



---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**TÍTULO DEL TEMA ESCRITO**

*Caracterización de la expresión del ARNm de APOBEC3G (A3G) en células mononucleares de sangre periférica de individuos infectados con VIH-1 comparados con individuos expuestos seronegativos.*

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**LOANA XONAI ÁLVAREZ GARCÍA**



**MÉXICO, D.F.**

**AÑO 2014**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: MIREYA RODRIGUEZ PENAGOS

**VOCAL:** Profesor: MARTHA PATRICIA COELLO COUTIÑO

**SECRETARIO:** Profesor: JOEL ARMANDO VAZQUEZ PEREZ

**1er. SUPLENTE:** Profesor: ROCIO GABRIELA TIRADO MENDOZA

**2° SUPLENTE:** Profesor: SONIA MAYRA PEREZ TAPIA

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS (CIENI), INER.**

**ASESOR DEL TEMA: DR. JOEL ARMANDO VÁZQUEZ PÉREZ** \_\_\_\_\_

**SUPERVISOR TÉCNICO: Q.F.B DÁMARIS PRISCILA ROMERO RODRÍGUEZ** \_\_\_\_\_

**SUSTENTANTE: LOANA XONAI ÁLVAREZ GARCÍA** \_\_\_\_\_



---

---

## INDICE

<b>1 INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>7</b>
1.1 DESCUBRIMIENTO DEL VIRUS DEL SIDA .....	7
1.2 EPIDEMIOLOGÍA DEL VIH EN MÉXICO Y EN EL MUNDO. ....	8
1.3 BIOLOGÍA DEL VIH .....	10
1.3.1 Genoma. ....	11
1.3.2 Proteínas. ....	12
1.3.1 Ciclo de replicación .....	13
1.4 HISTORIA NATURAL DE LA INFECCIÓN. ....	21
1.4.1 Infección aguda. ....	21
1.4.2 Infección crónica .....	23
1.4.3 Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida SIDA. ....	23
1.5 RESPUESTA INMUNOLÓGICA CONTRA EL VIH .....	24
1.5.1 Respuesta Inmune innata celular. ....	25
1.5.1.1 Toll-like receptor. ....	25
1.5.1.2 Monocitos. ....	27
1.5.1.3 Celulas Natural Killer. ....	28
1.5.1.4 Células dendríticas. ....	29
1.5.2 Respuesta inmune adaptativa.....	29
1.5.2.1 Linfocitos T CD8+. ....	30
1.5.2.2 Linfocitos T CD4+. ....	30
1.5.2.3 Respuesta humoral .....	31
1.6 FACTORES CELULARES QUE RESTRINGEN LA REPLICACIÓN DE VIH-1. ....	32
1.6.1 TRIM5 $\alpha$ y TRIMCyp. ....	32
1.6.2 Teterina. ....	33
1.6.3 Familia APOBEC.....	34
1.6.4 APOBEC3G.....	34
1.6.4.1 Estructura de APOBEC3G .....	35
1.6.4.2 A3G se encapsida dentro de viriones de VIH-1. ....	36





---

---

1.6.4.3	Hipermutación viral	37
1.6.4.4	Actividad de A3G independiente de deaminasa.	38
1.6.4.5	Vif Inhibe la actividad de A3G.	39
1.6.4.6	Efectos secundarios de la actividad de A3G.	40
1.6.4.7	Regulación de la expresión de A3G	41
<b>2</b>	<b>ANTECEDENTES</b>	<b>42</b>
<b>3</b>	<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>43</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>44</b>
4.1	OBJETIVOS GENERALES	44
4.2	OBJETIVOS PARTICULARES	44
<b>5</b>	<b>HIPÓTESIS</b>	<b>45</b>
<b>6</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>45</b>
6.1	MUESTRA DE ESTUDIO	45
6.2	DESCONGELACIÓN DE CÉLULAS.	46
6.3	SEPARACIÓN DE 4 ESTIRPES CELULARES: CD4+, CD8+, CD19+ Y CD14+.	47
6.3.1	<i>Citometría de flujo.</i>	47
6.3.1.1	Sistema de Fluidos.	48
6.3.1.2	Tamaño y granularidad celular.	49
6.3.1.3	Fluorescencia	50
6.3.2	<i>Controles de compensación.</i>	52
6.3.3	<i>Tinción celular.</i>	53
6.3.4	<i>Sorteo celular activado por fluorescencia (FACS, Fluorescence-Activated Cell Sorting).</i>	54
6.3.5	<i>Enriquecimiento de monocitos</i>	56
6.4	ENSAYOS CON CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA	57
6.5	ESTIMULACIÓN CELULAR.	57
6.6	LISADO DE CÉLULAS.	59
6.6.1	<i>Lisado en placa de 96 pozos (150,000 células por ensayo).</i>	59





---

---

6.6.2	<i>Lisado de células mononucleares de sangre periférica (2X10<sup>6</sup> células), extracción y purificación de ARN.</i>	60
6.7	CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.	61
6.8	SÍNTESIS DE CADN POR RT-PCR PUNTO FINAL	61
6.8.1	<i>Células separadas por FACS (150 000 células)</i>	61
6.8.2	<i>Células Mononucleares de Sangre Periférica (2X10<sup>6</sup>M células).</i>	63
6.9	DETECCIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA.	65
6.9.1	<i>Valvulas Nanoflex™</i>	65
6.9.2	<i>Circuitos integrados de fluidos.</i>	66
6.9.3	<i>Preparar la mezcla de muestras.</i>	69
6.9.4	<i>Preparando los ensayos.</i>	70
6.9.5	<i>Carga del arreglo dinámico IFC.</i>	71
6.10	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	72
<b>7</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>73</b>
7.1	SEPARACIÓN DE LAS DIFERENTES ESTIRPES CELULARES A PARTIR DE CMSP MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO Y ENRIQUECIMIENTO EN CULTIVO.	73
7.2	DETECCIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL ARNM DE LA FAMILIA DE GENES APOBEC3G Y DE LOS GENES DE LAS VÍAS DE TLRs, RIG E INTERFERON.	77
<b>8</b>	<b>ANÁLISIS DE RESULTADOS</b>	<b>94</b>
<b>9</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>97</b>
<b>10</b>	<b>ANEXO A</b>	<b>99</b>
<b>11</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>99</b>
<b>12</b>	<b>INDICE DE ABREVIATURAS</b>	<b>111</b>





---

---

## INDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Infecciones por el VIH y muertes relacionadas al SIDA. ....</i>	<i>8</i>
<i>Figura 2. Adultos y niños que viven con VIH, 2012.....</i>	<i>9</i>
<i>Figura 3. Estructura de VIH, modificación de.....</i>	<i>14</i>
<i>Figura 4. Ciclo de replicación de VIH. Modificación de [23].....</i>	<i>16</i>
<i>Figura 5. Historia Natural de la infección del VIH-1. Modificado de [48].....</i>	<i>23</i>
<i>Figura 6. Estructura de TLR. Modificación de [53].....</i>	<i>26</i>
<i>Figura 7. Reconocimiento de PAMPs por TLR de superficie, modificado de [55].....</i>	<i>26</i>
<i>Figura 8. Reconocimiento de PAMPs por TLRs intracelulares, modificado de [55].....</i>	<i>27</i>
<i>Figura 9. Estructura de A3G. Modificación de [88].....</i>	<i>36</i>
<i>Figura 10. Mecanismo de desaminación de A3G. Modificado de [106].....</i>	<i>37</i>
<i>Figura 11. Componentes del complejo para la poliubiquitinación de A3G.....</i>	<i>39</i>
<i>Figura 12. Motivos en Vif implicados en el ensamblaje del complejo ubiquitin ligasa.</i>	<i>40</i>
<i>Tabla 1. Características de la muestra.....</i>	<i>46</i>
<i>Figura 13. Esquema general de la composición de un citómetro de flujo.....</i>	<i>48</i>
<i>Figura 14. Enfoque hidrodinámico de la muestra en la celda de flujo. ....</i>	<i>48</i>
<i>Figura 15. La dispersión de la luz es proporcional al tamaño celular. ....</i>	<i>49</i>
<i>Figura 16. La dispersión lateral del laser es proporcional a la complejidad celular. ...</i>	<i>50</i>
<i>Figura 17. Unión específica de un antígeno a un anticuerpo con un fluorocromo conjugado.....</i>	<i>51</i>
<i>Figura 18. Trayectoria de luz, desde la intersección de la célula con el laser hasta los detectores. ....</i>	<i>52</i>
<i>Figura 19. Compensación de fluorescencia. Modificado de [154]. ....</i>	<i>53</i>
<i>Tabla 2. Mezcla de anticuerpos necesarios para la tinción de células.....</i>	<i>54</i>
<i>Figura 20. Separación Celular Activada por Fluorescencia, FACS. Modificado de [155]. ....</i>	<i>55</i>
<i>Tabla 3. Concentraciones necesarias por estímulo.....</i>	<i>59</i>
<i>Tabla 4. Modo de preparación del agente de lisis para una reacción.....</i>	<i>60</i>





---

---

<i>Tabla 5. Mezcla de reacción para síntesis de cADN, para las células separadas por FACS.....</i>	<i>62</i>
<i>Figura 21. Condiciones de reacción para PCR punto final de la síntesis de cADN para células separadas por FACS.....</i>	<i>62</i>
<i>Tabla 6. Mezcla de reacción para síntesis de cADN para CMSP. ....</i>	<i>63</i>
<i>Figura 22. Condiciones de reacción para PCR punto final de la síntesis de cADN para CMSP. ....</i>	<i>64</i>
<i>Figura 23. Microválvula NanoFlex™.....</i>	<i>66</i>
<i>Figura 24. Arreglo dinámico IFC .....</i>	<i>66</i>
<i>Tabla 7. Mezcla de reacción STA.....</i>	<i>67</i>
<i>Figura 25. Condiciones de reacción para la Amplificación STA. ....</i>	<i>68</i>
<i>Tabla 8. Mezcla de reacción con Exo I .....</i>	<i>68</i>
<i>Figura 26. Condiciones de PCR para el tratamiento con ExoI. ....</i>	<i>69</i>
<i>Tabla 9. Mezcla para preparar las muestras .....</i>	<i>70</i>
<i>Tabla 10. Mezcla de reacción para preparar los ensayos. ....</i>	<i>70</i>
<i>Tabla 11. Condiciones de reacción para la detección de expresión génica. ....</i>	<i>72</i>
<i>Figura 27. Ejemplo del análisis de citometría de flujo multiparamétrica para la identificación de 4 estirpes celulares (CD4, CD8, CD14 y CD19) .....</i>	<i>74</i>
<i>Figura 28. Ejemplo de la determinación de pureza de las células separadas.....</i>	<i>75</i>
<i>Figura 29. Ejemplo de la determinación de pureza de monocitos.....</i>	<i>76</i>
<i>Figura 30. Matriz de resultados obtenida de la cuantificación de la expresión génica, por el equipo BioMark™ HD System, Fluidigm.....</i>	<i>78</i>
<i>Tabla 12. Lista de genes seleccionados para el análisis .....</i>	<i>79</i>
<i>Figura 31. Gráficas comparativas entre cohortes, células TCD4 sin estímulo. ....</i>	<i>80</i>
<i>Figura 32. Gráficas comparativas entre cohortes, células TCD8+ sin estímulo .....</i>	<i>81</i>
<i>Figura 33. Gráficas comparativas entre cohortes, CMSP sin estímulo. ....</i>	<i>82</i>
<i>Figura 34. Gráficas comparativas entre cohortes, células T CD4+ estimuladas con IFN. ....</i>	<i>84</i>
<i>Figura 35. Gráficas comparativas entre cohortes, células T CD8+ estimuladas con IFN. ....</i>	<i>85</i>





---

---

*Figura 36. Gráficas comparativas entre cohortes, CMSP estimuladas con IFN. .... 86*

*Figura 37. Gráficas comparativas entre cohortes, células TCD4+ estimuladas con ssRNA40..... 87*

*Figura 38 Gráfica comparativas entre cohortes, células TCD8+ estimuladas con ssRNA40..... 89*

*Figura 39. Gráfica representativa de la expresión inducida por IFN en linfocitos TCD4+ CD8+ y CMSP de ESN..... 91*

*Figura 40. Gráfica representativa de la expresión inducida por ssRNA40 comparada con la expresión de su control negativo ssRNA41, en linfocitos TCD4+ de las cohortes: DS, ESN y CT..... 92*

*Figura 41. Gráfica representativa de la expresión inducida por ssRNA40 comparada con la expresión de su control negativo ssRNA41, en linfocitos TCD8+ de las cohortes: DS, ESN y CT..... 93*





---

---

## 1 INTRODUCCIÓN

### 1.1 Descubrimiento del virus del SIDA

El 5 de Junio de 1981 el CDC (Center of Diseases Control) publicó un informe detallado donde describía el nacimiento de una "nueva" enfermedad. El informe describe los síntomas de 5 pacientes varones homosexuales de Los Ángeles California, con neumonía por *Pneumocistis carinii*, infección de mucosas por *Candida sp*, a demás de viremia por Citomegalovirus (CMV)[1], lo cual indica que la "nueva" enfermedad estaba acompañada de una deficiencia inmunológica, provocando así infecciones oportunistas. Éste sería el primer reporte científico de lo que llegaría a ser conocido como Virus de Inmunodeficiencia Humana(VIH) [2].

El nombre de esta enfermedad era incierta, pero sin duda había que llamarle de alguna manera, así que se le atribuyen diversos nombres de los cuales destacan: "*neumonía gay*", "*cáncer gay*", "*GRID (Gay-Related Immune deficiency)*", éstos nombres aparecieron cronológicamente y se relacionan con los avances médico-científicos. En 1982 se le atribuye a ésta enfermedad venérea, el nombre citado en siglas de AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrome)[3].

Independientemente de encontrar un nombre para dicha enfermedad, el agente etiológico aun era un misterio. Sin embargo, 2 años después de los primeros indicios del SIDA, en 1983, L. Montaignier del departamento de virología del Instituto Pasteur y colaboradores, lograron, a partir de un nodo linfático de un individuo asintomático con linfadenopatía generalizada y otros síntomas característicos de SIDA, aislar un retrovirus[4], el cual fue llamado inicialmente virus asociado a linfadenopatía (VAL). Dicho virus demostró ser el agente etiológico del SIDA, el virus de Inmunodeficiencia humana (VIH)





## 1.2 Epidemiología del VIH en México y en el Mundo.

En 1982 se reportaron 5 datos de SIDA, para el año 1984 ya se reportaban 12 mil casos a nivel mundial. Las infecciones por VIH se incrementaron en los años siguientes a su descubrimiento alcanzando su máximo en 1997, con 3.5 millones de nuevas infecciones por el VIH. Mientras que el número de personas que mueren por causas relacionadas con el SIDA alcanzaron un máximo en el año 2005 con una cifra de 2.2 millones de muertes, (Figura 1).[5]

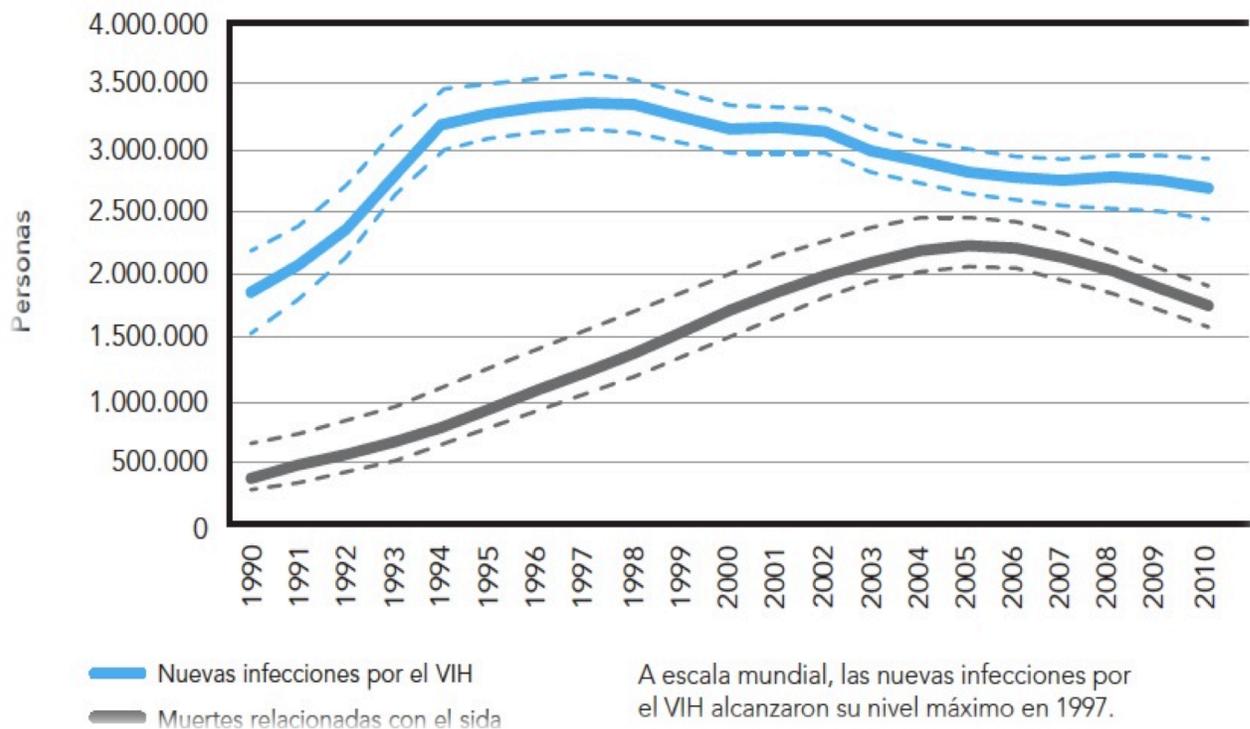


Figura 1. Infecciones por el VIH y muertes relacionadas al SIDA.





Para el 2010 el panorama mejora, sin embargo la mortalidad<sup>1</sup> y morbilidad<sup>2</sup> siguen manejando cifras exorbitantes. A nivel mundial las nuevas infecciones anuales por el VIH fueron de 2.3 millones en 2012 , ésta cifra ha sido la mas baja desde los 90s; así como las muertes por causas relacionadas con el SIDA disminuyó de 2.3 millones en 2005 a 1.6 millones de muertes en 2012 [6].

Este avance se ha logrado en los últimos años debido en gran parte al acceso al tratamiento antirretroviral, ya que en 2013 la OMS modificó sus directrices para establecer la recomendación de comenzar el tratamiento de manera inmediata, de esta forma en el año 2013 aproximadamente 28.6 millones de personas tuvieron acceso a tratamiento antirretroviral [5].

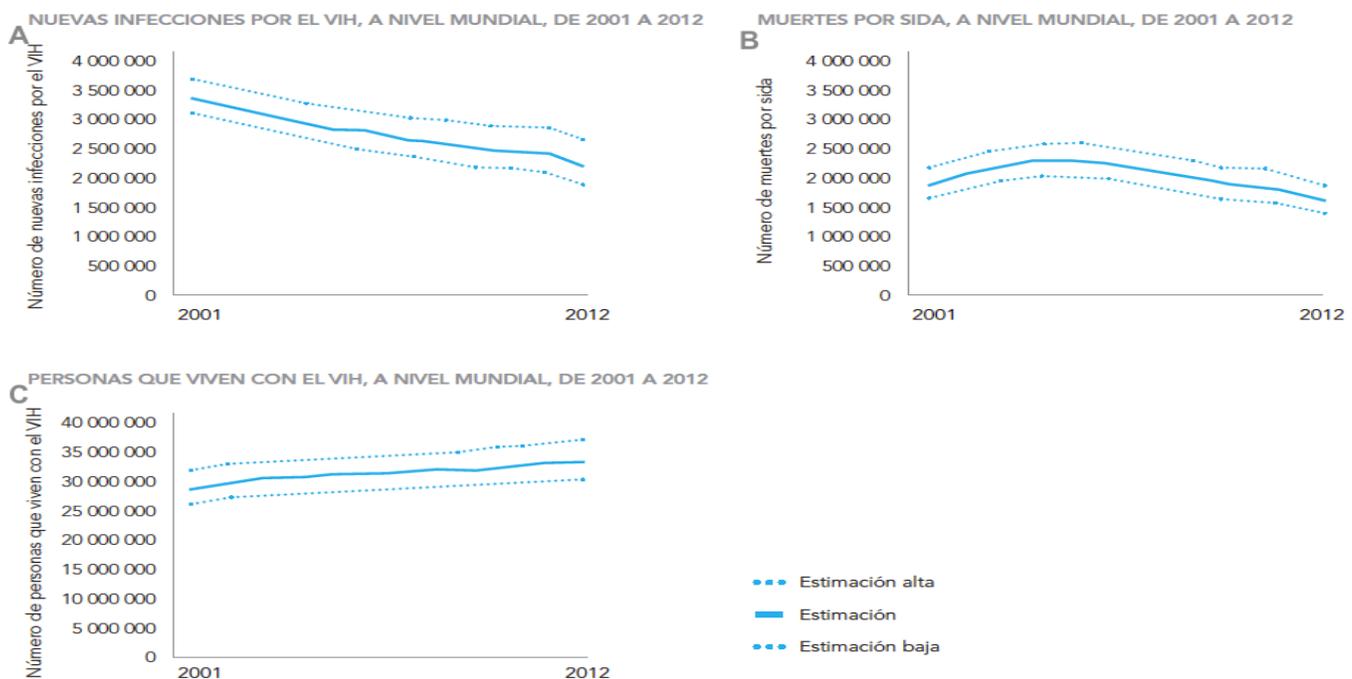


Figura 2. Adultos y niños que viven con VIH, 2012.

<sup>1</sup> Mortalidad. La tasa de mortalidad se define como la proporción de personas con una característica en específico que fallecen con respecto al total de la población.

<sup>2</sup> Morbilidad. Es la proporción de personas que se enferman en un sitio o tiempo determinado.





---

---

*En la Figura 2 se muestran gráficos de datos a nivel mundial correspondientes a A) nuevas infecciones por el VIH. B) muertes por causa de SIDA y C) personas que viven con el VIH. (Modificado de [7])*

En México, los datos proporcionados por CENSIDA en 2013, afirman que se han registrado cerca de 9 mil nuevos casos, de los cuales aproximadamente 50% fueron diagnosticados en fase de SIDA. Esto, sumado a las infecciones ya diagnosticadas desde 1983, da un total de 167,933 casos, de las cuales el 17.2% de los casos corresponde a mujeres y el 82% a hombres, es decir, desde el inicio de la epidemia se ha infectado una mujer por cada 5 hombres aproximadamente [8].

La tendencia epidemiológica del VIH se puede estudiar a partir de diferentes estratos poblacionales, uno de ellos es por distribución geográfica. Donde, de los 167 mil casos de personas infectadas con VIH, el 15.4 % se localiza en el Distrito Federal; el 10.5% en el Estado de México; mientras que en 1986 se registran los primeros casos de SIDA en localidades rurales, razón por la cual en el Estado de Veracruz se encuentran localizados un 9.1% de los casos infectados con VIH. Estos son los tres estados con mayor número de casos, seguidos por Jalisco (7.5%), Chiapas (4.7%), Guerrero (4.6%) [8].

La edad es otro factor importante en el estudio del comportamiento de la epidemia por VIH. La edad a la cual predomina la infección por VIH es de 20 a 44 años aproximadamente, según los datos informados por CENSIDA 2012,[8].

### 1.3 Biología del VIH

El Virus de Inmunodeficiencia Humana pertenece al género de los Lentivirus, quienes pertenecen a la familia Retroviridae. Siendo un lentivirus tiene un





---

---

periodo de incubación muy largo que desemboca en SIDA después de varios años.

El VIH tiene una estructura esférica, con diámetro de 120nm aproximadamente y está compuesto de dos copias de ARN de cadena sencilla el cual se describe a continuación.

### 1.3.1 Genoma.

El genoma del VIH es un homodímero, es decir, consta de dos cadenas idénticas de ARN de cadena sencilla y de sentido positivo, lo cual hace que el virus sea funcionalmente diploide. Cada cadena tiene un tamaño de 10kb aproximadamente y se encuentran unidas por una región llamada DLS (dimer linkage structure) localizada en las regiones 5´ terminal de cada homodímero [9].

Cada homodímero contiene una estructura (m<sup>7</sup>G5´ppp5´G<sub>m</sub>p) en el extremo 5´ llamada cap; inmediatamente después se encuentra la secuencia corta R (llamada así, por ser una secuencia "Repetida" a lo largo de la cadena de ARN). Río abajo (downstream) de 5´R se encuentra otra secuencia llamada U5 por ser una secuencia "Única 5´", ésta región U5 incluye uno de los sitios "att" (at the termini) requeridos para la integración proviral, ya que éstos sitios son reconocidos por la proteína viral Integrasa [9].

A continuación se encuentra el primer sitio de unión (pbs) de 18 nucleótidos, en el cual se hibrida un tARN del hospedero, para sintetizar la cadena negativa de DNA. En seguida se encuentra una secuencia muy importante, siendo la mayor señal con la que se lleva a cabo la encapsidación del ARN viral a la partícula viral, ésta secuencia es llamada psi  $\Psi$  [9].





---

---

El segmento siguiente es donde se codifican proteínas estructurales y enzimas requeridas para una infección productiva. Estas proteínas son codificadas en diferentes marcos abiertos de lectura (ORF, por sus siglas en inglés), tres de éstos dan origen a tres poliproteínas precursoras, las cuales son escindidas por proteasas[10]. En el DNA proviral se encuentra otra región llamada 3´-LTR (Long Terminal Repeat) que sobrelapa con la proteína viral Nef [11].

De manera que, solo son tres los genes que ocupan casi todo el espacio central del genoma, en el orden de 5´ a 3´ aparece el gen *gag*(grupo antígeno específico), *pol* (polimerasa), y *env* (envoltura) [9].

Rio abajo de los genes *gag*, *pol* y *env*, se encuentra un bloque de al menos nueve residuos A y G llamado "ppt" (polipurinas), éste sitio es el lugar de iniciación de la cadena positiva de DNA. El ppt es seguido por una secuencia corta llamada U3 (secuencia única 3´), en esta región se encuentra uno de los sitios requeridos para la integración de DNA. Junto a U3 se encuentra la copia 3´ de la región R, la cual es seguida por la cola de poli (A).

