	c	g/c	a
DS44	-	a	c	g	a	c	g	a
DS45	-	a/g	c	g/c	a/c	c	g/c	a
DS46	a	a	c	g	a	c	g	a
DS47	-	g	c	c	a/c	c	c	a
DS48	-	a	c	g	a	c	g	a
DS49	-	a/g	c	g/c	a/c	c	g/c	a
DS50	-	a	c	g	a	c	g	a

-Polimorfismo que no pudo ser leído.

Polimorfismos encontrados en personas expuestas seronegativas

Posición:	-1840	-1477	-1226	-1218	-1215	-827	-346	H186R
hA3Gpromotor	a/t	a/g	c	g/c	a/c	b	g/c	a/g
AAM2	-	g	c	g/c	a/c	c	c	a
ACS	a	a	c	g	a	c	g	a
AGC	-	a	c	g	a	c	g	a
AGHI	a	a	c	g	a	c	c	a
AAH	a	a/g	c	g/c	a/c	c	c	a
ARTM	a	a	c	g	a	c	g	a
AVVP	a	a/g	c	g/c	a/c	c	g/c	a
BAM	a	a	c	g	a	c	g	a
BGS	a	g	c	c	a	c	g	a
BPS	-	a	c	g	a	c	g	a
CAAG	-	a	c	g	a	c	g	a
CCV	-	a/g	c	g/c	a/c	g/c	g/c	a
CGOL	a/t	a/g	c	g/c	a	c	g	a
CHJ	a	a	c	g	a	c	g	a
CMRM	-	a	c	g	a	c	g	a
CRL	a	a/g	c	g/c	a	c	g/c	a

CUL	-	a/g	c	g/c	a	c	g/c	a
DGG	a	a/g	c	g/c	a	c	g/c	a
DSIS	-	a/g	c	g/c	a/c	c	g/c	a
FMH	a	a/g	c	g/c	a/c	c	g/c	a/g
GAO	a	a	c	g	a	c	g	a
CGLC	a	a	c	g	a	c	g	a
GMA	-	g	c	c	c	c	c	a
GMH	a	a	c	g	a	c	g	a
GSC	a	a/g	c	g/c	a	c	g/c	a
ICCA	-	a/g	c	g	a	c	g/c	a
JAET	a	a/g	c	g/c	a/c	c	g/c	a
JCOG	a	a	c	g	a	c	g	a
JJSM	a	a	c	g	a	c	g	a
LCE	a	g	c	c	a/c	c	c	a
LGM	a	a	c	g	a	c	g	a
MGICS	a	a	c	g	a	c	g	a
MIM	a	g	c	c	c	c	c	a
MLLM	a/t	a/g	c	g/c	a	c	g	a
MLMF	a	a	c	g/c	a	c	g/c	a
MLPR	a	a/g	c	g/c	a/c	c	g/c	a
MMH	a	a	c	g	a	c	g	a
MMV	-	a	c	g	a	c	g	a
OVPL	a	a	c	g	a	c	g	a
REEM	a	a	c	g	a	c	g	a
RMV	a	a/g	c	g/c	a/c	g/c	g/c	a
SMA	-	g	c	c	c	c	c	a
SRG	a	a	c	g	a	c	g	a
TRA	a	a	c	g	a	c	g	a
VMVC	-	a/g	c	g/c	a	c	g/c	a
YLM	a	a	c	g	a	c	g	a
YVB	a	a/g	c	g/c	a	c	g/c	a
RDIV	-	a/g	c	g/c	a/c	c	-	a
NHR	a	a/g	c	g/c	a/c	c	-	a
JRHC	-	a	c	g	a	c	g	a
NMMS	a	a	c	g	a	c	g	a
RMR	-	g	c	g	c	a	a	a
GLC	a	g	c	g	c	a	a	a
ERA	a	g	c	g	c	a/g	a	a/g

-Polimorfismo que no pudo ser leído.

Polimorfismos encontrados en personas VIH positivas

Posición:	-1840	-1477	-1226	-1218	-1215	-827	-346	H186R
hA3Gpromotor	a/t	a/g	c	g/c	a/c	b	g/c	a/g
20	a	a	c	g	a	c	g	a
29	-	a	c	g	a	c	g	a/g
43	-	a/g	c	g	a	c	g	a
44	-	a	c	g	a	c	g	a
57	a	a	c	g/c	a	c	g	a
87	a	a/g	c	g/c	a	c	g	a
96	a	a	c	g	a	c	g	a
174	a	a	c	g	a	c	g	a
181	-	a/g	c	g/c	a	c	g/c	a
185	-	a/g	c	g/c	a	c	g/c	a
194	-	g	c	c	a/c	g/c	g/c	a
130	a	g	c	c	c	c	c	a
141	-	a/g	c	g/c	a/c	c	g/c	a/g
163	a	a/g	c	g/c	a/c	c	c	a
188	a	a	c	g	a	c	-	a
210	a	a	c	g	a	c	g	a
218	a	a	c	g/c	a	c	g	a
226	a	a/g	c	g/c	a/c	c	g/c	a
226	-	a/g	c	g/c	a/c	g/c	g/c	a
259	a	a	c	g/c	a	c	c	a
263	a	a	c/t	g	a	c	g	a
276	a	a	c	g	a	c	g	a
330	-	a/g	c	g/c	a/c	c	g/c	a
334	a	a	c	g	a	c	g	a/g
345	a	a/g	c	g/c	a/c	c	c	a
362	-	a/g	c	g/c	a/c	c	g/c	a
368	a	a	c	g	a	c	g	a
370	a	a/g	c	g/c	a/c	c	c	a
371	a	a	c	g	a	c	g	a/g
372	a	a	c	g	a	c	g	a
375	a	a	c	g	a	c	g	a
379	a	a/g	c	g/c	a/c	c	c	a
380	a	a	c	g	a	c	g	a
392	a	a/g	c	g	a	c	g/c	a
394	-	a/g	c	g/c	a/c	c	g/c	a
396	a	a/g	c	g/c	a/c	c	g/c	a
400	a	a/g	c	g/c	a/c	g/c	g/c	a

411	-	a/g	c	g/c	a	c	g	a
476	a	a	c	g	a	c	g	a/g
479	-	a/g	c	g/c	a/c	c	c	a
480	a	a	c	g	a	c	g	a
495	a	a/g	c	g/c	a	c	g	a
528	a	a/g	c	g/c	a	c	g	a
551	-	g	c	c	c	c	c	a
575	t	a	c	g/c	a/c	c	g/c	a
617	a	a	c	g	a	c	g	a
633	a	a/g	c	g/c	a/c	g/c	g/c	a
642	a	a	c	g	a	c	g	a
645	a	g	c	c	c	c	c	a
657	a	a/g	c/t	g/c	a	c	g/c	a
680	a	a	c	g	a	c	g	a
710	a	a/g	c	g/c	a	c	g	a
713	a	a/g	c	g/c	a/c	c	g/c	a
762	a	a/g	c	g	a	c	g/c	a
778	a	a	c	g	a	c	g	a
786	a	a/g	c	g/c	a/c	c	g/c	a
791	a	a	c	g	a	c	g	a
813	a	g	c	g	c	c	a	a
814	a	g	c	g	c/t	c	a	a
844	a	g/c	c	g/c	c	c	a/c	a

-Polimorfismo que no pudo ser leído.