### 1.3.2 Proteínas.

El genoma del VIH codifica los genes *gag*, *pol* y *env*, quienes dan origen a poliproteínas precursoras[12]. El precursor Gag de 55kd (Pr55<sup>Gag</sup>) se escinde para dar origen a las proteínas matriz (MA), capsida (CA), nucleocapsida (NC), y la proteína p6 [10, 12].

La auto-catálisis del precursor Gag-Pol de 160kd (Pr160<sup>Gag-Pol</sup>) da origen a la proteína proteasa (PR), a la retro-transcriptasa heterodimérica (RT), y a la integrasa (IN) [10, 12].





---

---

Mientras que la digestión proteolítica por enzimas celulares, convierten al precursor Env de 160kd (gp160) en: glicoproteína de superficie gp120 (SU) y glicoproteína transmembranal gp 41 (TM) [10, 12].

El genoma del VIH codifica las proteínas accesorias: Vif, Vpr, Tat, Rev, Vpu y Nef. [12] Dichas proteínas son productos del empalmado (splicing) alternativo del transcrito primario, es decir, no se originan a partir de una poliproteína precursora.[10]. En la Figura 3 se muestran las diferentes proteínas que constituyen la estructura del VIH maduro.

### 1.3.1 Ciclo de replicación

La entrada del VIH-1 a su célula blanco es mediada por las glicoproteínas de envoltura gp120 y gp41(Figura 3). Gp41 tiene una estructura trimérica y de forma cilíndrica [13]. El trímero consta de seis alfa hélices. Las hélices N-terminal de cada subunidad, forman una estructura paralela de hélices enrolladas en el interior del complejo, dicha estructura es formada gracias a HR1 (heptadas repetidas<sup>3</sup>[14], por sus iniciales en ingles). Las hélices C-terminal se localizan en el exterior del complejo, en éstas hélices se encuentra HR2 [13].

---

<sup>3</sup> Las hélices super-enrolladas generalmente poseen un patrón repetido de aminoácidos llamada heptada repetida denominada *abcdefg*, donde las posiciones *a* y *g* son típicamente ocupados por aminoácidos hidrofóbicos, mientras que las posiciones *e* y *f* son aminoácidos polares o cargados.



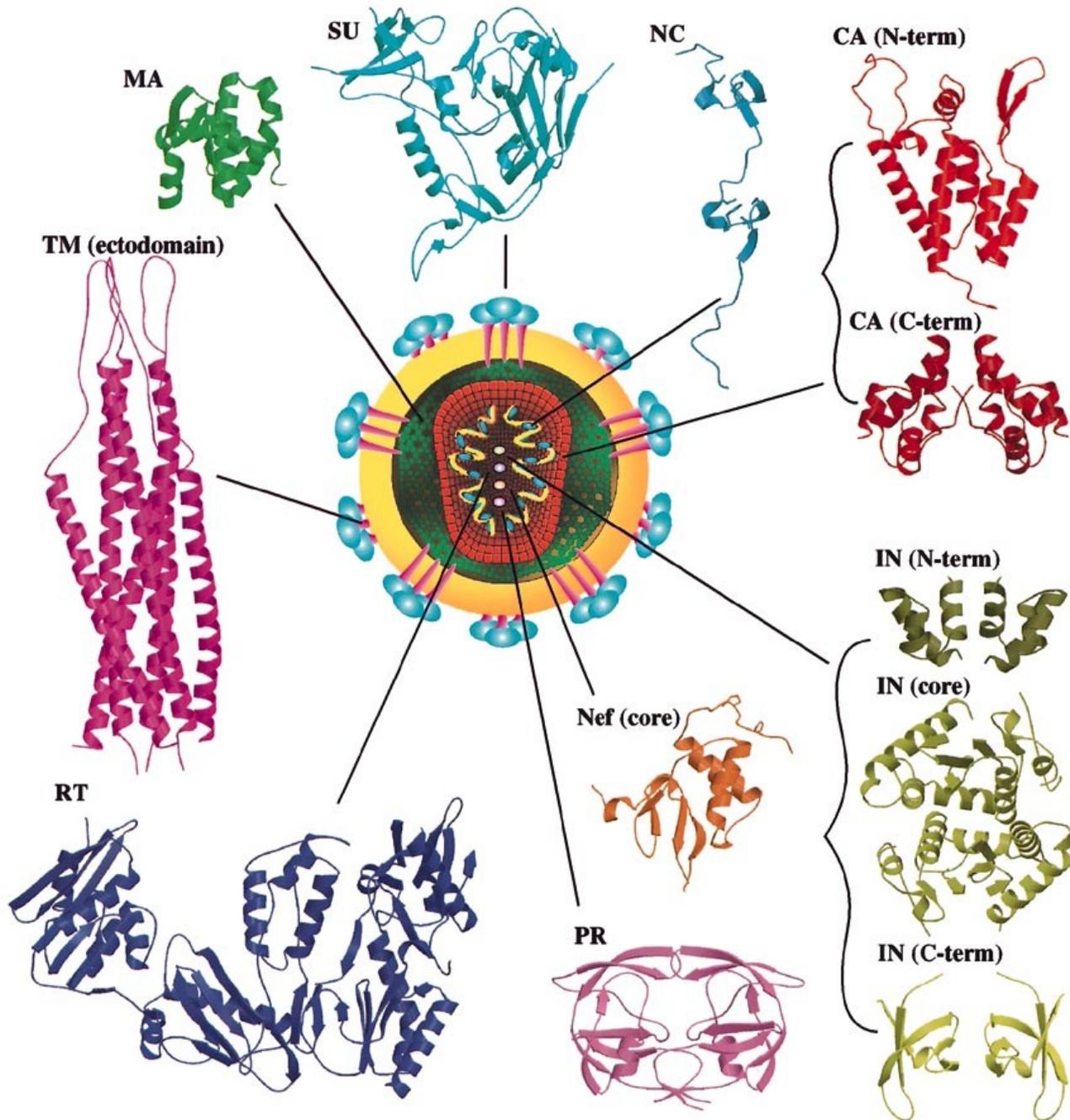


Figura 3. Estructura de VIH, modificación de [15].

Se ilustran las estructuras de las proteínas que conforman un virion de HIV-1 maduro. SU (gp120), TM (gp 41), MA (matriz), CA (cápside), NC (nucleocápside), IN (integrasa), PR (proteasa), RT (retrotranscriptasa).



---

---

Gp41 forma un complejo con gp120 uniéndose, específicamente, a los bucles expuestos del trímero de gp41. Gp120 consta de dos principales dominios: el dominio "interior", que contiene dos  $\alpha$ -helices, 5  $\beta$ -plegadas y varios bucles; el dominio "exterior", que contiene 6  $\beta$ -plegadas rodeando a una  $\alpha$ -helice, y otras 7  $\beta$ -plegadas [15]. A lo largo de la estructura de gp120 se encuentran 5 dominios variables (V1 a V5), los primeros cuatro dominios variables forman loops anclados por puentes disulfuro formados por residuos Cys altamente conservados [16].

A su vez, gp120 interacciona con CD4 (Figura 4, punto 1), el cual es un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas, tiene un peso de 55kD y es el mejor receptor celular que tiene el VIH-1. Sin embargo, para llevar a cabo la fusión y entrada del virus, son necesarios dos correceptores principales e indispensables en la infección de VIH-1. Dichos correceptores tienen como función celular, ser receptores para quimocinas: CXCR4 y CCR5. La afinidad para cada correceptor depende de la secuencia en la tercera variable (V3) de gp120[17]. Al entrar al organismo, el virus depende de su tropismo<sup>4</sup>[18], para definir el tipo de célula que infectará en la etapa inicial de la infección. Los virus que utilizan el correceptor CCR5, por lo regular lo utilizan a lo largo de la infección, mientras que los virus que utilizan CXCR4 generalmente emergen en el 50% de los individuos al final de la infección[19, 20].

Al unirse CD4 con gp120, se induce un cambio conformacional en gp120, de manera tal que mejora la interacción con el receptor de quimiocinas (Figura 4, punto 2) [15], formando así el complejo CD4-coreceptor-gp120, lo cual lleva a la disociación entre gp41 y gp120. Tras ésta disociación, gp41 sufre un

---

<sup>4</sup> Se refiere a la capacidad del virus para establecer infección en distintos tipos de células CD4+, lo cual depende del uso de un correceptor.



cambio conformacional, permitiendo que los péptidos de fusión N-terminal hagan contacto y se inserten en la membrana celular[13]. La horquilla que se forma a continuación, promueve la fusión de las membranas, seguido por la liberación de los núcleos virales dentro de la célula (Figura 4, punto 3).[21]

Una vez dentro de la célula, el núcleo viral pierde su recubrimiento, liberando así, el complejo de transcripción reversa, el cual comprende: el genoma de RNA diploide, el iniciador  $tRNA^{Lys}$ , RT, IN, MA, NC y Vpr (Figura 4, punto 4). El complejo interactúa con microfilamentos de actina, gracias a la fosforilación de la proteína MA, mediada por MAPK (mitogen activated protein kinase, por su siglas en inglés). Ésta interacción es necesaria para que se lleve a cabo la transcripción inversa (Figura 4, punto 5).

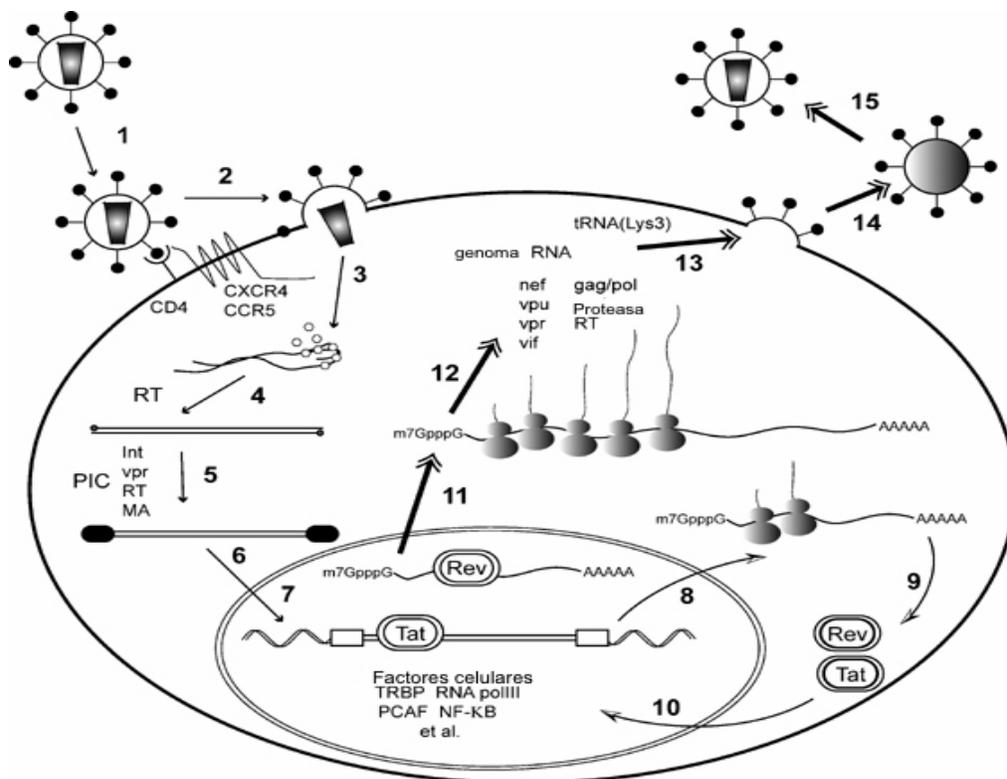


Figura 4. Ciclo de replicación de VIH. Modificación de [22]

Flechas pequeñas indican la entrada viral e integración de la replicación. Flechas curvas indican la etapa temprana de la replicación. Flechas de doble punta indica la etapa tardía de la replicación.



---

---

La transcriptasa inversa (Figura 3), es una enzima multifuncional constituida por un heterodímero que consiste en las subunidades p55 y p66 [23]. Contiene una ADN polimerasa que puede copiar a partir de un ARN o ADN, para formar una cadena negativa de ADN<sup>5</sup> [24] y para sintetizar la cadena positiva de ADN, respectivamente. También contiene una RNasa H, para la degradación de ARN tanto del híbrido ADN-ARN, así como el cebador tARN [10, 23].

Posterior a la formación del ADN viral de doble cadena, se lleva a cabo la inserción de éste al genoma celular (Figura 4, punto 7). Esta acción es catalizada por la Integrasa viral (IN) (Figura 3), una proteína de 32Kd.

La actividad de la IN sigue una serie de pasos: (a) remueve dos nucleótidos de los extremos 3' de las secuencias "att" localizadas dentro de las regiones U3 y U5 respectivamente, dejando un "hueco" de la forma 3'CA, y por tanto, dos nucleótidos sobresalidos en los extremos 5' de cada hebra de ADN viral; (b) después de la migración al núcleo, la IN liga los extremos 3' del ADN viral al ADN celular, se desconocen los sitios exactos en los cuales se inserta el provirus, sin embargo, hay estudios los cuales aseguran que se prefieren sitios donde la cromatina es más laxa para su fácil replicación. Ésta ligación deja huecos vacíos entre los extremos 5' del ADN viral y los 3' del ADN celular; (c) se concluye la integración del provirus con la reparación de dichos huecos, llevando a una completa incorporación covalente del ADN proviral. [10, 15, 25]. Una vez integrado, los LTR funcionan como regulador de la síntesis del ARNm.

---

<sup>5</sup> cadena negativa de ADN, es la secuencia de cadena sencilla que es complementaria al genoma viral de ARN de un virus de cadena positiva.





---

---

En el genoma celular, el LTR 5' funciona como otra unidad transcripcional eucariota, éste contiene al iniciador<sup>6</sup>[24], a la caja TATA<sup>7</sup>[24] y a tres sitios sp1. Éstas regiones ayudan a la holoenzima<sup>8</sup> ARN polimerasa II<sup>9</sup>[24] a ensamblarse en el sitio de iniciación de la transcripción. Algunas proteínas reguladoras son procesadas co-transcripcionalmente y ayudan a la regulación de dicha transcripción, por ellos son llamadas proteínas reguladoras de la transcripción (Tat y Rev) (Figura 4, punto 10).

Los ARNm son traducidos ya sea en ribosomas libres o en ribosomas asociados a retículo endoplásmico, en el caso de las glicoproteínas y una vez terminada la traducción, todos los componentes del virión son ensamblados. La proteína precursora gag-pol se asocia a la membrana celular, éste proceso esta dirigida por la proteína Matriz (MA) (Figura 4, punto 12).

Como se mencionó anteriormente la poliproteína gag, una vez escindida da lugar a las proteínas estructurales MA, CA, NC y p6. Una de las principales

---

<sup>6</sup> El iniciador, también llamado Inr (Initiator), está localizado entre las posiciones -3 y +5, se puede describir de manera general Py<sub>2</sub> CA Py<sub>5</sub>. Debido que el Inr tiene pirimidinas (y) a los costados de CA.

<sup>7</sup> La secuencia llamada "caja TATA" esta localizada regularmente a 25 pb aprox. arriba del punto de inicio y tiene una secuencia consenso de -TATAA-.

<sup>8</sup> Holoenzima es un enzima que está compuesta por una proteína (apoenzima), y un cofactor que puede ser un ión o una molécula orgánica. En resumen, es una enzima completa y activa catalíticamente.

<sup>9</sup> ARN polimerasa II, cataliza la transcripción de ADN a ARN mensajero, está localizada en nucleo-plasma, tiene 12 subunidades y son agregados de más de 500Kd. El dominio C terminal (CTD) es la subunidad más grande, y consiste en multiples repetidos (de 26 a 50 repetidos aprox.) de secuencias consenso de 7 aminoácidos .





---

---

funciones de la nucleocápside (NC) o P7 (Figura 3), es la encapsidación del ARN genómico dentro de los viriones maduros. El reconocimiento del genoma del VIH ocurre mediante la interacción de la NC y una secuencia de aproximadamente 120 nucleótidos, localizada entre el LTR 5' y el codón de iniciación de Gag. Ésta secuencia es conocida como elemento de encapsidación sitio  $\Psi$ .

La glicoproteína Env es sintetizada de un ARNm bicistrónico<sup>10</sup>[24] Vpu/Env. La glicoproteína precursora Env o gp160, se traduce en ribosomas asociados a Reticulo Endoplásmico (RE), donde es glicosilada. En seguida es transportada al aparato de Golgi, donde gp160 es proteolíticamente escindida por enzimas celulares, dando lugar a las glicoproteínas maduras gp120 y gp41, (también llamadas SU y TM, respectivamente [10]. Una vez maduras, gp120 y gp41 forman una asociación no covalente necesaria para su transporte a la superficie celular en vesículas secretorias. El mecanismo por el cual las proteínas de envoltura son incorporadas al nuevo virión aun no está completamente caracterizado, pero hay hipótesis de que se debe a una interacción con MA [10].

Además de las proteínas estructurales, de las enzimas y de las proteínas reguladoras, el genoma del VIH-1 codifica diversas proteínas accesorias: Vif, Vpu, Vpr y Nef, llamadas así por que el virus puede ser cultivado en laboratorio en ausencia de éstas. El factor de infectividad viral "Vif" interactúa con factores del hospedero durante el ensamblaje del virión, favoreciendo, como su nombre lo dice, la infectividad viral. El factor del hospedero en cuestión es identificado como el ADN citosina deaminasa APOBEC3G.

---

<sup>10</sup> Las secuencias policistrónicas son aquellas que codifican para dos o más proteínas, es decir, un único ARNm se transcribe a partir de un grupo de genes adyacentes





---

---

Vpr es una proteína de 96 aminoácidos que está incorporada en altos niveles dentro de las partículas virales. Se han reportado diferentes funciones: a) estimula la expresión génica manejado por LTR y mejora la transcripción de genes celulares; b) promueve el transporte del PIC (complejo de preintegración) al núcleo; c) detiene a las células infectadas en la fase G2 del ciclo celular; d) induce apoptosis; y e) modula la tasa de mutación durante la transcripción reversa a través de la interacción con el enzima uracil ADN glicosidasa.

La proteína del Virus "u" (Vpu) es una proteína relativamente pequeña, multimérica, de 81 aminoácidos, es una proteína helicoidal de membrana. Tiene una hélice trans-membranal y dos hélices cortas, anfipáticas<sup>11</sup>, que residen en el plano de la membrana como componentes de su dominio citoplásmico [26].

La molécula viral Nef, es una proteína de 206 aminoácidos con el extremo N terminal miristolada [27], se encuentra en citoplasma y predominantemente asociada con la membrana plasmática. Las funciones que se le adjuntan son: a) regular negativamente la expresión de CD4<sup>12</sup> de superficie; b) modular la activación de células T; c) y mejorar la tasa de crecimiento viral e infectividad [10, 28].

---

<sup>11</sup> Una molécula anfipática es aquella que posee un extremo hidrofílico y otro hidrofóbico.

<sup>12</sup> CD4 es el principal receptor viral en células T y del complejo principal de histocompatibilidad I (MHC I)





---

---

## 1.4 Historia natural de la infección.

A la serie de cambios y procesos fisiológicos que ocurren en una persona afectada sin tratamiento antirretroviral, se le denomina historia natural de la infección. Se divide en tres etapas: aguda, crónica y SIDA. Cada una de estas etapas se define por la cantidad de células T CD4+ y carga viral.

### 1.4.1 Infección aguda.

La infección aguda se define como el lapso desde la primoinfección de un virus fundador hasta el desarrollo de la respuesta de anticuerpos [29] (Figura 5). La mayoría de los casos de infección de VIH en el mundo, son resultado de transmisión sexual, sin embargo, la transmisión parenteral o transmisión de madre a hijo son bastante comunes [30]. A partir de la transmisión del virus, hasta la detección de la primer copia de ARN viral en plasma, transcurre un periodo de 10 días aproximadamente, conocida como fase eclipse [31, 32].

Al final de la fase eclipse, en un periodo que va del día 10 al día 30 aproximadamente, se presentan diversos sucesos que dan lugar al "pico de la viremia" (Figura 5). Al inicio de éste periodo, el virus o células infectadas por el virus llegan a la circulación linfática gracias a las células dendríticas CD, que a través de una lectina tipo C (DC-SIGN<sup>13[33]</sup>), unen e internalizan al virus dirigiéndolo hasta las células T activadas [34, 35].

---

<sup>13</sup> DC-SIGN es una integrina no específica para células dendríticas y que une a ICAM3. Actúa como un receptor de reconocimiento de patógenos expresado en la superficie de las células dendríticas inmaduras y participa en la iniciación de la respuesta inmune primaria





---

---

El VIH se replica óptimamente en células T CD4+ de memoria, células que son abundantes en el tejido linfoide asociado a intestino (GALT<sup>14</sup>, por sus siglas en inglés)[36], de manera que la infección masiva ocurre en el GALT[37], donde del 30 al 60% de células T CD4+ se convierten en células productivamente infectadas, y la mayoría de éstas mueren dentro de los siguientes 4 días.[38] Así alcanzan valores de replicación aproximados de  $10^{6-7}$  copias de ARN/ml en plasma (“pico de la viremia”).

Al mismo tiempo, se establece un reservorio de células T CD4+ de memoria arrestadas, infectadas con VIH, permitiendo la integración de provirus y una replicación competente. Sin embargo, éste reservorio latente no es transcripcionalmente activo, así que están protegidos del efecto de terapia antirretroviral y del ataque del sistema inmunológico.[30, 39]

A partir del día 30 hasta la semana 20 aproximadamente, la carga viral se reduce a un valor mínimo denominado “set point” (Figura 5) [34] de ~30,000 copias de ARN viral/ml[30, 40]. Él valor del set point resulta de un balance entre la replicación viral y la respuesta inmune[34].

---

<sup>14</sup> GALT, se compone de tejido linfoide organizado (placas de Peyer y folículos linfoides solitarios), así como un gran número de linfocitos T de memoria activados difusamente distribuidos a lo largo tanto de la lámina propia del intestino y del epitelio.



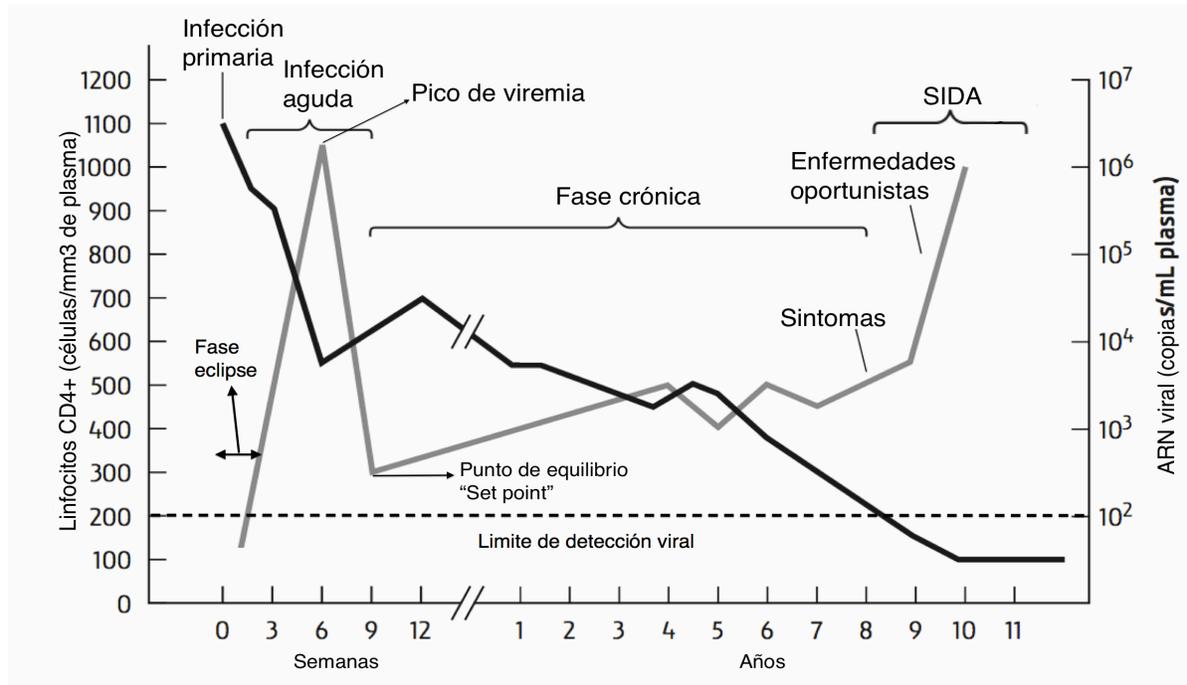


Figura 5. Historia Natural de la infección del VIH-1. Modificado de [41]

La gráfica correspondiente a los linfocitos CD4+ se ilustra con una línea negra, mientras que la carga viral se ilustra con una línea gris.

#### 1.4.2 Infección crónica

Desde la determinación del "set point", hasta la aparición de enfermedades clínicamente sintomáticas (Figura 5), se establece un estado virológico cuasiestable (1-100,000 copias/ml [42]) conocido como fase crónica de la infección[30]. Éste periodo es bastante prolongado y es caracterizado por ser clínicamente asintomático [43]. Durante este lapso, sigue activa tanto la replicación viral, como la destrucción de células T CD4+[37, 44]. Sin embargo, aunque las células T CD4+ se pierden en promedio de 30 a 60 células/ml/año, la cantidad de células T CD4+ puede permanecer estable por varios años.

#### 1.4.3 Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida SIDA.





---

---

En el momento en que la cantidad de células T CD4+ es menor a 200 células/ml, comienzan a observarse síntomas relacionados con infecciones oportunistas. A éste periodo de inmunodeficiencia se le conoce como SIDA, Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (Figura 5). Es llamado síndrome debido a que la etapa final de la enfermedad se manifiesta con una gran variedad de síntomas [44].

En ésta fase, también se observa una elevación considerable y progresiva de la carga viral en plasma, considerando que el tiempo de ciclo de replicación es en promedio 1-2 días [42]. Entre las infecciones oportunistas más comunes se encuentran: candidiasis oral, tuberculosis, varicela zoster, reactivación de herpes simple, etc. Cuando la cantidad de células CD4+ es menor a 50 células/ml, aparecen infecciones indicativas de una profunda depleción de células inmunes, como: reactivación de citomegalovirus (CMV), cryptosporidiosis, leucoencefalopatía multifocal progresiva [30, 42].

El tiempo promedio desde la seroconversión hasta la muerte en ausencia de tratamiento antirretroviral, es de 9.8 años, mientras que la expectativa de vida a partir del desarrollo de SIDA es de aproximadamente 9 meses. Sin embargo éste tiempo es ampliamente variable, ya que depende de múltiples factores virológicos, inmunológicos y genéticos. Además la terapia antirretroviral ha cambiado radicalmente la progresión de la enfermedad [45, 46].

### 1.5 Respuesta Inmunológica contra el VIH

Las barreras físicas tales como la piel, las secreciones mucosas, el ácido gástrico, y el efecto antagonista de la microbiota natural, son la primer línea de defensa ante alguna infección, se consideran componentes de la inmunidad innata [41]. Una vez que el VIH cruza las barreras físicas, el sistema





---

---

inmunológico comienza una ávida y tenaz pelea de defensa contra el virus. En éste intento, se ven involucrados diversos factores celulares y humorales, de la inmunidad innata y adaptativa.

#### 1.5.1 Respuesta Inmune innata celular.

Las células de la respuesta innata son las primeras en actuar en defensa del organismo. Entre ellas se encuentran las células NK (por sus siglas en ingles, Natural Killer), monocitos y células dendríticas.

Los componentes de la inmunidad innata reconocen estructuras características de patógenos, denominados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Éstos son reconocidos mediante receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), los cuales están presentes en la superficie celular, en vesículas endosómicas, y en el citoplasma.[47]

##### 1.5.1.1 Toll-like receptor.

Los principales PRRs son una familia denominada TLRs (Toll-like receptors, por sus siglas en ingles). Hay 11 tipos de TLRs diferentes, desde TLR-1 hasta TLR-11. Cada TLR está compuesto en su parte extracelular, por motivos ricos en cisteína seguido por repeticiones ricas en leucina, mientras que en la parte citoplásmica se encuentra un dominio TIR (Toll/IL-1 receptor, por sus siglas en inglés) (Figura 6). Éstos dominios TIR también se encuentran en las colas citoplásmicas de los receptores de las citosinas IL-1 e IL-18 logrando desencadenar una cascada de señalización similar, la cual desemboca en la producción de citocinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL.12); Quimiocinas (IL-8, RANTES); moléculas de adhesión endotelial (E-selectina); moléculas coestimuladoras (CD80, CD86); citocinas antivirales (IFN- $\alpha/\beta$ ), entre otras [47].



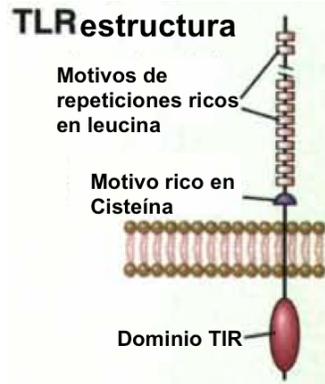


Figura 6. Estructura de TLR. Modificación de [47]

Los TLR1, 2, 4, 5, 6 y 11, se expresan en la superficie celular y reconocen principalmente componentes de la membrana microbiana. TLR4 por su lado, forma un complejo con MD2 y juntos sirven como el principal componente de unión de LPS [48]. TLR2 forma heterodímeros con TLR1 reconociendo péptidos triacilados, o con TLR6 reconociendo lipopéptidos diacilados. TLR5 reconoce la proteína flagelina, receptor presente en alta expresión en células dendríticas.

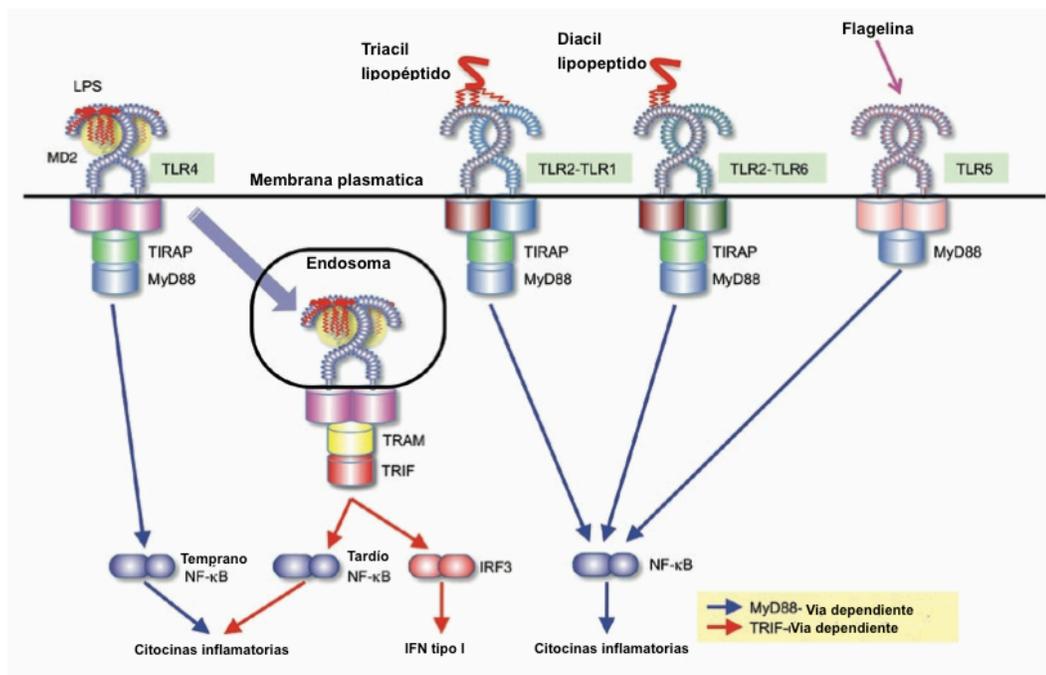


Figura 7. Reconocimiento de PAMPs por TLR de superficie, modificado de [49]



Mientras que los TLR3, 7, 8 y 9, se expresan en vesículas intracelulares donde se reconocen ácidos nucleicos microbianos. TLR3 reconoce ARN de doble cadena como el policitidil-poliinositol (poly(I:C))[50]. TLR7 reconoce derivados de imidazoquinolina como imiquimod, y ARN de cadena sencilla, se expresa en pDCs [51]. TLR8 reconoce el ARN de cadena sencilla [49, 52] y es muy parecido a TLR7. TLR9 reconoce CpGs, motivos de ADN que son frecuentes en bacterias y virus, y raros en células de mamíferos, se expresan en CDs[51]. Éstos TLR se encuentran en RE y son llevadas al endolisosoma después de la infección viral.

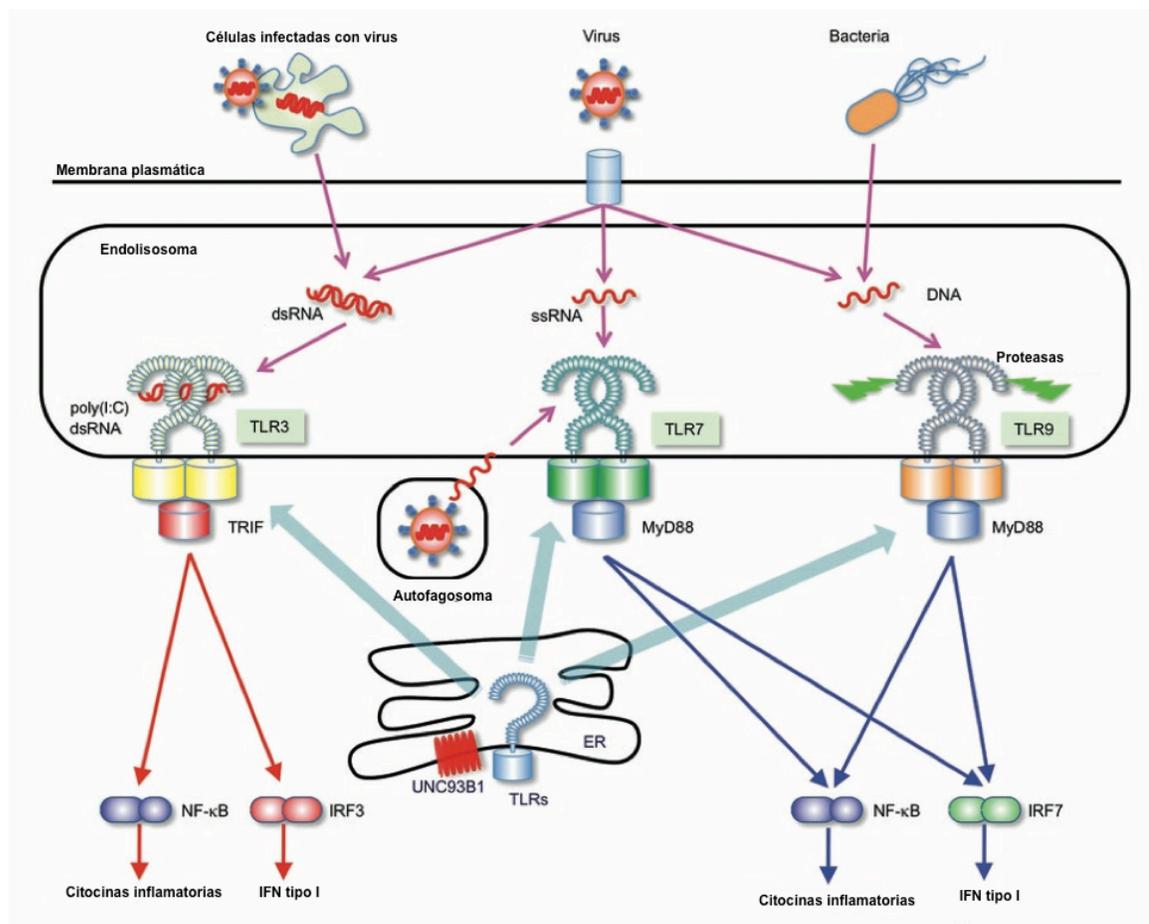


Figura 8. Reconocimiento de PAMPs por TLRs intracelulares, modificado de [49]

### 1.5.1.2 Monocitos.





---

---

Los **monocitos** CD14+ son leucocitos circulantes que son recluidos en tejidos, son precursores de células presentadoras de antígeno (CPA): macrófagos y células dendríticas [53, 54]. Tienen como función principal la fagocitosis de partículas patógenas. Se activan por productos microbianos como el LPS y por el IFN- $\gamma$  (producido por las NK). Dicha activación lleva a la producción de TNF (factor de necrosis tumoral), IL-1 e IL-12, las cuales llevan a una respuesta inflamatoria; además de ROS (especies reactivas de oxígeno) y Oxido nítrico, lo cual lleva a la eliminación del patógeno fagocitado. Se ha visto que los virus R5, que utilizan el correceptor CCR5, son dominantes en la fase aguda de la infección [18].

Por otro lado, los macrófagos se consideran muy resistentes al efecto citopático del VIH-1, de manera que sobreviven mas tiempo para continuar produciendo más VIH-1. De manera que, el daño masivo a los macrófagos puede ser el factor clave de última instancia, que permite el cruce de la infección viral, correlacionado con la progresión a SIDA [53].

#### 1.5.1.3 Celulas Natural Killer.

Las **células NK** se definen como linfocitos CD3-CD56+[55]. Son un linaje celular capaz de reconocer células infectadas o estresadas[47], al encontrarlas se encargan de asesinarlas reconociendo las moléculas del MHC de clase I [56]. Las células NK son expandidas y activadas en los primeros días de infección por HIV-1. Se activan por citocinas de la inmunidad innata como IL-15 e IL-2, la IL-2 es producida por macrófagos y captada por las células NK, éstas a su vez secretan IFN- $\gamma$ , el cual activa a macrófagos para eliminar al virus fagocitado [47].





---

---

#### 1.5.1.4 Células dendríticas.

Las **células dendríticas (CDs)** inmaduras inician su papel protector del sistema inmune innato, detectando microorganismos mediante estructuras microbianas conservadas. Una vez que tienen contacto con un antígeno, se activan como células dendríticas maduras, y se convierten en excelentes CPAs, de esta forma migran hacia nódulos linfáticos con la finalidad de activar a células T CD4+. El VIH-1 también infecta a CDs, sin embargo, se ha demostrado que en presencia de las proteínas virales, Nef y Matriz, las CDs plasmacitoides<sup>15</sup> adquieren un fenotipo migratorio inmaduro, disminuyendo la expresión tanto de las moléculas de MCH clase I y II, como de las moléculas coestimuladoras CD80-CD86, facilitando así el tránsito a nodos linfáticos, y obteniendo protección ante la respuesta inmune [57, 58]. En contraste, se ha descrito que después de la replicación viral, las CDs son capaces de detectar intracelularmente a las proteínas de la cápside, cuya unión con la proteína CypA (1.3.2 más atrás), facilita la transcripción del factor regulador de interferón 3 (IRF3), promoviendo así, la activación de las CDs [59] y producción de interferón tipo 1 (IFN-1), el cual tiene una potente actividad antiviral [47, 60].

#### 1.5.2 Respuesta inmune adaptativa

Las células que están involucradas en el sistema inmune adaptativo, son linfocitos antígeno-específico, son responsables de la especificidad y memoria, características de la inmunidad adaptativa. Hay diferentes subtipos de

---

<sup>15</sup> Las células dendríticas plasmacitoides son un subtipo de células dendríticas, presentes en sangre periférica y órganos linfoides.





---

---

linfocitos, los cuales difieren en sus funciones y en sus proteínas producidas, pero morfológicamente son muy similares: linfocitos T, linfocitos B [47].

#### 1.5.2.1 Linfocitos T CD8+.

Los linfocitos T citotóxicos (CTL) se caracterizan por la molécula de superficie CD8, se activan mediante su receptor TCR (receptor de células T) al reconocer al antígeno en contexto de moléculas del MHC clase I, de la célula presentadora de antígeno. Los linfocitos CD8+, tienen varios mecanismos antivirales: muerte directa a células infectas mediante granzimas y perforinas; induciendo muerte celular por apoptosis vía (CD95) Fas-FasL; o mediante la producción de  $INF\gamma$  [41, 61]. La citotoxicidad de éstas células se relaciona con el establecimiento del "set point" [62]. Sin embargo, basta una sola mutación puntual situada en el epítipo para abolir el reconocimiento del CTL. La disfuncionalidad de CTLs se correlaciona con la progresión a SIDA [63]. La activación de los CTLs, conducen a la liberación de factores solubles como:  $\beta$  quimiocinas (RANTES),  $MIP1\alpha$  (proteína inflamatoria de macrófagos  $1\alpha$ ) , y  $MIP1\beta$ . Éstas quimiocinas impiden la entrada del virus por competencia al correceptor CCR5 y, promoviendo su internalización [41].

#### 1.5.2.2 Linfocitos T CD4+.

Los linfocitos T CD4+ se activan al contacto con el antígeno mediante las moléculas del MHC-II, de las CPAs. Una vez activadas, comienzan a producir IL-2 con su respectivo receptor, propiciando así su proliferación. Es entonces cuando comienza la diferenciación en: linfocitos T reguladores ( $T_{reg}$ )<sup>16</sup>, linfocitos T de memoria, y linfocitos T efectores. Éstos últimos se diferencian

---

<sup>16</sup> Los linfocitos  $T_{reg}$  desempeñan un papel fundamental, manteniendo la tolerancia en infecciones crónicas principalmente.





---

---

dependiendo de las citocinas existentes en el ambiente: en presencia de IL-12 se diferencia a linfocitos T tipo 1 ( $T_{h1}$ ), favoreciendo la inmunidad mediada por células; en presencia de IL-4 se diferencia en linfocitos T tipo 2 ( $T_{h2}$ ), favoreciendo la inmunidad humoral [41, 47].

En la infección del HIV-1, hay pérdida considerable de los linfocitos  $T_{h1}$ , por lo que disminuye progresivamente la respuesta inmune celular, cambiando a una respuesta tipo  $T_{h2}$  en la etapa más avanzada de la enfermedad. Los linfocitos  $T_{reg}$  se encuentran aumentados, esto puede ser perjudicial al suprimir la respuesta inmune virus-específica o puede ser benéfico al limitar la activación inmune [64].

### 1.5.2.3 Respuesta humoral

La activación de los linfocitos B, se realiza mediante el contacto de su receptor de células B (BCR), con el antígeno. Dicho antígeno procesado se presenta, mediante el MHC-II, a la célula T cooperadora previamente diferenciada en respuesta al antígeno mismo. Tras su estimulación, eventualmente el linfocito B llegará a ser completamente maduro, plasmático y productor de anticuerpos. [65, 66].

El VIH-1 puede inducir la lisis de células B, apoptosis masiva, y pérdida del 50% de los centros germinales dentro de los primeros 80 días de infección. Mientras tanto, a las tres semanas de infección se encuentran anticuerpos IgM específicos a la proteína viral gp41 no neutralizantes, por lo que no inducen mutaciones virales de escape. Los primeros anticuerpos que inducen mutaciones virales y que están dirigidos contra virus autólogos, aparecen ~84 días después de la infección[67].





---

---

Algunos de los anticuerpos neutralizantes se unen al complejo receptor-virus impidiendo el cambio conformacional necesario por gp41; Por su lado, gp120 es capaz de inducir anticuerpos neutralizantes y no neutralizantes[16]. Sin embargo, las mutaciones de escape por parte del virus tardan, en promedio, escasos 10 días en aparecer. Por otro lado, la inmunidad humoral se desregula provocando una paradójica hiperactividad e hiporreactividad, lo cual se refleja mediante hiperglobulinemia, plasmocitosis en medula ósea, expresión aumentada de moléculas de activación en linfocitos B y disminución en la producción de anticuerpos protectores [34, 41].

Por otro lado, existen proteínas celulares que se expresan y funcionan de manera autónoma para suprimir la replicación del virus. Son llamadas factores de restricción o factores intrínsecos de resistencia.

## 1.6 Factores celulares que restringen la replicación de VIH-1.

La disminución en la replicación viral en sus hospederos naturales, a menudo se deriva de la acción de potentes proteínas codificadas por el mismo hospedero, llamados "factores de restricción" y son importantes componentes del sistema inmune innato.

### 1.6.1 TRIM5 $\alpha$ y TRIMCyp.

TRIM5 $\alpha$  es una proteína citoplásmica de ~500 aminoácidos aproximadamente, está compuesta por los dominios RING y caja B en la parte amino terminal, el dominio central se conforma de espirales super-enrolladas, y finalmente el dominio carboxilo terminal PRYSPRY. En el dominio SPRY se encuentran segmentos hipervariables (VI-V3), quienes determinan la selección de la molécula que será reconocida. Específicamente el segmento V1, ha mostrado ser clave para el reconocimiento de la proteína cápside del VIH-1[68].





---

---

Algunas proteínas cápside se unen a la proteína chaperona CypA, mejorando la sensibilidad de VIH-1 a TRIM5 $\alpha$ . Debido a eventos de retrotransposición se genera un gen quimérico entre CypA y TRIM5 $\alpha$ , resultando una proteína de fusión TRIMCyp, con potente capacidad de inhibición ante el VIH-1[68, 69].

TRIMCypA se encuentra en estructuras dinámicas llamadas “cuerpos citoplásmicos”, al encontrar un virus son reclutadas rápidamente y dirigen su degradación proteosomal, acelerando la fragmentación de la proteína cápside, poco tiempo después de la entrada viral[70], alterando la arquitectura del complejo de retrotranscripción (CRT) y bloqueando éste último proceso [68, 71].

#### 1.6.2 Teterina.

Teterina es una proteína transmembranal tipo II de un solo paso. Tiene un anclaje a la membrana en su dominio amino terminal, y un glicofosfatidilinositol (GPI) anclado en su dominio carboxilo terminal. La parte extracelular forma una sola alfa-hélice, la cual adopta una estructura dimérica superenrollada con ayuda de enlaces disulfuro entre cisteína y cisteína de cada teterina [68].

Uno de los modelos de acción de la proteína teterina, indica que el par de dominios transmembranales se infiltran en la envoltura lipídica del virion ensamblado, mientras las dos anclas con el lípido GPI permanecen en la membrana celular. De esta forma el dímero de teterinas promueve que los virus permanezcan atrapados en la superficie de la célula infectada acumulándose en endosomas. Teterina se induce mediante interferón- $\alpha$  y hay





---

---

evidencia que sugiere que el reconocimiento de los viriones por parte de teterina no es específica [68, 72].

Sin embargo, la proteína viral Vpu es la proteína antagonista de teterina [72]. Al parecer, Vpu colocaliza y coimmunoprecipita con esta proteína, provocando su degradación proteosomal [73], también puede disminuir la expresión de teterina en la superficie celular, ya sea por retrasar su producción a través de la vía secretora o causando su internalización [68].

### 1.6.3 Familia APOBEC.

APOBEC3 es una familia de proteínas con actividad citidin deaminasa, ésta reacción resulta de la edición post sintética de los residuos de citosina, hidrolizándolos y dando lugar a residuos uracilo. De esta manera se altera la secuencia nucleotídica[70], introduciendo una base no natural. Su relación con el VIH se descubrió en el intento de comprender la función de la proteína viral Vif [68].

Todos los miembros de la familia contienen una o dos copias de un característico dominio deaminasa coordinado con zinc (el dominio Z). Consiste en cinco cadenas  $\beta$ -plegadas, con cadenas  $\alpha$ -hélice en los extremos y enlazados con bucles o loops; una constelación de tres residuos de histidinas o cisteínas coordinados a un ion  $Zn^{2+}$  y a un residuo de ácido glutámico [68].

### 1.6.4 APOBEC3G.

“Apolipoproteín B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide 3G” fue conocida como CEM15 cuando Sheehy y colaboradores descubrieron que





---

---

algunas líneas celulares (como HUT78 y CEM) que expresan actividad antiviral contra VIH-1 deficiente de Vif (VIH-1  $\Delta$ Vif) a éstas se les llamó células no permisivas. Éstas células tienen en común, la expresión del gen CEM15 cuya acción antiviral es antagonizada por Vif [74]. Este descubrimiento fue el comienzo de una gran investigación con el objetivo de entender un poco más la enfermedad que ha atacado a millones de personas. Así, los primeros ensayos *in vivo* corroboraron lo que *Sheehy* encontró, que los niveles de A3G se asocian inversamente con la viremia de VIH-1 [75].

Al igual que los demás miembros de la familia, A3G es una proteína con capacidad de desaminar, específicamente desamina citidinas del ADN de cadena sencilla[76]. Esto es posible ya que tiene dos dominios catalíticos. El dominio Z carboxi-terminal, lleva a cabo la deaminación [77]; mientras el dominio Z amino-terminal no tiene actividad catalítica. Sin embargo, está involucrado en la incorporación de APOBEC3G a viriones de VIH recién sintetizados, y es reconocido por Vif.

#### 1.6.4.1 Estructura de APOBEC3G

El locus de ésta proteína se encuentra en el cromosoma 22[78] y se caracteriza por tener, de manera intercalada, 5 cadenas  $\beta$ -plegada con 5  $\alpha$ -hélices [79], de las cuales  $\alpha_1$ ,  $\beta_3$  y  $\alpha_2$  definen el motivo de coordinación de zinc que constituye el centro catalítico. En la Figura 9, la cadena sencilla de ADN se ilustra con una línea roja punteada [70, 80]



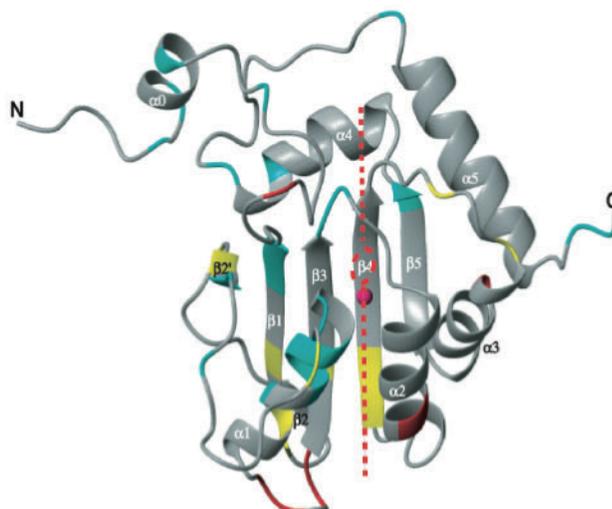


Figura 9. Estructura de A3G. Modificación de [81]

A3G forma homo multímeros, y es empaquetada como oligómero unido al ARN. Aunque dicha multimerización no parece ser indispensable pero si necesaria para mejorar la actividad catalítica y la encapsidación [82].

#### 1.6.4.2 A3G se encapsida dentro de viriones de VIH-1.

En ausencia de Vif, APOBEC3G es empaquetado dentro de los viriones de VIH-1 [83], mediante la interacción entre el dominio Z amino-terminal de A3G y la poliproteína p55<sup>Gag</sup> (esta acción es mediada por los primeros 11 aminoácidos [84] del extremo N-terminal de la proteína NC [85]); mediante la interacción con el ARN genómico del VIH-1 [86, 87]; y mediante la interacción con el 7SL ARN<sup>17</sup> [88]; incluso interactúa con balsas lipídicas [89, 90].

<sup>17</sup> Las partículas de ARN de reconocimiento de señal o 7SL ARN, son componentes de la partícula de reconocimiento de señal (SPR). Los SPR son ribonucleoproteínas conservadas que dirigen el tráfico de proteínas dentro de la célula y permiten que sean secretadas.





La incorporación de solo  $7 \pm 4$  moléculas de A3G dentro de viriones VIH-1  $\Delta Vif$ , son suficientes para inhibir la replicación viral [91] en la siguiente ronda de infección [92]. Es decir, los viriones nacientes interactúan con la membrana de otra célula, introduciendo en ella su genoma viral y con él, a las moléculas de A3G.

#### 1.6.4.3 Hipermutación viral

A3G es transferido a las células blanco mediante la subsecuente infección por los viriones de VIH-1. Una vez dentro y mediante su interacción con el complejo de transcripción inversa, A3G comienza a desaminar los residuos de cisteína, en el orden 3' - 5' [93] de la cadena sencilla de cADN [94], resultando en hipermutación viral de G por A (guanina por adenina) [95] en la cadena positiva, lo que provoca pérdida de la integridad genética viral [96]. Diversos estudios sugieren que A3G tiene cierta preferencia de desaminación por dinucleótidos de tipo 5'-CC. [97]. El dominio catalítico contiene el motivo conservado H-X-E(X)<sub>27-28</sub>-P-C-X<sub>2-4</sub>-C en el cual los residuos Histidina y Cisteína están coordinados al  $Zn^{2+}$  y el ácido glutámico está involucrado en el lanzamiento de protones durante la reacción de desaminación (Figura 10) [82, 98].

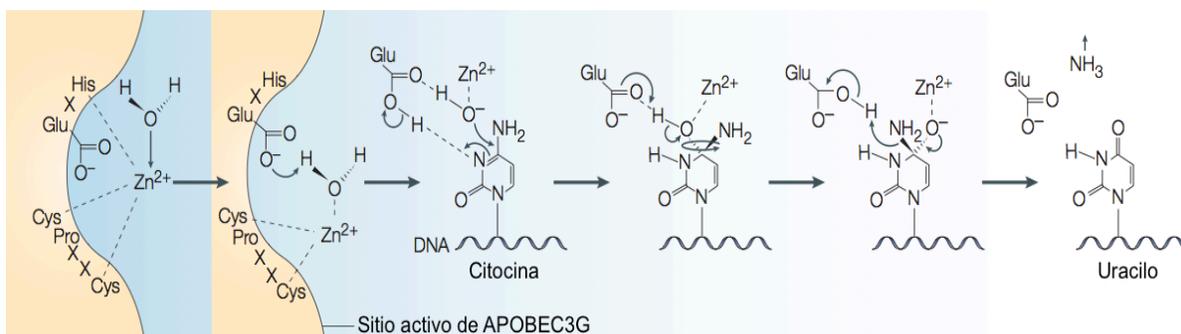


Figura 10. Mecanismo de desaminación de A3G. Modificado de [98]





---

---

El VIH-1 depende de una tasa de mutación óptima, es decir, un gran incremento en la tasa de mutación (hipermutagenesis) puede evitar una transmisión estable de material genético a generaciones sucesivas disminuyendo la adaptación viral a niveles letales. En contraste, una disminución en la tasa de mutación (hipomutagenesis) puede impedir la capacidad del virus para resistencia evolutiva ante otras fuentes de presión selectiva y, por tanto, puede ser igual de perjudicial en la adaptación viral[99]. La tasa óptima de mutación es modulada parcialmente por la mutación producida por A3G, de manera que inhibiendo a Vif o aumentando la actividad de A3G, los niveles de empaquetamiento aumentan y a su vez la tasa de mutación, desencadenando niveles letales en la adaptación viral [100].

#### 1.6.4.4 Actividad de A3G independiente de deaminasa.

La mutación, no es la única actividad de A3G, ésto se demostró con experimentos en los cuales se utilizaba mutante de A3G con el centro catalítico inactivo[70], de manera que A3G se ve involucrada en una forma de inhibición viral no enzimática. A3G tiene capacidad intrínseca para unirse al ARN y al ssADN inespecíficamente. Se une a los ácidos nucleicos del iniciador tARN<sup>Lys</sup> impidiendo físicamente la síntesis de la primera cadena de ADN, la traslocación de la transcriptasa inversa [101] a lo largo del ARN viral; impide la elongación de la transcripción inversa [102, 103]; y al unirse a componentes del complejo de preintegración PIC [104], interfiere con su integridad estructural impidiendo así, la formación de ADN proviral [105].



#### 1.6.4.5 Vif Inhibe la actividad de A3G.

Vif es un antagonista de la actividad de A3G, llevándola a su degradación proteosomal. Actúa uniéndose, a través de su región N-terminal YRHHY[106] a A3G[107], y reclutando al complejo celular ubiquitin-ligasa, el cual incluye a la proteína Cul5, elongina B<sup>18</sup>[108, 109], elongina C, RBx2, y al conjunto enzimático E2[110] (Figura 11). Para la interacción con éste complejo enzimático se requiere formar dímeros, trímeros o tetrámeros de Vif a través del sitio de multimerización de Vif, localizado en el extremo C-terminal[111]

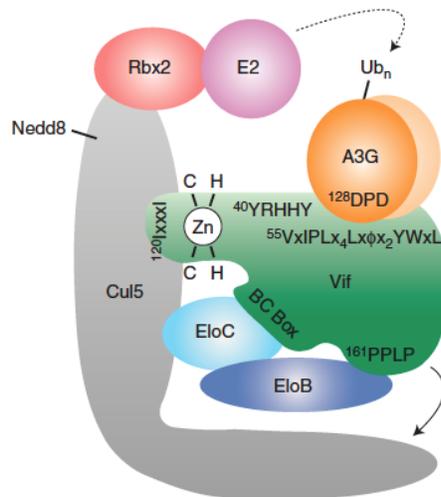


Figura 11. Componentes del complejo para la poliubiquitinación de A3G

Vif contiene un motivo altamente conservado llamado HCCH (H-X<sub>5</sub>-C-X<sub>17-18</sub>-C-X<sub>3-5</sub>-H) que interactúa con Cul5. Los dos residuos de Cisteína contenidos en éste motivo, son críticos componentes de los dominios llamados “dedos de zinc”. El motivo HCCH junto con el motivo SLQ son indispensables para el reclutamiento del complejo ubiquitin ligasa (Figura 12) [82], provocando la poliubiquitinación de A3G[112].

<sup>18</sup> Mediante el motivo de Vif PPLP se une con Elongina B



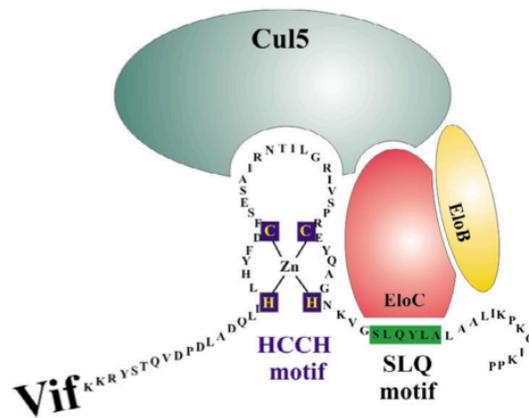


Figura 12. Motivos en Vif implicados en el ensamblaje del complejo ubiquitin ligasa.

Vif también puede contrarrestar la actividad antiviral de A3G, inhibiendo su empaquetamiento[113-115], esto es mediante la inducción de complejos multiméricos[116] de alto peso molecular (HMM, por sus siglas en inglés) de A3G [83, 100, 117], forma que resulta enzimáticamente inactiva, sin embargo, algunos investigadores afirman que incluso en esta forma, A3G puede disminuir la producción de virus[118]. De manera interesante, éstos complejos HMM pueden ser convertidos en formas enzimáticamente activas de bajo peso molecular (LMM, por sus siglas en inglés), mediante un tratamiento con ARNasa A[83, 111, 119].

El tracto de polipurinas central (cTPP) en el genoma del VIH, evita el efecto mutagénico de A3G, acortando el tiempo en que la cadena de cADN sea sencilla, limitando así la exposición de su substrato de edición.

#### 1.6.4.6 Efectos secundarios de la actividad de A3G.

Aunque con poca frecuencia, se ha detectado que A3G puede contribuir a la diversificación de secuencia o cuasiespecies[120], y evolución viral[121], ya que se han encontrado virus hipermutados en individuos infectados por VIH.





---

---

Esto se puede considerar como un beneficio viral, en contexto de escape inmune, de resistencia a fármacos[122-125]; o generando mutaciones sin sentido que resultan en la expresión de proteínas mal plegadas o truncas, quienes se presentan como nuevos epítopes a las células T citotóxicas, provocando un aumento en la paradójica activación inmune[126].

#### 1.6.4.7 Regulación de la expresión de A3G

La expresión de A3G es diferente en una célula permisiva a una no permisiva. Existen diversos factores que modulan la expresión de A3G. La presencia de VIH-1 aumenta la expresión de los TLRs [48], lo cual dispara la expresión de IFN tipo 1 (TLR 3, 4, 7, 8, 9). IFN-1, es uno de los componentes de la inmunidad innata que mejora significativamente la expresión de A3G en células T CD4+ arrestadas [127], macrófagos y células dendríticas [51]. También aumenta la cantidad de A3G LMM, mejorando así, la encapsidación [113] y por tanto la actividad antiviral.

Además, el análogo de la cadena doble de ARN poly(I:C), aumenta la expresión de A3G en células dendríticas vía INF-1 y por ende inhibe la replicación del VIH-1[128]. IL-2, IL-15 e incluso IL-7 también mejoran la expresión de A3G a través de las vías de señalización JAK y MAPK [129]. Las proteínas de la familia NFAT<sup>19</sup>[130] e IRF fungen como promotores para la regulación de la expresión de A3G.[131]

---

<sup>19</sup> Factor Nuclear de células T activadas. La familia NFAT consiste en 5 miembros NFAT1-5, todas ellas tienen un dominio de unión al ADN homólogo a la familia de factores de transcripción NF- $\kappa$ B, éste dominio contiene secuencias que son responsables de la localización nuclear





---

---

Como se mencionó anteriormente, los TLRs (1.5.1.1) son los principales PRRs, sin embargo, existen los RLRs (RIG-I-like receptor) y los NLRs (Nod-like receptors). Los RLRs se componen de tres miembros: Rig-I, Mda5 y LGP2. Mientras los NLRs se componen de 20 miembros. Todos ellos tienen en común el aumento de la expresión de A3G vía IFN-1.

La señalización de TLRs se produce mediante dos vías: la vía mediada por MyD88 (Factor de diferenciación mieloide 88, por sus siglas en inglés); y la vía mediada por TRIF (Toll interleukin-1 receptor (TIR)-domain-containing adaptor inducing INF- $\beta$ ). Al inicio se causa la activación del factor de transcripción NK- $\kappa$ B quien activa varios genes que contribuyen a reacciones inflamatorias. Más tarde causan la inducción de IFNs cuya estimulación lleva a las células a un estado antiviral[132]

## 2 ANTECEDENTES

Se han identificado sitios de hipermutación de A3G en el genoma viral de personas infectadas, lo cual indica que A3G puede escapar de la inhibición completa de Vif, esto puede deberse a, su expresión o actividad excesiva, a la variación alélica en genes de A3G[133] (aunque algunos estudios aseguran que no hay relación alguna entre polimorfismos de A3G y la progresión a SIDA[134]).

Existe una cohorte de pacientes denominada LTNPs (Long-term nonprogressor, por sus siglas en inglés), quienes son definidos como individuos infectados con VIH-1, asintomáticos, en ausencia de tratamiento antiretroviral y manteniendo una cantidad normal de células T CD4+. En diversos estudios, se ha encontrado una correlación inversa entre A3G y la progresión de la enfermedad en pacientes LTNP [135, 136] y en Progresores





---

---

típicos[75, 137]. La misma correlación inversa se encontró entre A3G y la carga viral en el "set point"[138]. En pacientes elite controladores, los cuales se definen por tener una cantidad de células T CD4 normal y una carga viral indetectable (<50copias/ml) en ausencia de terapia antirretroviral, también se observó una correlación inversa entre A3G y la progresión de la enfermedad, sin embargo no fue significativa [137].

Existen otras cohortes de personas en donde se ha buscado la importancia biológica de A3G. En el 2010, Biasin y colaboradores realizaron un estudio en la vía de activación de TLRs en individuos expuestos seronegativos, los cuales se definen como individuos que a pesar de la constante exposición al virus siguen siendo seronegativos a la infección por VIH-1. Sus datos sugieren que la estimulación de TLRs en ESN resulta en la expresión de factores inmunológicos que influyen en respuestas inmunes adaptativas antivirales mas fuertes [139].

### 3 JUSTIFICACIÓN

Debido a que aún no se ha establecido si existe un papel protector de A3G en personas expuestas seronegativas o si esta implicado en la lenta progresión a la enfermedad, nosotros estamos interesados en caracterizar la expresión de esta proteína en las diferentes estirpes de las CMSP en estas cohortes de personas. Por otro lado dado que la capacidad antiviral de A3G depende de su expresión y que es necesario entender las cascadas de señalización que desencadenan en el aumento de dicha expresión, en éste trabajo se analiza la expresión de A3G en estas cohortes de pacientes y de las proteínas que constituyen las cascadas de señalización involucradas en la traducción de esta (TLRs, RIG-1 e IFN). Esto es con el fin de abundar en el conocimiento de dicha





---

---

señalización y pueda considerarse como blanco terapéutico para una probable alternativa antirretroviral.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivos generales

- a) Caracterizar *in vitro*, la expresión del ARNm de APOBEC3G (A3G) en diferentes estirpes celulares (linfocitos T CD4+, CD8+, monocitos y células B) de sangre periférica en individuos expuestos seronegativos y controladores de la infección. Conocer si moléculas análogas al genoma del VIH-1 son un estímulo para la mayor expresión de ésta proteína.

### 4.2 Objetivos particulares

- 1.- Obtener CMSP, con óptima viabilidad (80%), de muestras congeladas de 4 diferentes cohortes: expuestos seronegativos (ESN), controladores de la replicación (CT), Progresores típicos (PT), y donadores sanos (DS).
- 2.- Obtener 4 estirpes celulares (linfocitos T CD4+, CD8+, monocitos, y linfocitos B), a partir de CMSP con alta pureza mediante la técnica de sort acoplado a citometría de flujo multiparamétrica.
- 3.- Cuantificar *in vitro* la expresión de hA3G, así como de diferentes genes involucrados en la cascada de señalización de TLRs, en cada una de las estirpes celulares en estado basal y con análogos de TLRs, así como INF- $\alpha$ .





---

---

## 5 HIPÓTESIS

Los individuos expuestos seronegativos tendrán mayor expresión de la proteína A3G que los individuos de las otras cohortes y dicha expresión se verá aumentada con alguno de los estímulos utilizados.

## 6 MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Muestra de estudio.

Debido a que éste estudio fue retrospectivo<sup>20</sup>, se utilizaron muestras congeladas de células mononucleares de sangre periférica (CMSP), obtenidas por el método de separación por gradiente de densidad de ficol. Éstas muestras fueron criopreservadas a -180°C en nitrógeno líquido.

Se utilizaron cuatro diferentes cohortes de pacientes Tabla 1.

DS. Se definen como individuos VIH-1 seronegativos

PT. Se definen como individuos VIH-1 seropositivos y con una progresión típica de la infección.

CT. Se definen como individuos seropositivos quienes mantienen carga viral indetectable y conteo de linfocitos TCD4+ mayor a 200 células/ml de plasma por mas de 2 años consecutivos.

ESN. Se definen como individuos que a pesar de la constante exposición al virus siguen siendo seronegativos a la infección por VIH-1

---

<sup>20</sup> Un estudio retrospectivo es aquel estudio longitudinal en el tiempo, que se analiza en el presente con datos del pasado.





Tabla 1. Características de la muestra

Cohorte	n
Donadores Sanos (DS)	5
Progresores Típicos (PT)	5
Controladores (CT)	5
Expuestos seronegativos (ESN)	5

Cada cohorte de pacientes es de n=5, y todas ellas fueron colectadas de la cohorte de pacientes del Centro de Investigación de Enfermedades Infecciosas (CIENI), Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INER), con consentimiento informado de cada paciente.

## 6.2 Descongelación de células.

Para la descongelación de células es necesario llevar el siguiente procedimiento: Retirar los viales del tanque con nitrógeno líquido y colocarlos a 37°C el tiempo necesario para observar una pequeña porción de hielo. Colocar inmediatamente en 10ml de medio HUT (medio RPMI 1640 [Lonza®, Biowhittaker], 10% suero bovino fetal, 1% de glutamina, 1% de penicilina/estreptomicina) a 37°C, homogenizar suavemente y centrifugar 10min a 1500rpm. Desechar el sobrenadante y lavar una vez más con 10ml medio HUT a 37°C. Contar las células en una cámara de Neubauer (HYCOR kova®, California US), utilizando azul de tripano (Lonza® Biowhittaker, Walkersville MS USA) como marcador de viabilidad. Dejar las células en medio HUT a 37°C, a una concentración de 3,000,000 células/ml de medio HUT toda la noche, con las siguientes condiciones: 37° C con 0.5% de CO<sub>2</sub> y 10U de DNAsa por ml de medio.





---

---

### 6.3 Separación de 4 estirpes celulares: CD4+, CD8+, CD19+ y CD14+.

De las células descongeladas de cada paciente, es necesario separar 4 estirpes celulares para su posterior estudio individual. Esto se logró mediante citometría de flujo multiparamétrica acoplado a FACS (6.3.4). Ésta técnica necesita tomar en cuenta diversas consideraciones, entre ellas, la compensación de fluorescencia.

#### 6.3.1 Citometría de flujo.

La citometría de flujo es un método automatizado de análisis de células, donde las mediciones se realizan a alta velocidad. Los datos multiparamétricos se correlacionan a cada célula, la precisión estadística es alta, las células se separan con gran pureza a partir de mezclas heterogéneas para la identificación y análisis funcional. El citómetro de flujo es un instrumento avanzado capaz de medir tamaño relativo de la célula, dispersión de la luz o complejidad interna, fluorescencia multicolor, es decir, emisión y detección de diferentes longitudes de onda [140, 141]. En este proyecto se utiliza el equipo FACS Aria II (BD Bioscience™).

El citómetro de flujo se compone de tres sistemas: Fluidos, óptico y electrónico. Éstos trabajan juntos para realizar las mediciones de las múltiples características de cada célula (Figura 13).



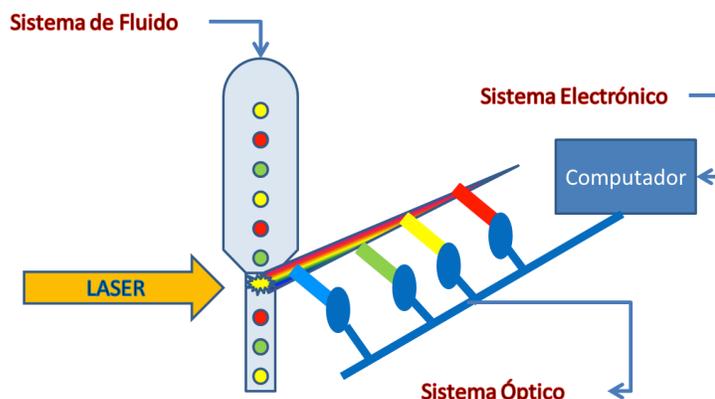


Figura 13. Esquema general de la composición de un citómetro de flujo.

### 6.3.1.1 Sistema de Fluidos.

La muestra es inyectada en el centro de un chorro de fluido que la envuelve en la cámara de flujo y esto hace que la muestra se mantenga en el centro (principio de fluido laminar) y es enfocada para llevar la muestra hasta el punto de interacción con el láser. El sistema de fluidos es vital para que las partículas se encuentren en suspensión y lleguen de manera ordenada al láser.

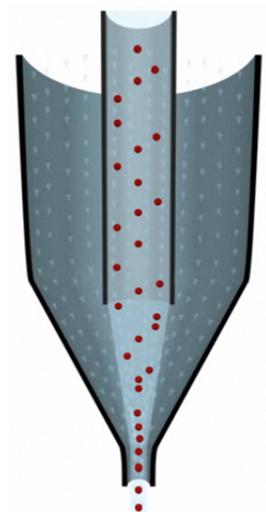
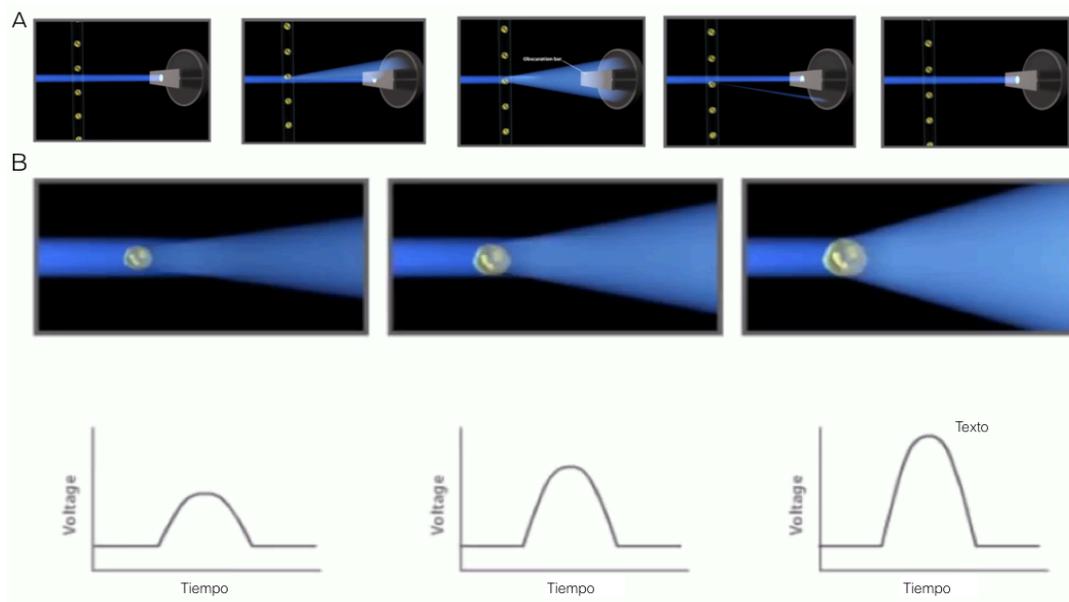


Figura 14. Enfoque hidrodinámico de la muestra en la celda de flujo.

### 6.3.1.2 Tamaño y granularidad celular.

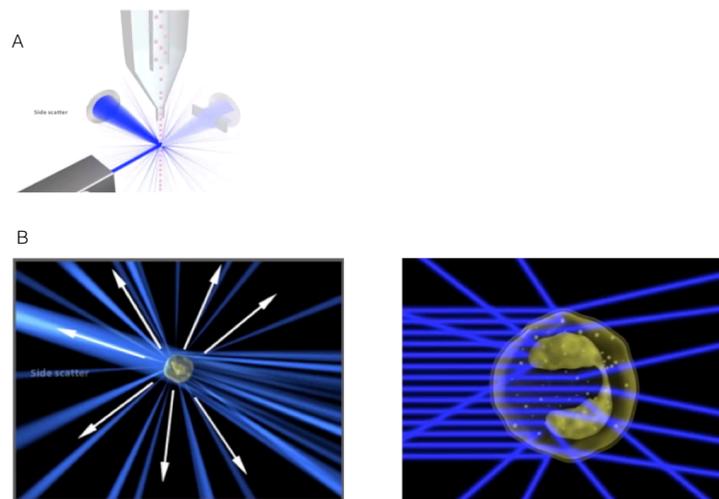
Cuando el láser incide en la célula, la magnitud de una dispersión hacia adelante (Forward scatter) es proporcional al tamaño de la célula se puede utilizar para cuantificar éste parámetro. La luz dispersada se cuantifica mediante un detector que convierte la intensidad en un voltaje. Una barra de bloqueo llamada barra de oscurecimiento, se coloca delante del detector de dispersión (Forward scatter), la barra de oscurecimiento impide que cualquier luz intensa sea percibida por el detector. Cuando una célula atraviesa, la luz del láser se dispersa alrededor de la barra de oscurecimiento y es percibida por el detector Figura 15.A. La luz dispersada recibida por el detector se traduce en un impulso de voltaje, de ésta forma las células pequeñas producen un pequeño impulso de voltaje porque producen una pequeña cantidad de dispersión hacia adelante, es decir, la magnitud del voltaje registrado para cada célula es proporcional al tamaño de la célula Figura 15.B.



*Figura 15. La dispersión de la luz es proporcional al tamaño celular.*

*En A) se ilustra como se lleva a cabo la detección de la dispersión (forward scatter). B) se ilustra la proporcionalidad directa entre el tamaño celular y el impulso del voltaje.*

Por otro lado cuando la célula pasa a través del láser, la luz también se dispersa hacia todos los ángulos. La luz dispersada en ángulos más grandes es causada por la granularidad y la complejidad estructural dentro de la célula. Esta luz dispersada de forma lateral (side scatter) está enfocada a través de un sistema de lentes y es recogida por un detector que se encuentra a 90 grados de la trayectoria del láser.

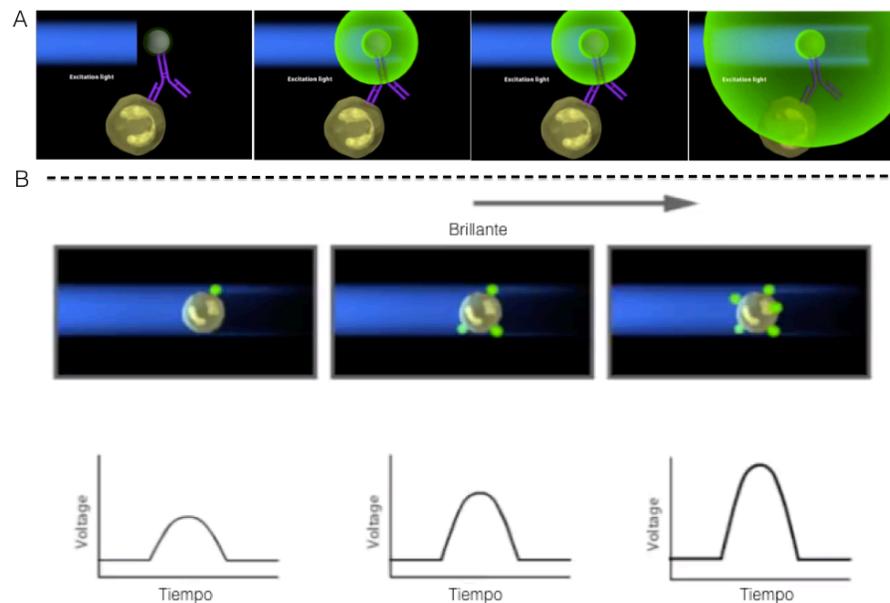


*Figura 16. La dispersión lateral del laser es proporcional a la complejidad celular. En A) se ilustra la detección de la dispersión lateral (side scatter). B) La dispersión lateral es causada por la granularidad y complejidad celular.*

### 6.3.1.3 Fluorescencia

La fluorescencia es un término usado para describir la excitación de un fluoróforo a cierto nivel de energía seguido por el regreso de ese fluoróforo a su estado fundamental, la energía de la luz emitida depende del nivel de energía al que el fluoróforo fue excitado y esa luz tiene una longitud de onda específica y en consecuencia un color específico.

Una de las maneras más comunes para estudiar las características celulares utilizando citometría de flujo implica el uso de un moléculas fluorescentes tales como anticuerpos marcados con fluoróforos. En estos experimentos, el anticuerpo marcado se añade a las células y el anticuerpo se une a una molécula específica en la superficie celular o dentro de la célula. Finalmente, cuando la luz del láser a cierta longitud de onda golpea el fluoróforo, una señal fluorescente se emite y se detecta mediante el clitómetro de flujo.



*Figura 17. Unión específica de un antígeno a un anticuerpo con un fluorocromo conjugado.*

*En A) se muestra la unión específica de un antígeno a un anticuerpo con un fluorocromo conjugado que esta siendo excitado. B) Se ilustra que la cantidad de antígeno es proporcional al brillo emitido por el fluoróforo.*

La luz fluorescente procedente de células marcadas, viaja en la misma trayectoria que la señal de dispersión lateral, se dirige a través de una serie de filtros que dará rangos de longitud de onda bien establecidos, la luz es

filtrada a los detectores apropiados donde es convertido a pulsos de voltaje proporcional a la cantidad de fluorescencia emitida.

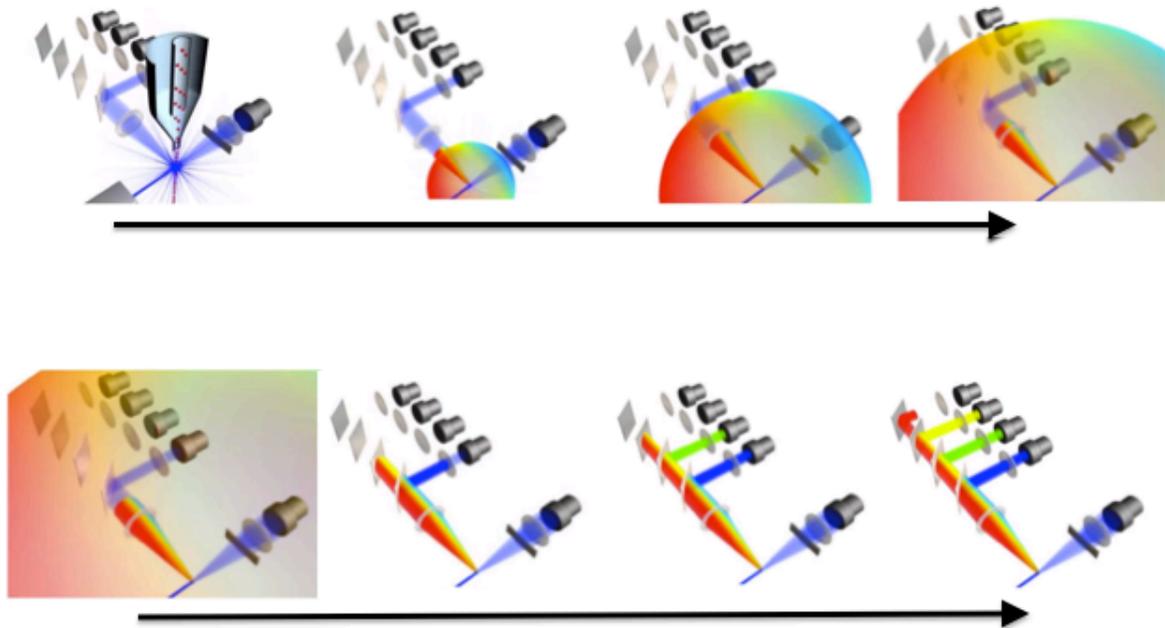


Figura 18. Trayectoria de luz, desde la intersección de la célula con el laser hasta los detectores.

### 6.3.2 Controles de compensación.

En el análisis de citometría de flujo de dos o más fluorescencias simultáneas, es necesario establecer parámetros de compensación con objeto de eliminar el solapamiento inherente de los espectros de emisión, por lo que la medición de la fluorescencia emitida por cada uno es difícil.

El proceso de compensación de fluorescencia calcula la cantidad de interferencia que un fluorocromo tendrá en un canal que no fue asignado para medirlo, en la Figura 19 se ilustra éste fenómeno, siendo A y B dos fluorocromos imaginarios medidos en el canal FL-1 y FL2, respectivamente. La

sombra azul fuerte representa la parte de B que se sobrelapa en el canal FL-1; la sombra roja es la parte de A que se sobrelapa en el canal FL-2 [141].

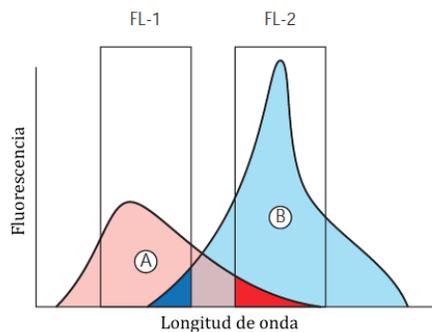


Figura 19. Compensación de fluorescencia. Modificado de [141].

Para nuestro análisis, se utilizaron cinco fluorocromos diferentes, por lo que es necesario compensar la fluorescencia de cada uno de ellos. Para ello, se colocaron perlas recubiertas con un anticuerpo dirigido a Ig-G, denominadas perlas positiva; y perlas sin anticuerpo o negativas en tubos falcon para citometría. Posteriormente se añaden 2µl de uno de los anticuerpos con algún fluorocromo acoplado que se utilicen en el análisis. Se incuban en oscuridad a 4°C durante 15 min. Se realizan dos lavados utilizando 2ml de medio PBA y centrifugando a 1500rpm durante 10 min. Se descarta el sobrenadante y las perlas se resuspenden en 500µl de PBS. Se aplica el mismo procedimiento para cada anticuerpo utilizado.

### 6.3.3 Tinción celular.

Para la tinción, se colocaron  $20 \times 10^6$  Células Mononucleares de Sangre Periférica (CMSP) en un tubo falcon para citometría. Se lavan dos veces con 2ml de PBS (Buffer de fosfatos sin calcio ni magnesio, Lonza biowhittaker), y mediante decantación se deshecha el sobrenadante. Se resuspenden las células en el PBS remanente (aproximadamente 50µl de PBS). Se colocan 1µl de marcador de viabilidad AquaDye, se homogenizan suavemente e incuban





en oscuridad durante 10min a temperatura ambiente. Posteriormente lavar con 2ml de PBS centrifugando a 1500rpm por 10min en cada lavado. Se deshecha el sobrenadante y colocar la cantidad de anticuerpo señalada en Tabla 2.

*Tabla 2. Mezcla de anticuerpos necesarios para la tinción de células*

<b>Anticuerpo</b>	<b>Fluorocromo</b>	<b>Volumen (µl)</b>
<b>CD8</b>	PerCP-Cy5.5	5
<b>CD4</b>	FITC	20
<b>CD19</b>	APC	20
<b>CD14</b>	Pacific Blue	5
<b>CD3</b>	PE	20

#### 6.3.4 Sorteo celular activado por fluorescencia (FACS, Fluorescence-Activated Cell Sorting).

La citometría de Flujo y la separación celular, proveen mayor información y métodos mas poderosos, para el análisis y de poblaciones celulares en diferentes investigaciones. El poder analítico de la citometría de flujo se basa en su capacidad de hacer mediciones cuantitativas y multiparamétricas en números estadísticamente adecuados de células para definir las propiedades de una población celular. El FACS correlaciona las mediciones de la citometria de flujo y son usados para definir un criterio de sorteo celular para futuros trabajos [142].

Las células son procesadas diferencialmente mediante fluorescencia, regularmente utilizando anticuerpos monoclonales dirigidos, posteriormente



son incorporadas dentro de una pequeña corriente de fluido iluminado por un rayo laser. Las células pasan secuencialmente a través del rayo laser, y la luz fluorescente de las células dan lugar a señales eléctricas. La corriente se divide en una serie de gotas de tamaño uniforme debajo del laser. Las señales celulares se utilizan para dar cargas electrostáticas apropiadas a las gotas que contienen a las células. Las gotas que han pasado entre las dos placas cargadas, son desviadas a un contenedor apropiado (Figura 20). El sistema ha demostrado capacidad para proporcionar fracciones con gran número de células viables enriquecidas en un tipo funcional particular [143].

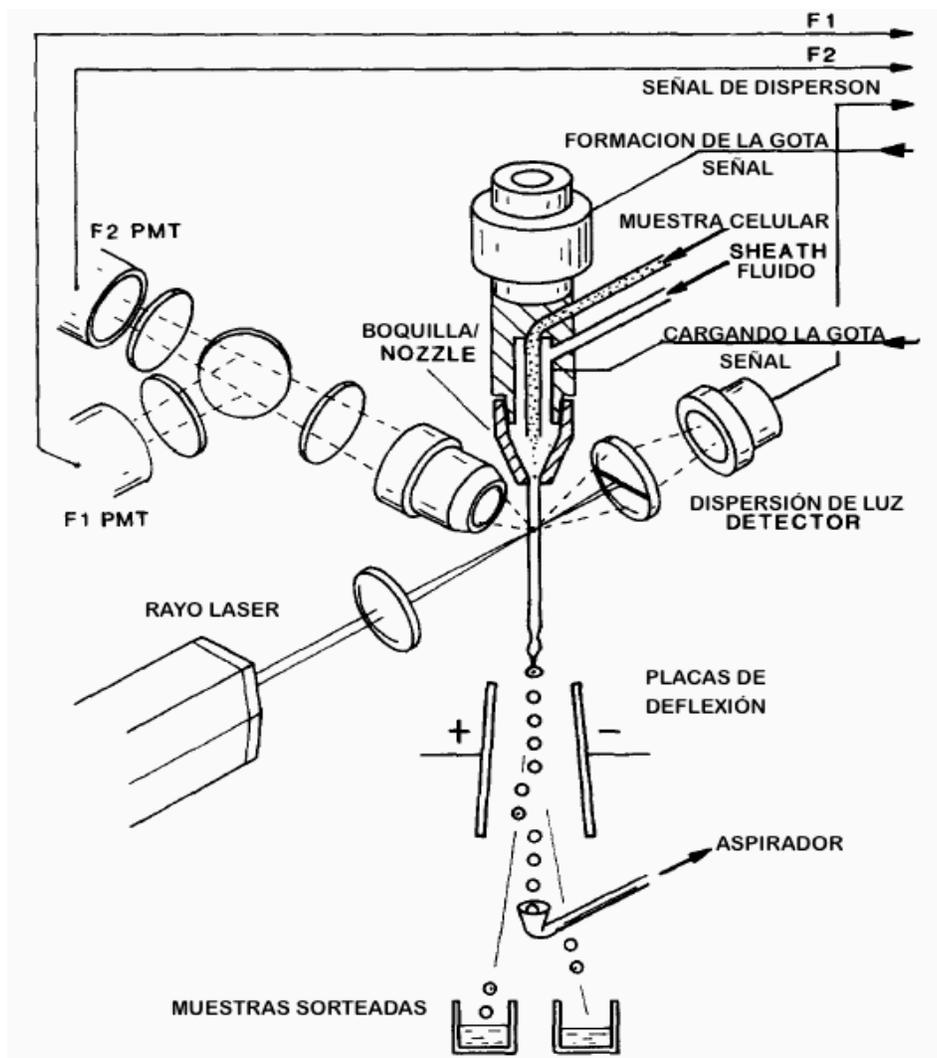


Figura 20. Separación Celular Activada por Fluorescencia, FACS. Modificado de [142].



---

---

El panel utilizado en éste trabajo (Tabla 2), está diseñado para una separación de cuatro vías o estirpes celulares (CD4+, CD8+, CD19+, y CD14+). Una vez separadas, cada estirpe celular, se coloca en una placa de cultivo de 96 pozos. A una densidad de 150,000 células/150µl de medio de cultivo HUT (1,000 células/µl) [144].

### 6.3.5 Enriquecimiento de monocitos

Debido a que utilizando FACS se obtuvo una muy pequeña cantidad de células CD14+, se recurrió a un método de enriquecimiento de ésta misma estirpe celular.

En un frasco de cultivo, se colocaron 15ml de medio LCM (medio DMEM, 100u/ml penicilina/estreptomicina, 10% de plasma humano heparinizado) y se incuban a 37°C durante 30min. En tubo falcon de 50ml, se resuspenden  $20 \times 10^6$  de CMSP en 10ml de medio LCM. Una vez resuspendidas las células, se trasvasaron al frasco de cultivo, con el medio LCM previamente calentado. Las células se incubaron a 37°C, con 5% de CO<sub>2</sub>, y 85% de humedad toda la noche.

Al día siguiente, se desechó el medio LCM del frasco de cultivo, con cuidado de no despegar la película de células adheridas a la parte inferior del frasco. Se lavó dos veces la película de células con 10ml de medio HUT, con el fin de quitar las células no adheridas. Se adicionó 10ml de PBS con EDTA 5mM en frío y se incubó 20min. Se despegan las células adheridas y se transfirieron a un tubo falcon de 50ml, se centrifugaron a 1500rpm durante 10min. Se colocaron 150,000 células en 150µl de HUT, en cada pozo de la placa de 96 pozos utilizada en la separación por FACS.





---

---

#### 6.4 Ensayos con células mononucleares de sangre periférica

Con la finalidad de tener un panorama más amplio del comportamiento de las células, en el caso en que interactúen entre ellas, éste estudio también contó con ensayos hechos con células mononucleares de sangre periférica (CMSP). Para éstos ensayos se colocaron  $2 \times 10^6$  células en 1ml de medio HUT, en placas de 24 pozos, bajo las mismas condiciones que las células separadas por FACS.

#### 6.5 Estimulación celular.

Se realizarán diferentes ensayos de estimulación para cada una de las estirpes celulares separadas por FACS. Las moléculas estimulantes que se utilizaron fueron las siguientes:

ssRNA40 (InvivoGen, USA). Es un oligonucleótido de cadena sencilla de ARN, rico en GU. Está acomplejado con el lípido catiónico LyoVec™ para protegerlo de la degradación y facilitar su absorción. En los complejos con lípidos catiónicos, ssRNA40 puede sustituir a los ARN virales en la inducción de producción de  $TNF\alpha$  e  $IFN\alpha$ . En células humanas, TLR8 [52] ha demostrado ser el receptor principal de ssRNA40 [145].

ssRNA41 (InvivoGen, USA). Es oligonucleótido de cadena sencilla de ARN. Se deriva de ssRNA40 reemplazando los nucleótidos U por A. Al igual que ssRNA40, se encuentra acomplejado con el lípido catiónico LyoVec™. Sin embargo, a diferencia de ssRNA40, ssRNA41 es incapaz de inducir la producción de IFNs, por lo que puede ser usado como control negativo de ssRNA40 [146].





---

---

Poly(I:C) (InvivoGen, USA). El ácido poliinosílico-policitidílico, es un análogo sintético de una cadena doble de ARN e induce respuesta inmune innata iniciada, tanto por los receptores tipo Toll (TLRs) y los receptores de RIG-I (RLRs) [147].

Imiquimod (InvivoGen, USA). Es una amina imidazoquinolina análoga de guanosina. Es un modificador de la respuesta inmune, con potente respuesta antiviral indirecta. Induce la producción de citosinas como  $IFN\alpha$ , y activa el TLR7, ésta activación es dependiente de MyD88 y conduce a la inducción de la transcripción de NF- $\kappa$ B [148, 149] .

$IFN\alpha$  (plb interferonsource, USA). Es una glicoproteína de la clase de las citosinas. Tienen actividades antivirales, antiproliferativas e inmunomoduladoras. La cascada de señalización principal, inducida por el interferón es la vía JAK1-STAT. La activación de ésta vía conduce a una mayor expresión de genes cuyos productos, protegen a la células de la infección viral.[150]

LPS. El lipopolisacarido son polímeros, constituidos por una parte lipofílica de ácidos grasos y una parte hidrofílica de oligosacáridos, ésta última, se encuentra en la membrana externa de bacterias Gram negativas, formando una capa protectora contra moléculas lipofílicas. El VIH dañan el GALT (tejido linfoide asociado con intestino), provocando mediante la inflamación, el síndrome de intestino permeable. Los niveles altos de LPS en sangre son una señal del síndrome de intestino permeable.

*Las concentraciones utilizadas en éste estudio se muestran en la*

Tabla 3. Las células fueron puestas en contacto con los estímulos correspondientes, en ensayos independientes, es decir, no hubo mezclas de estímulos en ningún ensayo. La estimulación celular se llevó a cabo durante 6





horas. Para el control de reactivos, se colocan las células en la misma cantidad e iguales condiciones, sin estímulo alguno.

*Tabla 3. Concentraciones necesarias por estímulo.*

<b>Estímulo</b>	<b>Concentración</b>
<b>sRNA40</b>	2.5µg/ml
<b>sRNA41</b>	2.5µg/ml
<b>INF-α</b>	1000 U/ml
<b>LPS</b>	1.0µg/ml
<b>Poly (I:C)</b>	10µg/ml
<b>Imiquimod</b>	1.0µg/ml

*En el caso de CMSP, solo fueron estimuladas con IFNα (a la concentración establecida en la*

*Tabla 3 ), y el control de reactivos (Sin Estímulo). Se utilizaron 2X10<sup>6</sup> de CMSP para cada condición.*

## 6.6 Lisado de células.

Transcurrido el tiempo de estimulación, fue necesario extraer el ARN de las células de cada ensayo para su posterior análisis de expresión. Por ello es necesario lisar dichas células, para ello se utilizan dos diferentes técnicas, dependiendo de la cantidad de células en el ensayo (150,000 ó 2X10<sup>6</sup> células).

### 6.6.1 Lisado en placa de 96 pozos (150,000 células por ensayo).

Para quitar el estímulo de las células, fue necesario centrifugar la placa de 96 pozos a 2,500rpm durante 10min, y con una aceleración y frenado medios. Una vez formada la pastilla de células, se aspiró todo el medio, manteniendo





las células intactas. Para éstas células, se utiliza el Kit Cell Lysis (ROCHE). Fue necesario preparar el agente de lisis como se indica en la Tabla 4 y añadir 40µl a cada uno de los pozos de la placa. Incubar 5min a temperatura ambiente.

Tabla 4. Modo de preparación del agente de lisis para una reacción.

<b>Agente</b>	<b>1X(µl)</b>	<b>Concentración Final</b>
<b>Amortiguador de lisis</b>	39.5	1X
<b>Inhibidor de RNAsa</b>	0.5	20U
<b>Volumen total</b>	40	

#### 6.6.2 Lisado de células mononucleares de sangre periferica ( $2 \times 10^6$ células), extracción y purificación de ARN.

Las células se transfirieron a un tubo eppendorf para microcentrífuga de 1.5ml y éste es centrifugado a 1,500rpm durante 10min. Se extrajo el sobrenadante con ayuda de una micropipeta. Con ésta cantidad de células se utiliza el Kit RNeasy® Mini (QIAGEN, México). Se debe añadir 600µl de buffer de lisis (10µl de β-mercaptoetanol por cada ml de amortiguador RLT). Se mezcló con 600µl de etanol al 70% (con el fin de precipitar ácidos nucleicos), se homogenizó y se pasó a través de una columna con membrana a base de silica, lo cual provee propiedades de unión selectiva con el ARN. Se centrifugaron a 10,000rpm por 1min. A continuación se hicieron diferentes lavados, uno es utilizando 700µl de amortiguador RW1 y dos más con 500µl de amortiguador RPE. Por último, se eluyen los ácidos nucleicos que permanecieron adheridos a la membrana con 30µl de agua libre de ARNasa.





---

---

## 6.7 Cuantificación de ácidos nucleicos.

La cuantificación de ácidos nucleicos, sólo se realizó para las CMSP. Dicha cuantificación se llevó a cabo en el espectrofotómetro NanoDrop™ ND-1000, el cual mide desde 1µl de muestra con alta precisión y reproducibilidad, mediante una tecnología patentada que utiliza la tensión superficial [151].

## 6.8 Síntesis de cADN<sup>21</sup> por RT-PCR punto final

Después del lisado celular y purificación de ARN (en el caso de las CMSP). Fue necesario sintetizar la cadena sencilla de ADN complementaria al ARN. Éste procedimiento es distinto entre los diferentes ensayos, dependiendo del método de lisado y extracción de ARN.

### 6.8.1 Células separadas por FACS (150 000 células)

Para éstos ensayos, se utilizará DNAsa termolábil (incluido en el Kit Cell Lysis (ROCHE) y el Kit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis (ROCHE). La Tabla 5, muestra las cantidades necesarias para una reacción. Ésta reacción de RT-PCR se llevó a cabo mediante la técnica de punto final utilizando un termociclador.

---

<sup>21</sup> cADN es un ADN monocatenario complementario a un mARN, sintetizado a partir del mARN por transcripción reversa. Puede ser utilizada como plantilla para sintetizar una cadena de ADN de doble cadena correspondiente a la información de mARN original.





Tabla 5. Mezcla de reacción para síntesis de cADN, para las células separadas por FACS.

	1X (µl)	Conc. final
<b>Agua PCR</b>	8.5	
<b>Iniciadores hexameros aleatorios</b>	2.0	60µM
<b>Amortiguador "Transcriptor"</b>	4.0	1X
<b>Inhibidor de ARNasa</b>	0.5	20U
<b>Deoxynucleotidos</b>	2.0	1mM
<b>DNasa termolabil</b>	0.5	1U
<b>Transcriptasa reversa</b>	0.5	10U
<b>ARN muestra</b>	2.0	
<b>Volumen total</b>	20	

Las condiciones necesarias para la reacción de PCR punto final se ilustra en la Figura 21

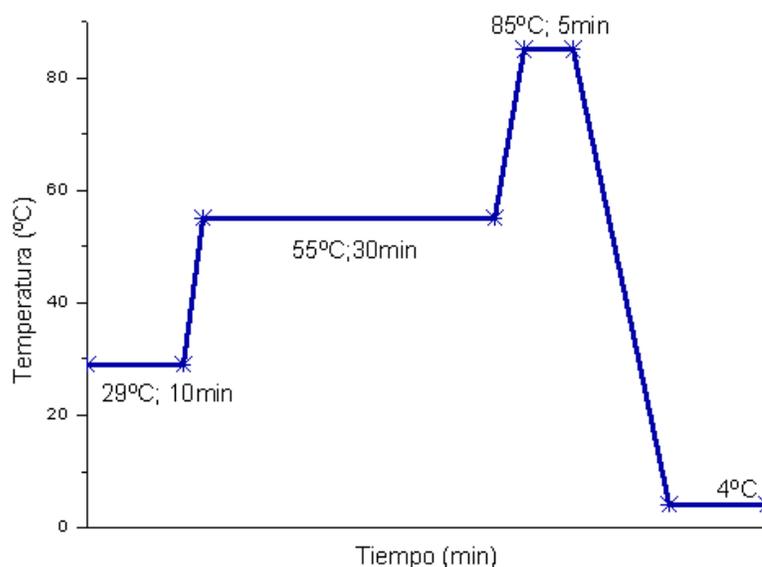


Figura 21. Condiciones de reacción para PCR punto final de la síntesis de cADN para células separadas por FACS





---

---

Se ilustran las temperaturas y tiempos necesarios para la síntesis de cADN. En primer lugar se lleva a cabo la alineación de los iniciadores (29°C, 10 min); en seguida tiene lugar la elongación de la cadena (55°C, 30 min), y finalmente se inactiva la enzima transcriptasa inversa (85°C, 5 min).

### 6.8.2 Células Mononucleares de Sangre Periférica (2X10<sup>6</sup>M células).

Éstas células después de ser lisadas, se les extrajo, purificó y cuantificó el ARN. Éste último será utilizado para la síntesis de su cadena de ADN complementaria. Esto se realizó con una concentración definida de ARN en todos los ensayos. Es decir, en la mezcla de reacción se colocó el volumen necesario para obtener 100ng de ARN.

Para éste procedimiento se utilizó el kit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis (ROCHE). La mezcla de reacción se muestra en la Tabla 6. Con el propósito de evitar la formación de estructuras secundarias, se desnaturalizan las posibles uniones del ARN con los iniciadores y enseguida se realiza un choque térmico a 4°C aproximadamente (con hielo), en éste momento se coloca el resto de los reactivos incluyendo el enzima. Las condiciones de reacción de la PCR se ilustran en la Figura 22.

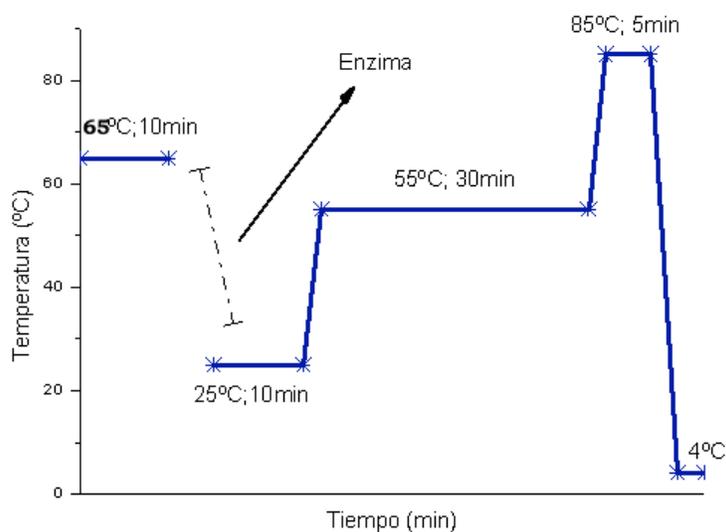
Tabla 6. Mezcla de reacción para síntesis de cADN para CMSP.

	<b>1X (µl)</b>	<b>Concentración Final</b>
<b>Iniciadores hexámeros aleatorios</b>	2.0	60.0µM
<b>ARN muestra</b>	Variable	100ng
<b>Agua grado PCR</b>	cbp	
<b>Volumen total</b>	13.0	





	<b>1X (µl)</b>	<b>Concentración Final</b>
<b>Amortiguador de reacción</b>	4	8mM MgCl <sub>2</sub>
<b>Protector inhibidor de RNasa</b>	0.5	20U
<b>Deoxinucleotidos</b>	2.0	1.0mM
<b>Transcriptasa reversa</b>	0.5	10U
<b>Volumen Final</b>	7	



*Figura 22. Condiciones de reacción para PCR punto final de la síntesis de cADN para CMSP.*

*Se ilustran las temperaturas y tiempos necesarios para la síntesis de cADN. En primer lugar se desnaturalizan las posibles uniones entre el ARN y los iniciadores, posteriormente se da un choque térmico a 4°C con hielo, todo esto para evitar posibles estructuras secundarias en el ARN, en éste momento se coloca la enzima. Posteriormente se permite la alineación de los iniciadores (25°C, 10 min), seguido de la elongación de la cadena (55°C, 30 min) y por último se inactiva la enzima transcriptasa inversa (85°C, 5 min).*

Todos los cADNs, tanto de CMSP como de células separadas por estirpe, se almacenaron a -80°C, hasta su utilización para determinación de la expresión génica.





---

---

## 6.9 Detección de la expresión génica.

La detección de la expresión de cada gen evaluado, se realizó mediante PCR en tiempo real (Real Time-PCR) en la plataforma BioMark™HD System (Fluidigm®) la cual ofrece capacidad para realizar 9216 reacciones de RT-PCR de forma cuantitativa en un solo experimento. Dicha plataforma utiliza la tecnología de “circuito integrado de fluidos”, la cual permite minimizar los pasos en la manipulación de reactivos, con excelente regulación en la mezcla de reacción. Esto se logra mediante un proceso de fabricación llamado Litografía blanda en multicapa (MSL®, multilayer soft lithography), ésta válvula esta registrada como “Válvula Nanoflex™”.

### 6.9.1 Valvulas Nanoflex™

Ésta técnica permite producir microválvulas, las cuales son el componente principal que permite controlar líquidos dentro de un chip. Esto ocurre cuando un canal de flujo y un canal control se cruzan, si el área de intersección es suficientemente grande, entonces se crea una válvula [152, 153]. Las membranas delgadas que separa los dos canales se desvían dentro del canal de flujo cuando el canal control está presurizado, creando un sellado completo en el canal de flujo. En la Figura 23 se muestra una típica válvula en su estado abierto 23.A y cerrado 23.B [153].



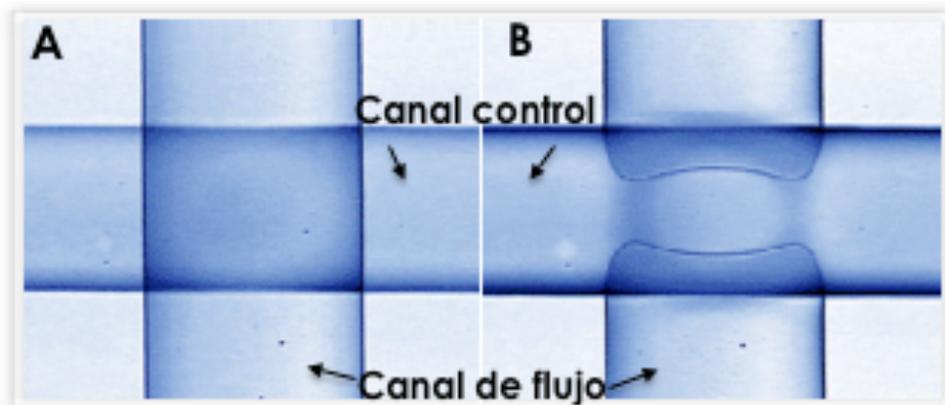


Figura 23. Microválvula NanoFlex™.

A) Válvula en su estado abierto; B) Válvula en su estado cerrado.

### 6.9.2 Circuitos integrados de fluidos.

El arreglo dinámico de circuitos integrados de fluidos, ofrece un buen nivel de eficiencia y rendimiento para aplicaciones de PCR, ya que disminuyen el número de pasos requerido por pipeteo de hasta 100 veces.

Los circuitos integrados de fluidos tienen, en el chip, una red de canales de microfluidos, cámaras y válvulas que ensamblan reacciones individuales de PCR (Figura 24).

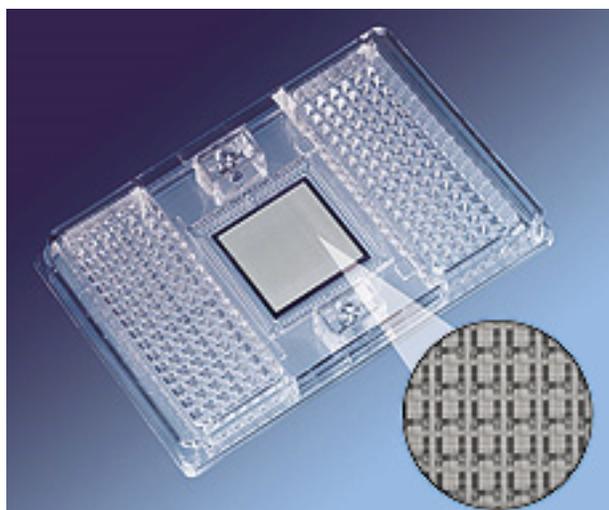


Figura 24. Arreglo dinámico IFC



Los ensayos de expresión se realizaron con el protocolo de "ciclado rápido", es decir, con una rampa de temperatura de 2°C/s. El uso de éste protocolo requiere el uso de EvaGreen y Rox como colorantes.

Para incrementar el número de copias de ADN blanco, se utiliza una amplificación blanco específica (specific target amplification, STA). En la Tabla 7 se muestra la mezcla de reacción necesaria para una amplificación STA, donde el componente TaqMan es una mezcla de dNTP, enzima, etc. (proporcionada por el proveedor); La mezcla de cebadores a 500nM contiene los iniciadores directo y reverso necesarios para cada uno de los genes evaluados. En la Figura 25 se muestran las condiciones necesarias para llevar a cabo la amplificación STA.

Tabla 7. Mezcla de reacción STA

<b>Componente</b>	<b>Volumen/Reacción (µl)</b>	<b>Volumen para 96 reacciones + 10% de exceso (µl)</b>
<b>TaqMan</b>	2.5	264
<b>Mezcla de cebadores 500nM</b>	0.5	52.8
<b>Agua grado PCR</b>	0.75	79.2
<b>cADN</b>	1.25	
<b>Volumen total</b>	5.0	



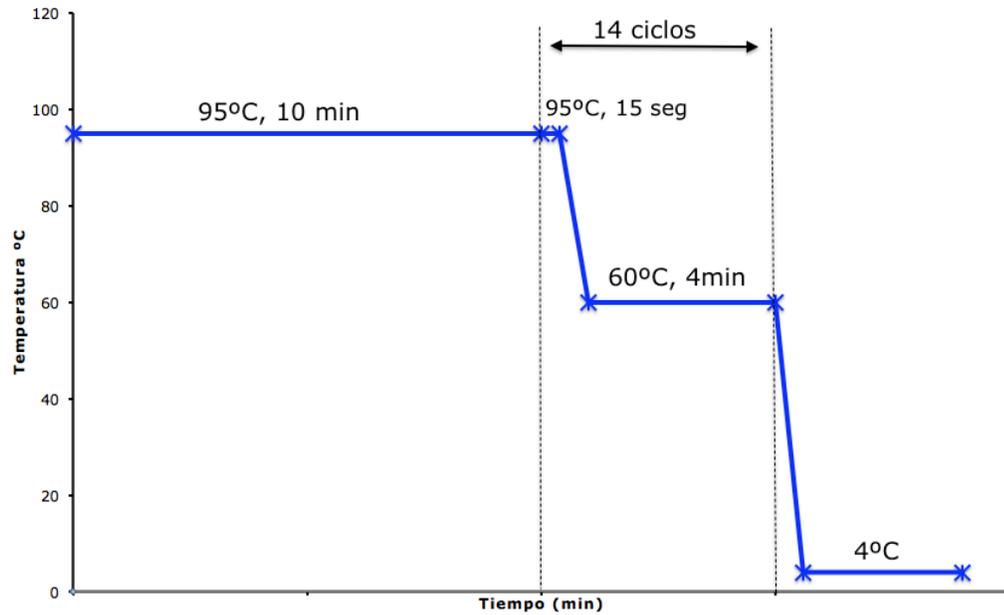


Figura 25. Condiciones de reacción para la Amplificación STA.

Se ilustran las temperaturas y tiempos necesarios para la amplificación STA. En primer lugar se incuba la enzima (95°C, 10 min), enseguida se comienzan 14 ciclos de alineación (95°C, 15 seg) y elongación (60°C, 4 min).

Con la finalidad de quitar los iniciadores que no se acoplaron, se realiza un tratamiento con Exonucleasa (Exo I). Para ello, se debe diluir la Exo I a 4U/ $\mu$ l mediante la mezcla de reacción ilustrada en la Tabla 8.

Tabla 8. Mezcla de reacción con Exo I

Componente	Por 5 $\mu$ l de muestra ( $\mu$ l)	96 muestras con exceso ( $\mu$ l)
Agua grado PCR	1.4	168
Buffer de reacción	0.2	24
ExoI (20U/ $\mu$ l)	0.4	48
Volumen total	2	240

De la mezcla anterior se añade 2 $\mu$ l de la Exo I (4U/ $\mu$ l) a cada reacción STA, se centrifugan y se colocan en un termociclador con las características de la Figura 26.



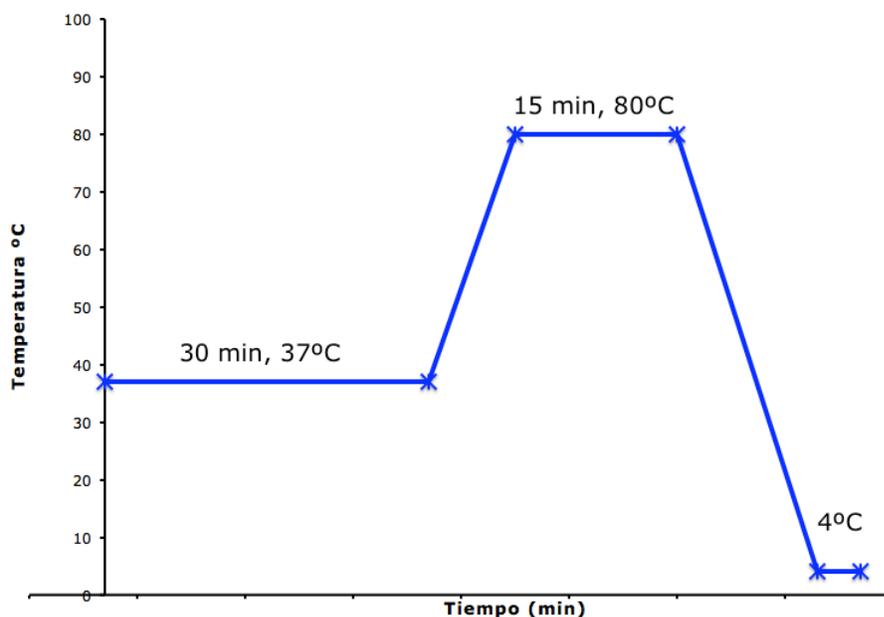


Figura 26. Condiciones de PCR para el tratamiento con ExoI.

Se ilustran las temperaturas y tiempos necesarios para el tratamiento con ExoI. En primer lugar se incuba la enzima (37°C, 30 min), enseguida se activa la exonucleasa (80°C, 15 min).

El producto final debe quedar una dilución (1:5) respecto a los 5µl de reacción STA, por tanto, a los 7µl (reacción STA + ExoI), se le agregan 18µl de solución amortiguadora TE (Tris<sup>22</sup> 10mM, EDTA 1.0mM, pH 8.0).

### 6.9.3 Preparar la mezcla de muestras.

Por último la solución de muestras que se obtuvieron en el paso anterior, se mezcla con el colorante de unión al ADN, y con los reactivos necesarios para llevar a cabo una reacción de PCR tiempo real (Mezcla maestra 2X). En la Tabla 9, se muestra en recuadro azul la Pre-mezcla necesaria para la solución final.

<sup>22</sup> Tris es el nombre abreviado del compuesto orgánico conocido como tris(hidroximetil)aminometano, es una amina primaria. Generalmente se utiliza para preparar disoluciones tampón.





Se deben alicuotar 3.3µl de la pre-mezcla y añadir 2.7µl de las muestras tratadas con STA y ExoI.

Tabla 9. Mezcla para preparar las muestras

Componente	Mezcla por reacción (µl)	Volumen por reacción con exceso (µl)	Volumen para un IFC de 96 x 96 ensayos (µl)
Mezcla Maestra (2X)	2.5	3.0	360
Agente con el colorante (EvaGreen)	0.25	0.3	36
Muestra STA tratada con Exo-I	2.25	2.7	
Volumen total	5	6	

Se mezcla con vortex por 20 seg, y se centrifuga por 30 seg.

#### 6.9.4 Preparando los ensayos.

Se debe diluir los stocks de iniciadores (directo y reverso) 100µM, de cada ensayo a una concentración final de 5µM:

Tabla 10. Mezcla de reacción para preparar los ensayos.

Comonente	Volumen por reacción (µl)	Volumen para 50µl de Stock (µl)
Solución para cargar ensayos (2X)	2	25
Buffer de suspensión de ADN	2.25	22.5
Iniciadores (directo y reverso) 100µM	0.25	2.5
Volumen total	5	50





---

---

Se mezclaron mediante vortex por 20 seg, y se centrifugaron por 30seg.

#### 6.9.5 Carga del arreglo dinámico IFC.

Se inyectó el fluido de la línea de control en cada "acumulador" del Chip y pasar al equipo: IFC controller HX. Esto es con la finalidad de distribuir el fluido.

Enseguida, se pipetea 5µl de cada ensayo y 5µl de cada muestra dentro de sus respectivas entradas en el chip. Una vez cargadas las muestras y ensayos, se pasó al IFC controller HX y se comenzó el programa para "cargar la mezcla".

Una vez que las muestras y los ensayos fueron mezclados, se coloca el chip en el equipo BioMark HD System, y se selecciona el programa que se ilustra en la Tabla 1.





Tabla 11. Condiciones de reacción para la detección de expresión génica.

Segmento	Tipo	Temperatura (°C)	Duración (seg)	Velocidad en la rampa de temperatura (°C/s)
1	Mezcla Térmica	2400	5.5	
		60	30	5.5
2	Inicio (temperatura alta)	95	60	5.5
3	PCR (30 ciclos)	96	5	5.5
		60	20	5.5
4	Curva de temperatura de fusión 60-95	60	3	1
				1°C/3s

#### 6.10 Análisis estadístico.

Los valores de Ct fueron tratados según Kenneth J. Livak, en su artículo nombrado "Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta}$  CT Method", con la finalidad de tener el valor de expresión relativa de los genes amplificados.

Una vez obtenidos los valores de expresión relativa (N-FOLD), se realizó la prueba estadística t de Student para conocer las diferencias significativas de expresión entre los diferentes grupos de pacientes y estirpes celulares.





---

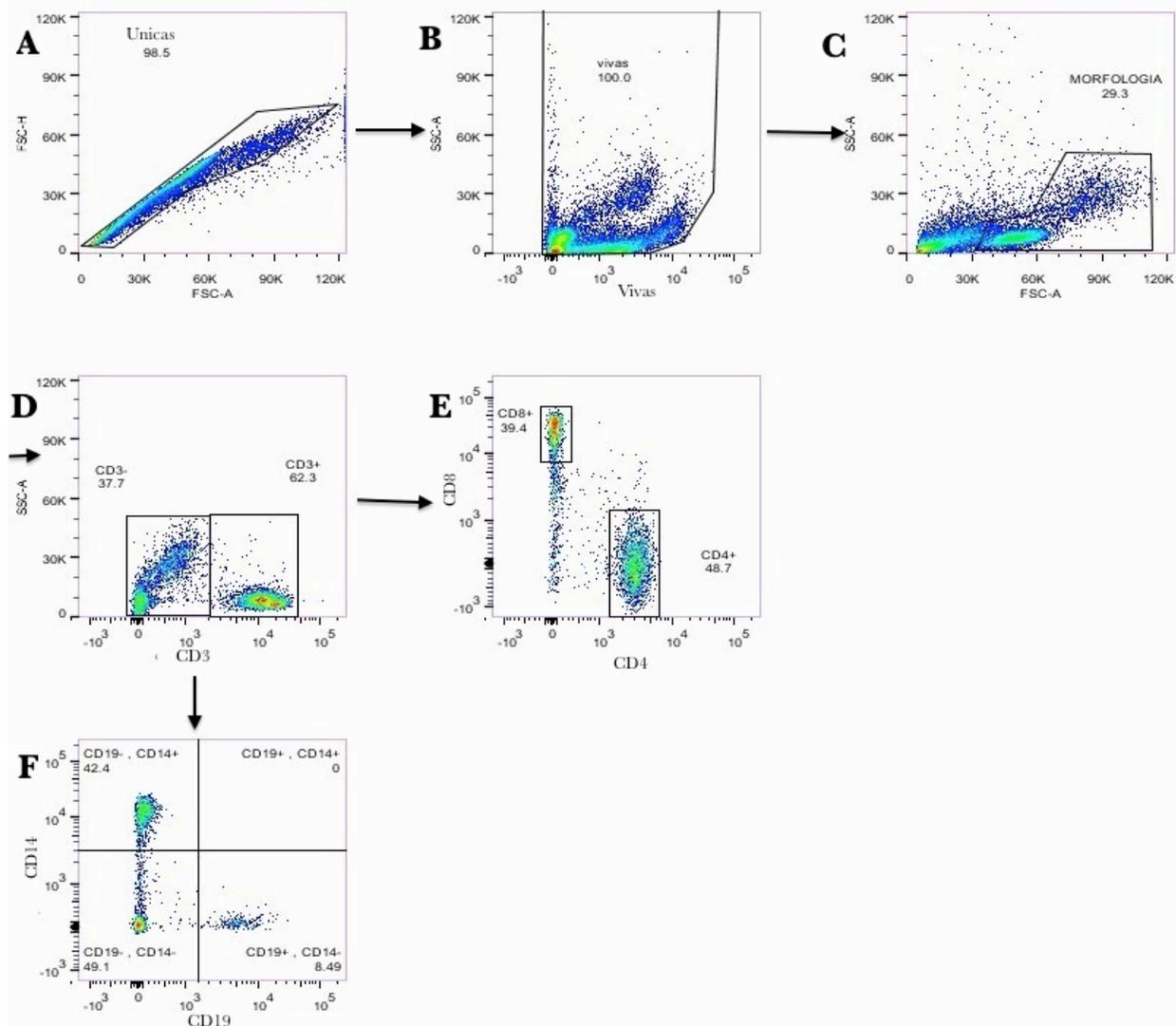
---

## 7 RESULTADOS

### 7.1 Separación de las diferentes estirpes celulares a partir de CMSP mediante citometría de flujo y enriquecimiento en cultivo.

Para caracterizar la expresión de las proteínas A3, así como las vías de reconocimiento y señalización implicadas en su expresión, se separaron las principales células sanguíneas y se cuantificó el ARNm de los diferentes genes. Se separaron 4 estirpes celulares (CD4+, CD8+, CD14+, y CD19+) de CMSP de las diferentes cohortes estudiadas, se empleó el siguiente análisis de citometría de flujo (Figura 27). Con las poblaciones ya identificadas, se prosiguió a separarlas en tubos.





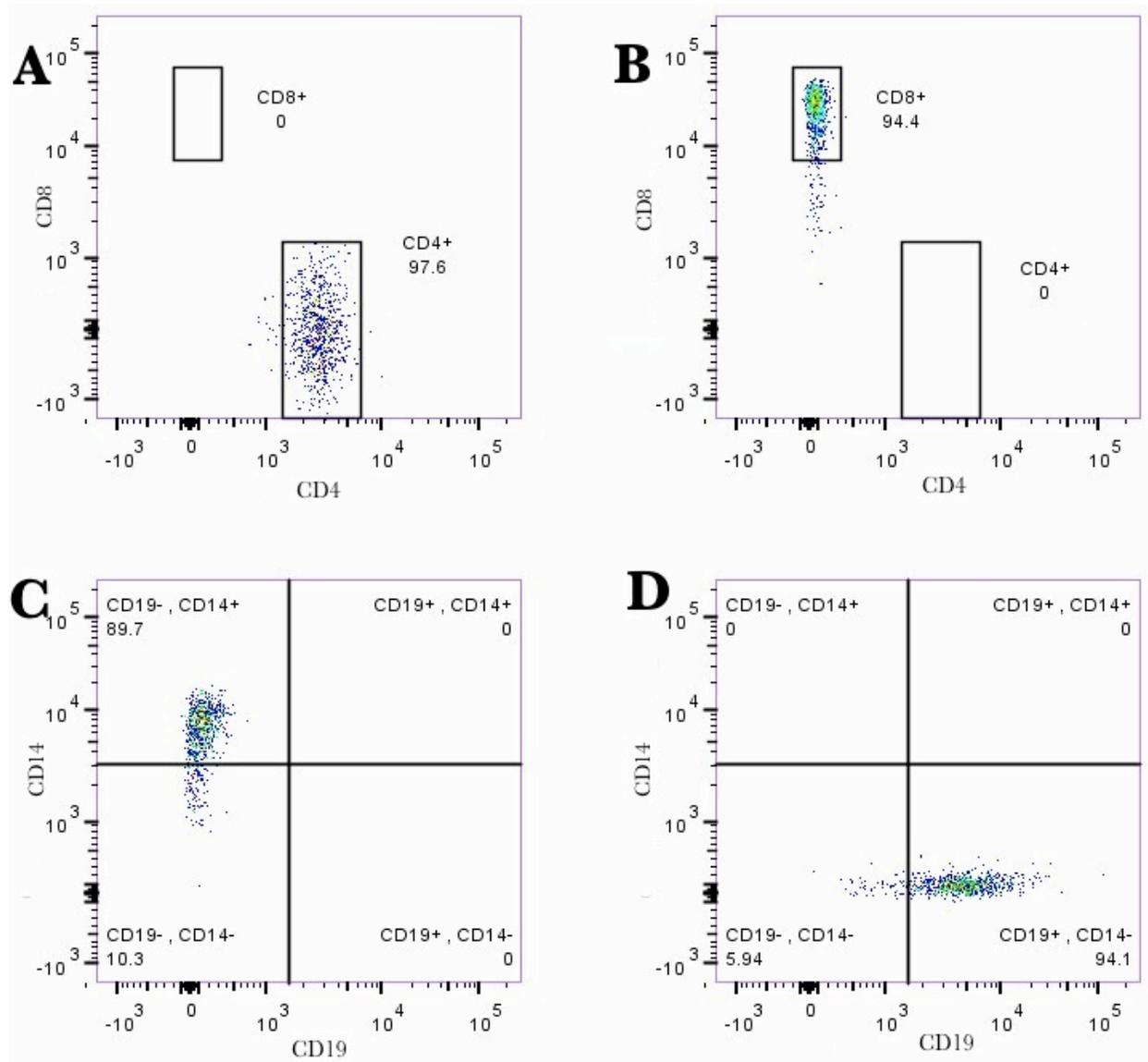
**Figura 27.** Ejemplo del análisis de citometría de flujo multiparamétrica para la identificación de 4 estirpes celulares (CD4, CD8, CD14 y CD19)

A) Se escogieron las células únicas en base a parámetros de tamaño celular, FSC-H vs FSC-A . B) Se escogieron las células vivas. C) Se selecciona la morfología de linfocitos y monocitos con ayuda de los parámetros tamaño y granularidad (SSC-A vs FSC-A). D) Se diferencian las células CD3+ de las CD3- (SSC-A vs CD3). E) De las células CD3+ se seleccionan las células CD8+ y las CD4+. F) Por otro lado, de las células CD3- se seleccionan células CD14+ y CD19+.

Se calculó la pureza de las células separadas, para cada una de las poblaciones seleccionadas. Para ello solo es necesario adquirir en el citometro de flujo las células ya separadas, donde se puede apreciar que tanta



contaminación de otras estirpes celulares hay en dicha separación. En la (Figura 28) se muestra un ejemplo de las purezas obtenidas para cada estirpe celular.

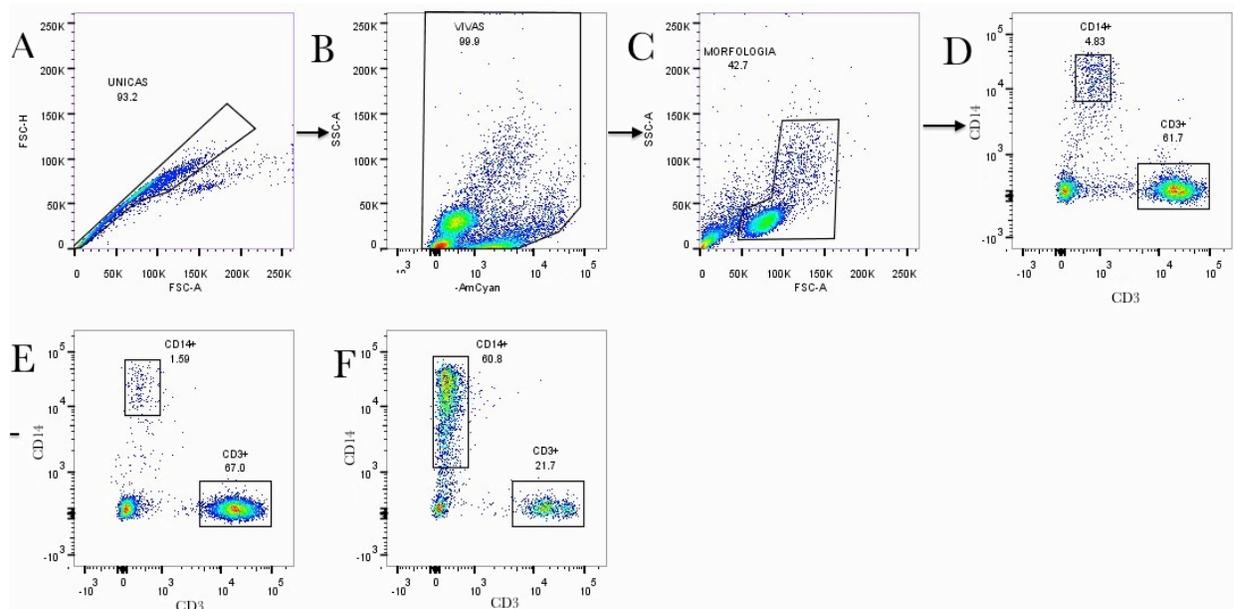


*Figura 28. Ejemplo de la determinación de pureza de las células separadas*

*A) Gráfico que representa la pureza de las células CD4+ (97.6%). B) Gráfico que representa la pureza de las células CD8+ (94.4%). C) Pureza de las células CD14+ (89.7%). D) Pureza de las células CD19+ (94.1%).*



Se obtuvo una alta pureza en cada estirpe celular separada por FACS, lo que nos permite tener confiabilidad en los resultados posteriores de estudios de expresión. Sin embargo, la cantidad de células CD14+ obtenidas no fueron suficientes, por lo tanto, fue necesario implementar un segundo método de obtención de dichas células. Éste se realizó mediante enriquecimiento de monocitos empleando adherencia plástica, metodología que se explica en 6.3.5 más atrás.



*Figura 29. Ejemplo de la determinación de pureza de monocitos.*

*Figura 2. A) se escogieron las células únicas. B) Se escogieron las células vivas. C) Se selecciona la morfología de linfocitos y monocitos con ayuda de los parámetros tamaño y granularidad (SSC-A vs FSC-A. D) Gráfico que representa el porcentaje de linfocitos y monocitos de las CMSP. E) Gráfico que representa el porcentaje de linfocitos y monocitos en los residuos de los lavados de placa de adherencia. F) Gráfico que representa el porcentaje entre linfocitos y monocitos del enriquecimiento de monocitos por la técnica de adherencia plástica.*

La pureza fue calculada con el siguiente análisis de citometría de flujo (Figura 29). El inicio de dicho análisis (La figura A, B y C) se realizó de la misma manera que en el análisis de citometría para separación celular. En la Figura 29.D Se representan los porcentajes de células CD3+ y de células CD14+



---

---

presentes en CMSP totales, y observamos una relación de 12.7 (linfocitos/monocitos), éstas son las células que utilizamos para enriquecer a los monocitos por la técnica de adherencia. En la Figura 29.E se representan los porcentajes de células CD3+ y de células CD14+ correspondientes a las células no adheridas a la placa de cultivo aquí observamos que la relación linfocitos/monocitos es de 42.1, mayor que en 29.D, es decir, hay una minoría de monocitos con respecto a los linfocitos, éstos monocitos no se adhirieron a la placa de cultivo. En la Figura 29.F se muestran los porcentajes de células CD3+ y de células CD14+ de las células adheridas a la placa de cultivo, aquí la relación (linfocitos/monocitos) disminuye notablemente a 0.35, es decir, hay una gran cantidad de monocitos con respecto a los linfocitos que permanecieron en la placa de cultivo, con ésta metodología obtuvimos 60% de monocitos.

## 7.2 Detección de la expresión del ARNm de la familia de genes APOBEC3G y de los genes de las vías de TLRs, RIG e Interferon

Una vez que las CMSP estuvieron separadas en estirpes celulares, se estimularon con diferentes ligandos de TLRs, así como la citocina interferón alfa (IFN- $\alpha$ ) (ver 4.5 Estimulación celular.). De cada una de las estirpes celulares se obtuvo el ADN complementario y se amplificaron 94 genes relacionados con las vías de TLR, RIG, Interferon y con la familia Apobec mediante PCR-tiempo real. La amplificación se realizó en el equipo BioMark™ HD System, Fluidigm. Los resultados se muestran en una matriz de 96 x 96 (ensayos x muestras)Figura 30.



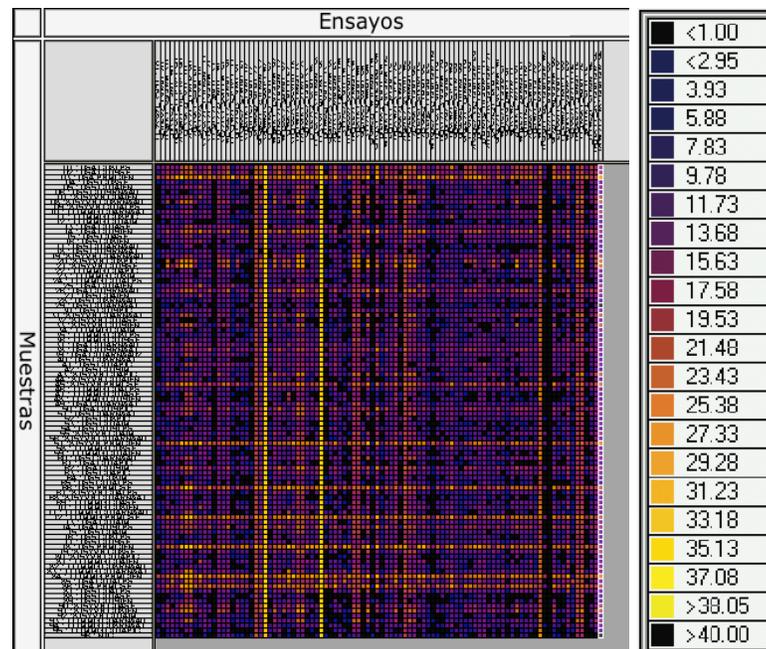


Figura 30. Matriz de resultados obtenida de la cuantificación de la expresión génica, por el equipo BioMark™ HD System, Fluidigm.

Las muestras se ilustran en el costado izquierdo, y los ensayos arriba de la matriz. Además, del lado derecho se muestra la escala de colores correspondiente a la expresión génica..

La lista de todos los genes cuantificados se muestran en el ANEXO A. Sin embargo, los genes de la vía TLR, los genes de la vía RIG no presentaron diferencias entre grupos. Por lo que graficamos los datos de expresión de los genes que presentaron diferencias significativas, principalmente en CMSP, células CD4+ y CD8+. Los genes seleccionados para el análisis en este trabajo de tesis se muestran en la Tabla 12.





Tabla 12. Lista de genes seleccionados para el análisis

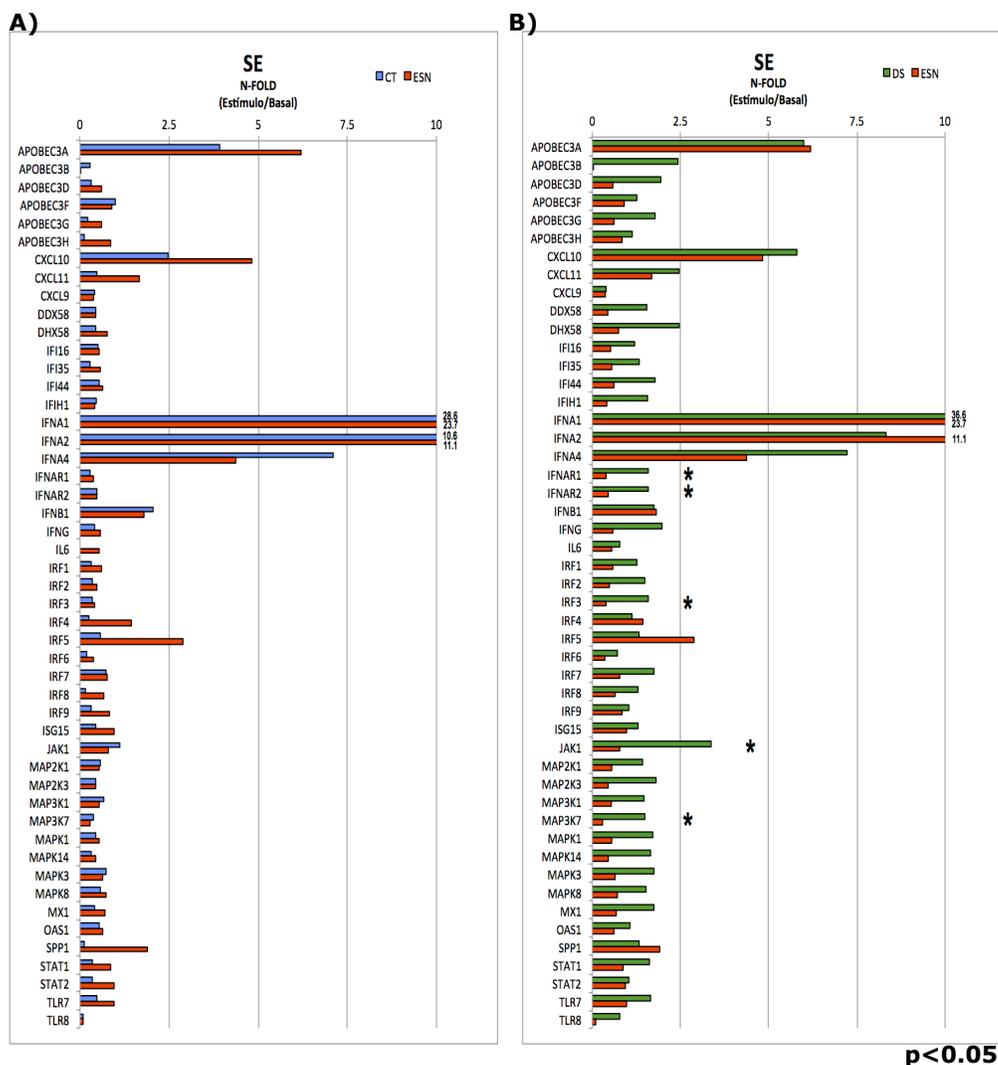
<b>GENES SELECCIONADOS</b>				
<b>APOBEC3A</b>	DHX58	IFNB1	IRF8	MAPK3
<b>APOBEC3B</b>	IFI16	IFNG	IRF9	MAPK8
<b>APOBEC3D</b>	IFI35	IL6	ISG15	MX1
<b>APOBEC3F</b>	IFI44	IRF1	JAK1	OAS1
<b>APOBEC3G</b>	IFIH1	IRF2	MAP2K1	SPP1
<b>APOBEC3H</b>	IFNA1	IRF3	MAP2K3	STAT1
<b>CXCL10</b>	IFNA2	IRF4	MAP3K1	STAT2
<b>CXCL11</b>	IFNA4	IRF5	MAP3K7	TLR7
<b>CXCL9</b>	IFNAR1	IRF6	MAPK1	TLR8
<b>DDX58</b>	IFNAR2	IRF7	MAPK14	

Cabe señalar que la expresión de ARNm de la mayoría de los genes estudiados en la cohorte de pacientes denominados progresores típicos se encontró con valores de expresión muy bajos en algunos genes como: A3B, A3G, A3H, IFNAR1, IFNAR2, IRF1, IRF2, IRF3, IRF4, IRF6, IRF8, entre otros, se encontró completamente abatida. Debido a esto, las comparaciones entre progresores típicos y las demás cohortes de pacientes no se muestran.

Para conocer la expresión basal del gen APOBEC3G y los genes implicados en su estimulación, así como el patrón de expresión en las distintas estirpes celulares sanguíneas se analizaron las células sin recibir estímulo alguno. En células T CD4+ (Figura 31B), los genes IFNAR1, IFNAR2 e IRF3, JAK1 y MAP3K7 presentaron mayor expresión en DS, comparados con los ESN.



**CD4**



*Figura 31. Gráficas comparativas entre cohortes, células TCD4 sin estímulo.*

*Se muestran gráficas que representan la expresión relativa (al gen constitutivo GAPDH) en el eje "x" de los genes mostrados en el eje "y" en células TCD4+. En el gráfico A) se muestran datos de expresión de ESN (barra de color rojo), comparados con los CT (barra de color azul). En el gráfico B) se muestran datos de expresión de ESN (barra de color rojo), comparado con los DS (barra de color verde).*

*\* Indican que hay una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos comparados*





## CD8

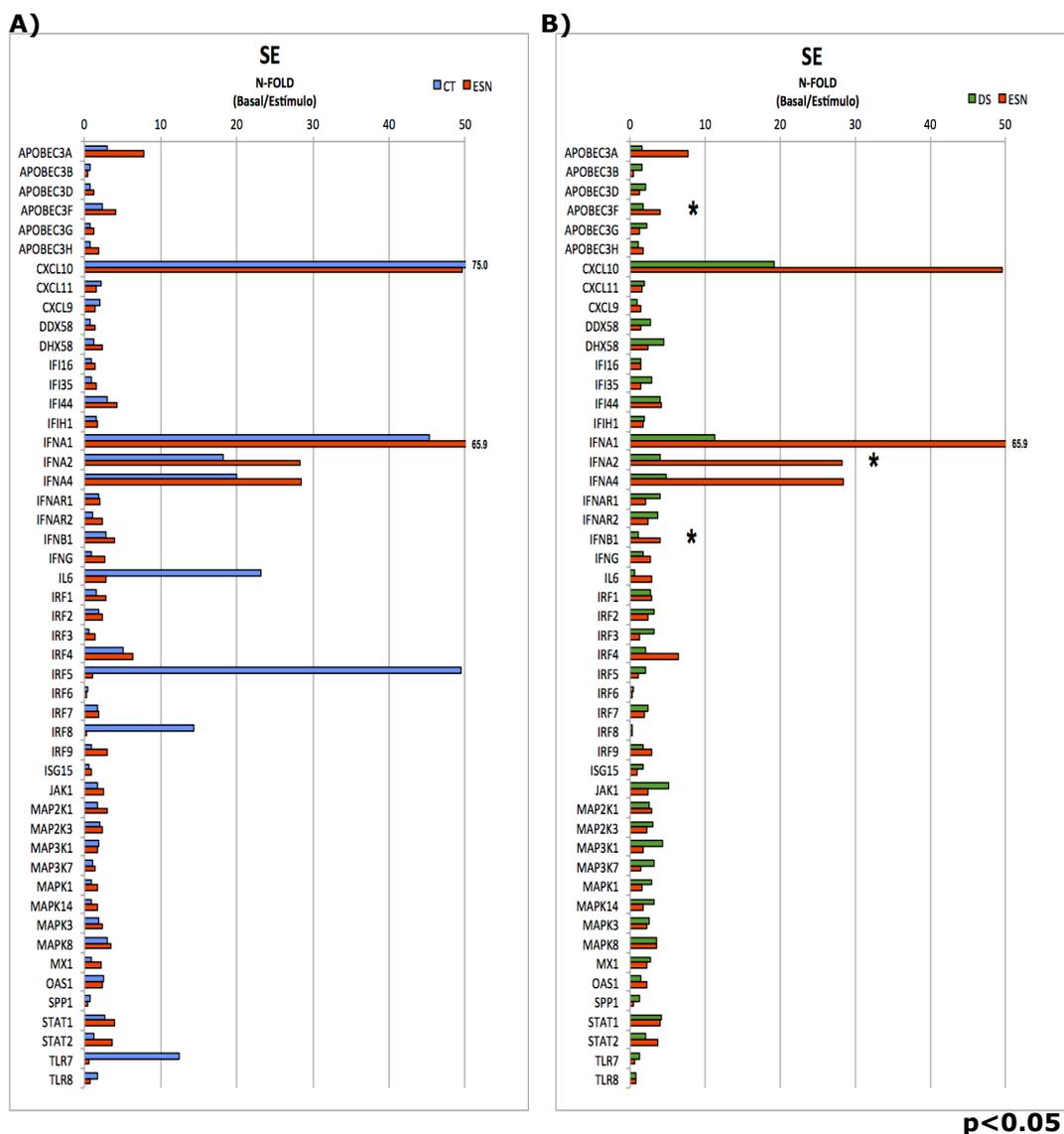


Figura 32. Gráficas comparativas entre cohortes, células TCD8+ sin estímulo

Se muestran gráficas que representan la expresión relativa (al gen constitutivo GAPDH) en el eje "x", de los genes mostrados en el eje "y" en células TCD8+. En el gráfico A) se muestran datos de expresión de ESN (barra de color rojo), comparados con los CT (barra de color azul). En el gráfico B) se muestran datos de expresión de ESN (barra de color rojo), comparado con los DS (barra de color verde).

\* Indican que hay una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos comparados





## CMSP

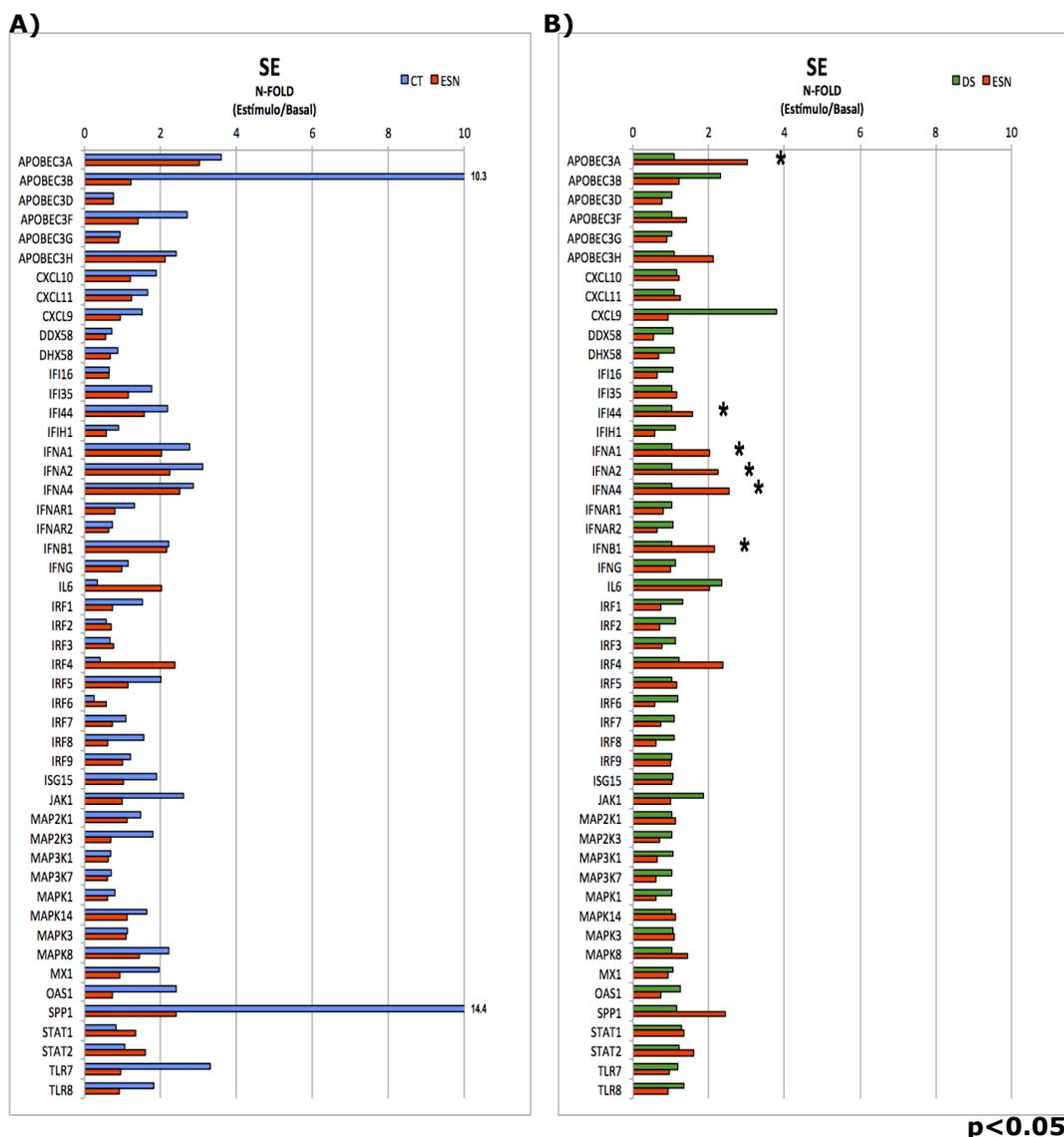


Figura 33. Gráficas comparativas entre cohortes, CMSP sin estímulo.

Se muestran gráficas que representan la expresión relativa (al gen constitutivo GAPDH) en el eje "x", de los genes mostrados en el eje "y" en células TCD8+. Ésta figura muestra los datos de CMSP A) comparando a la cohorte ESN (barras de color rojo) con CT (barras de color azul) y B) comparando a la cohorte ESN (barras de color rojo) con DS (barras de color verde).

\* Indican que hay una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos comparados.





---

---

No se observaron diferencias significativas entre la expresión de los ESN comparados con los CT tanto en T CD4+ (31.A), como en células T CD8+ (32.A) y en CMSP (33.A).

En células T CD8+ (Figura 32.B) los ESN presentaron mayor expresión en los genes APOBEC3F, IFNA2 e IFNB1; cuando fueron comparados con los DS. Mientras que en CMSP (Figura 33.B) los ESN presentaron mayor expresión en los genes APOBEC3A, IFI44, IFNA1, IFNA2, IFNA4 e IFNB1.

Por otro lado, se ha descrito que IFN- $\alpha$  es una citocina inducida en la respuesta inmune innata dirigida contra infecciones virales mediante múltiples mecanismos, como la inducción de ADAR1, una adenosin deaminasa que cataliza la modificación de un sustrato de ARN de adenosina a inosina, entre otros [154, 155]. Esto sugiere una potente influencia en otras deaminasas, como los miembros de la familia APOBEC3 [154]. Además, se ha reportado que una de las principales citocinas que estimula la producción de APOBEC3G es IFN por lo que decidimos estudiar la expresión de los genes antes mostrados (Tabla 12), pero bajo el estímulo de ésta citocina.

En la Figura 34 se muestran gráficas con datos de células CD4+ estimuladas con IFN- $\alpha$ . Podemos observar que hubo mayor expresión del gen IFNA2 en pacientes ESN que en DS (Figura 34.B), mientras que al comparar ESN con CT (Figura 34.A) no se observaron diferencias en la expresión. En contraste, cuando comparamos las células TCD8+ (Figura 35.A) de ESN con CT, se observa mayor expresión de los genes APOBEC3D y MAPK14 en ESN; mientras que al comparar ESN con DS (Figura 35.B) no se observan diferencias en la expresión.



**CD4**

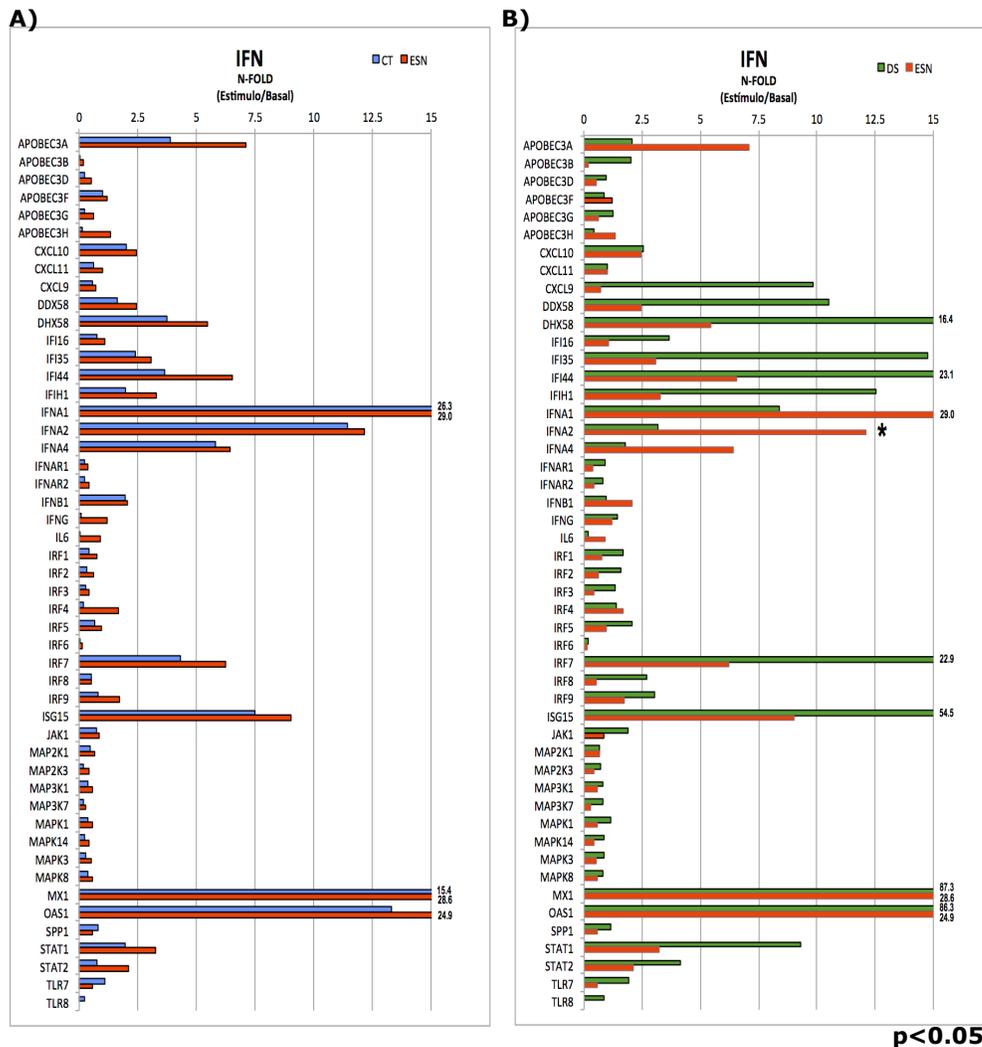


Figura 34. Gráficas comparativas entre cohortes, células T CD4+ estimuladas con IFN.

Se muestran gráficas que representan la expresión relativa (al gen constitutivo GAPDH) en el eje "x" de los genes mostrados en el eje "y" en células TCD4+. En el gráfico A) se muestran los datos de la cohorte ESN (barra de color rojo) comparados con CT (barra de color azul). En el gráfico B) se muestran los datos de la cohorte ESN (barra de color rojo) comparados con DS (barra de color verde).

\* Indican que hay una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos comparados.





## CD8

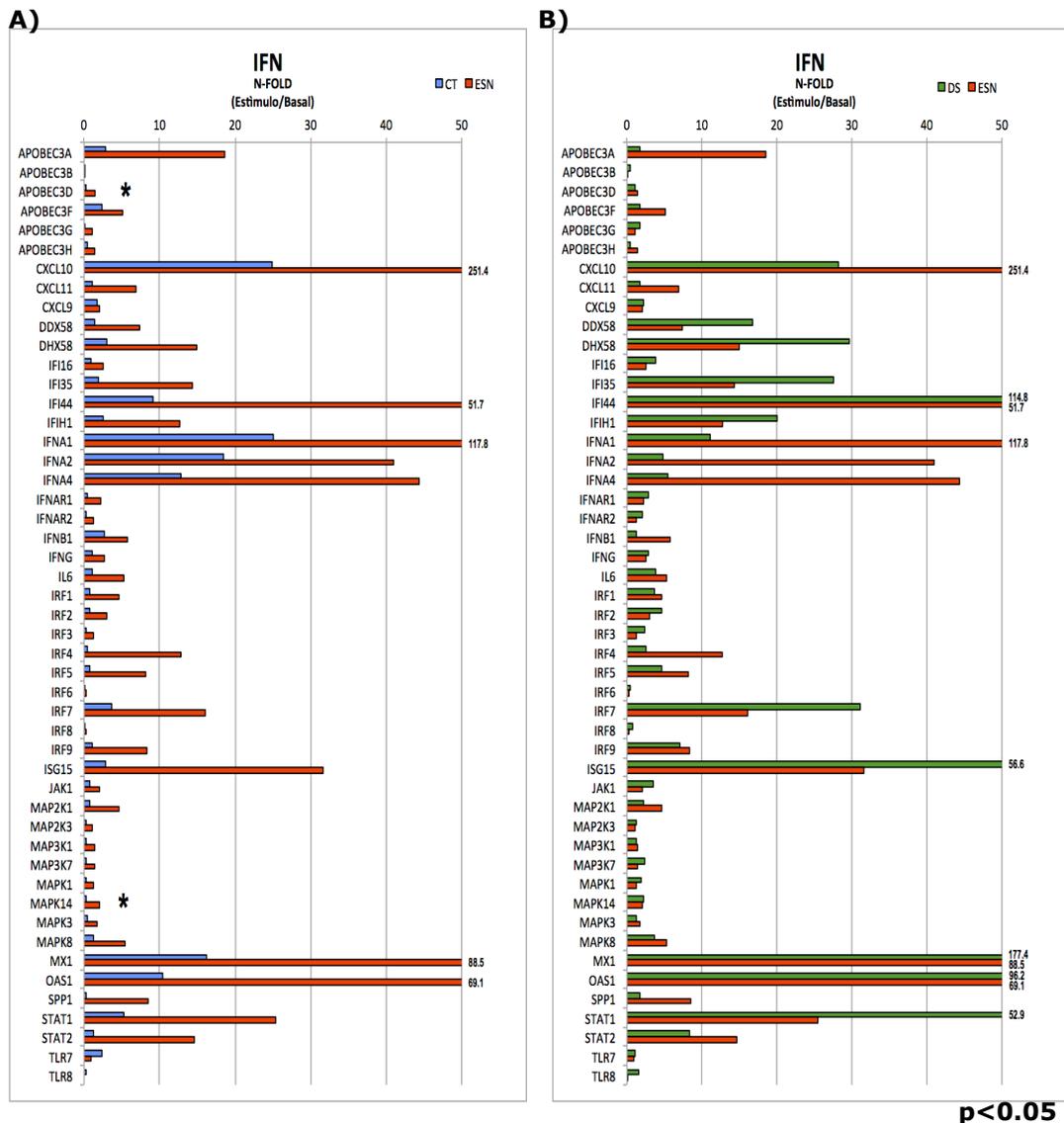


Figura 35. Gráficas comparativas entre cohortes, células T CD8+ estimuladas con IFN.

Se muestran gráficas que representan la expresión relativa (al gen constitutivo GAPDH) en el eje "x" de los genes mostrados en el eje "y" en células TCD4+. En el gráfico A) se muestran los datos de la cohorte ESN (barra de color rojo) comparados con CT (barra de color azul). En el gráfico B) se muestran los datos de la cohorte ESN (barra de color rojo) comparados con DS (barra de color verde).

\* Indican que hay una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos comparados.



**CMSP**

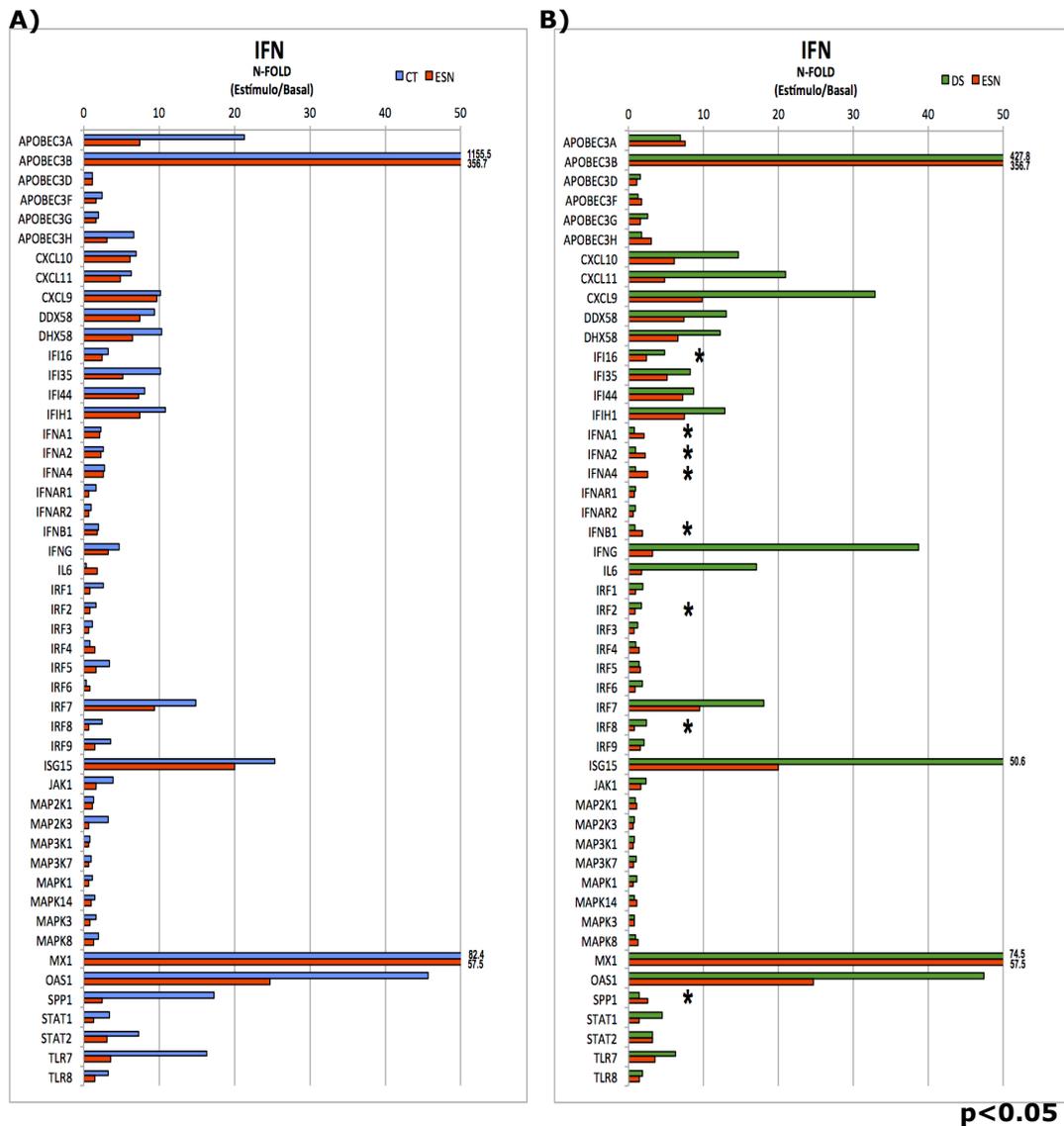


Figura 36. Gráficas comparativas entre cohortes, CMSP estimuladas con IFN.

Se muestran gráficas que representan la expresión relativa (al gen constitutivo GAPDH) en el eje "x" de los genes mostrados en el eje "y" en células CMSP. En el gráfico A) se muestran los datos de la cohorte ESN (barra de color rojo) comparados con CT (barra de color azul). En el gráfico B) se muestran los datos de la cohorte ESN (barra de color rojo) comparados con DS (barra de color verde).

\* Indican que hay una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos comparados.





Al observar la expresión en CMSP Figura 36, observamos que los ESN (Figura 36.B) tienen mayor expresión en los genes IFI16, IFNA1, IFNA2, IFNA4, INFB1, IRF2, IRF8 y SPP1 con respecto a los DS; mientras que al comparar ESN con CT (Figura 36.A) no se observa alguna diferencia en sus expresiones.

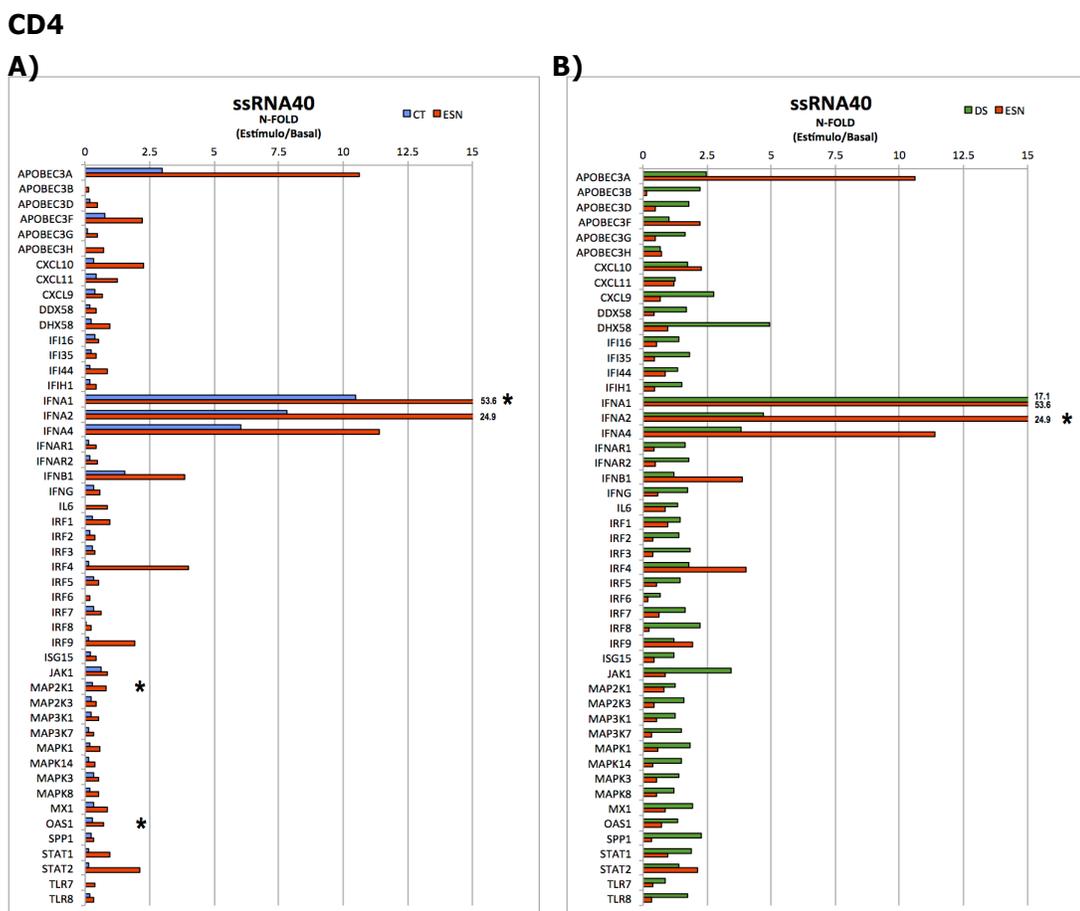


Figura 37. Gráficas comparativas entre cohortes, células TCD4+ estimuladas con ssRNA40.

Se muestran gráficas que representan la expresión relativa (a un gen constitutivo GAPDH) en el eje "x" de los genes mostrados en el eje "y". En el gráfico A) se compara la expresión en la cohorte ESN (barras color rojo) con la expresión de los CT (barras color azul) de células estimuladas con ssRNA40 y en el gráfico B), se compara la cohorte ESN (barras de color rojo) con la cohorte DS (barras de color verde) de células estimuladas con ssRNA40.

\* Indican que hay una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos comparados.





---

---

Sin embargo, IFN- $\alpha$  no es la única molécula que podría inducir la expresión de APOBEC3G. En estudios anteriores se ha visto que la exposición de CMSP a VIH, aumenta la expresión de IFN mediante la estimulación de TLR7 y 8, y ésta a su vez aumenta la expresión de APOBEC3G principalmente. De manera que para poder observar si el VIH-1 *per se* es capaz de inducir la expresión de A3G, nosotros estimulamos las células con una cadena sencilla de ARN análogo viral rico en GU (ssRNA40). En las Figura 37 se muestran los resultados de células T CD4+ donde, (Figura 37.A) se observa mayor expresión de los genes IFNA1, MAP2K1 y OAS1 en la cohorte ESN con respecto a la expresión de CT. Mientras que en (Figura 37.B) se observa mayor expresión de IFNA2 en ESN que en DS.

Algo muy interesante pasa con las células TCD8+ estimuladas con ssRNA40 cuyos datos de expresión se muestran en la Figura 38, ya que no se observa ninguna diferencia en las expresiones entre cohortes, pero la tendencia se mantiene muy similar a la observada en células TCD4+.





## CD8

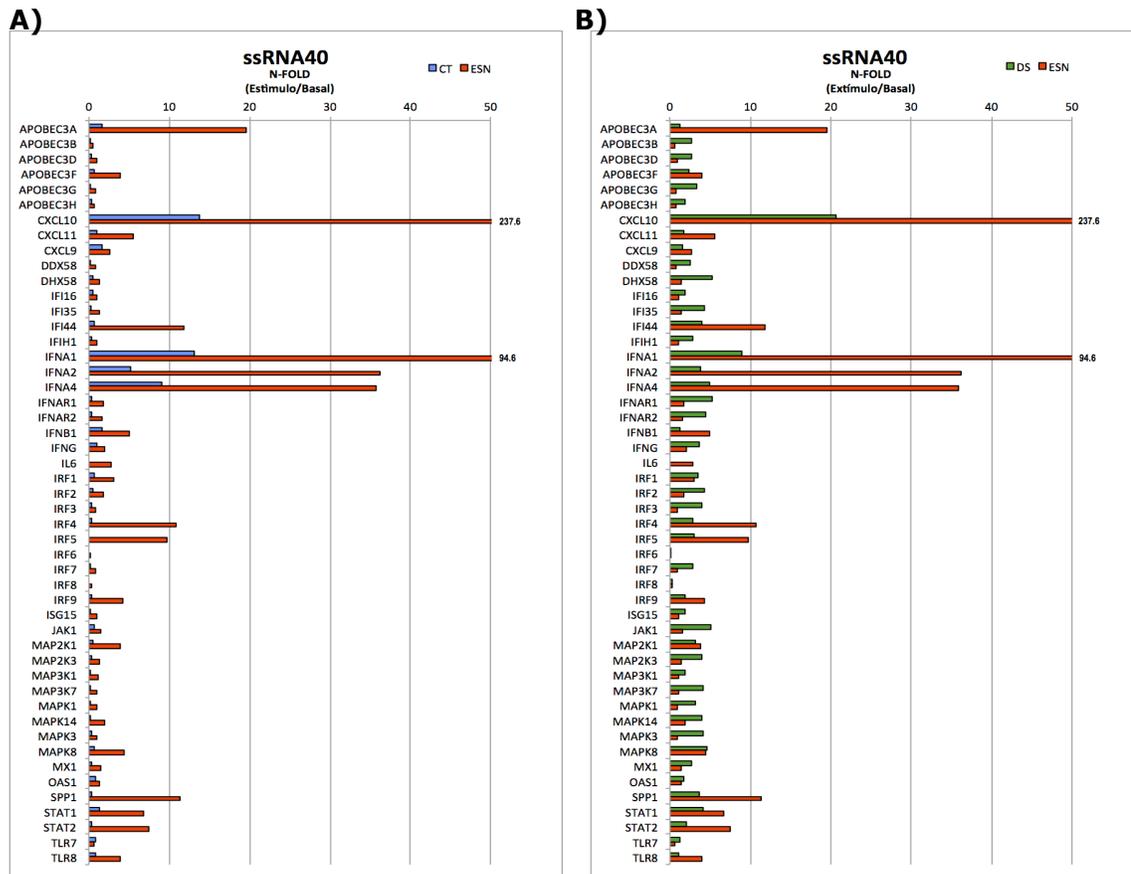


Figura 38 Gráfica comparativas entre cohortes, células TCD8+ estimuladas con ssRNA40

En el gráfico A) se compara la expresión en la cohorte ESN (barras color rojo) con la expresión de los CT (barras color azul) de células estimuladas con ssRNA40, en el gráfico B, se compara la cohorte ESN (barras de color rojo) con la cohorte DS (barras de color verde) de células estimuladas con ssRNA40.

\* Indican que hay una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos comparados.

Sin embargo cuando se comparan las expresiones de los genes en células TCD4+ (Figura 40) y TCD8+ (Figura 41) estimuladas con ssRNA40 versus las células estimuladas con ssRNA41, su control negativo, no se observa ninguna diferencia significativa.





---

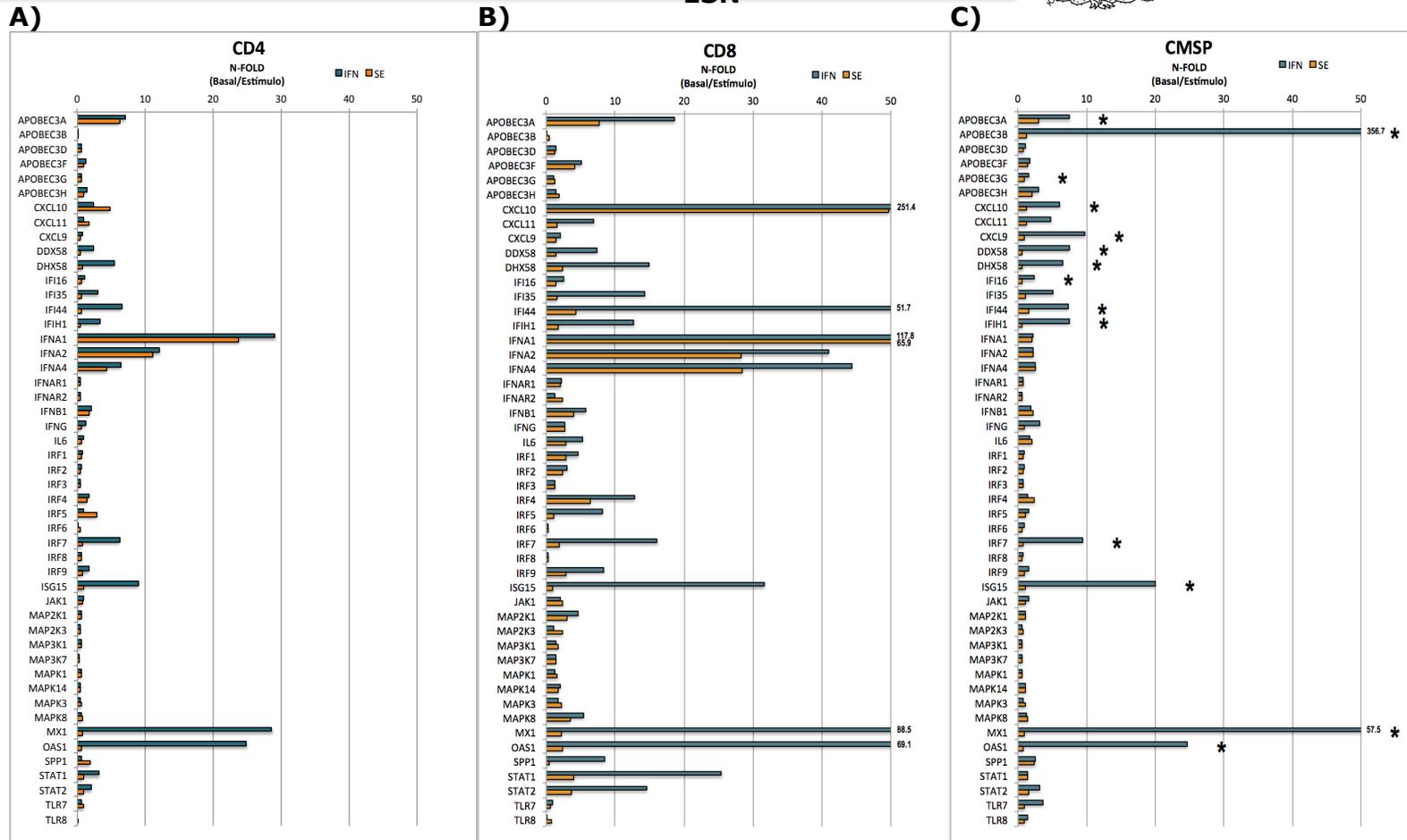
---

Con la finalidad de visualizar mejor la inducción de la expresión génica producida por la citocina IFN (Figura 39), tomamos como referencia datos de las células de ESN, siendo ellos la cohorte de mayor interés en éste estudio y los comparamos con la expresión basal en CMSP de dichos genes (Figura 39.C). Observamos clara diferencia en genes como ISG15, MX1, OAS1, IRF7, IFI44, IFI16, DHX58, DDX58, CXCL9, CXCL10, APOBEC3G, APOBEC3B y APOBEC3A. La misma comparación se realizó para visualizar la inducción de IFN en linfocitos TCD4+ (Figura 39.A) y TCD8+ (Figura 39.B) donde, aunque no se encontraron diferencias significativas, la tendencia es muy similar que en CMSP.





ESN



p<0.05

Figura 39. Gráfica representativa de la expresión inducida por IFN en linfocitos TCD4+ CD8+ y CMSP de ESN.

Se muestran gráficas que representan la expresión relativa (a un gen constitutivo GAPDH) en el eje "x" de los genes mostrados en el eje "y", donde se puede observar la expresión de los genes sin estimulación previa (barras de color naranja) y su inducción producida por IFN (barras de color azul) en A) células TCD4+, B) células TCD8+ y C) CMSP tomadas de la cohorte ESN. \* Indican que hay una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos comparados.





CD4

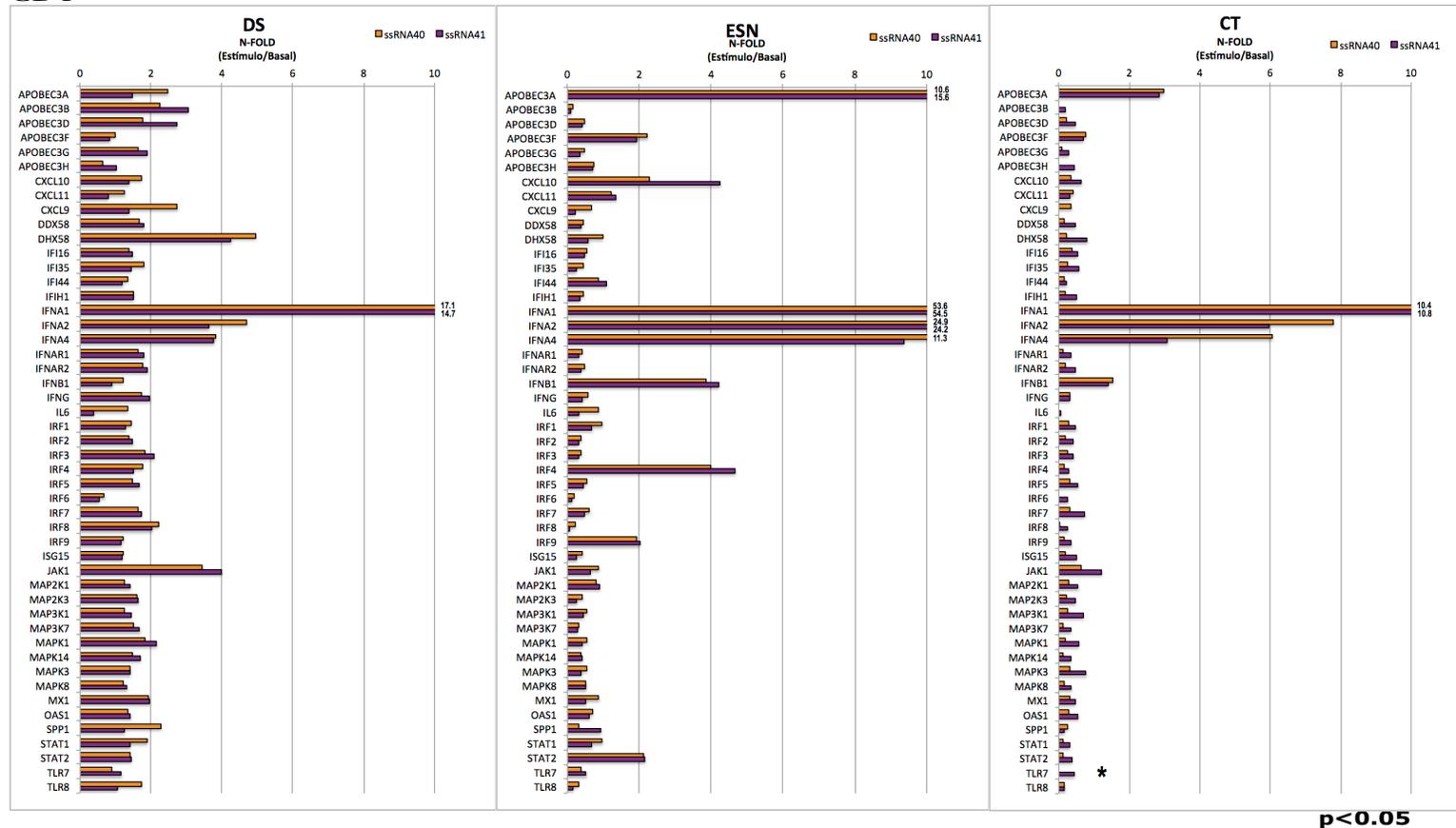


Figura 40. Gráfica representativa de la expresión inducida por ssRNA40 comparada con la expresión de su control negativo ssRNA41, en linfocitos TCD4+ de las cohortes: DS, ESN y CT.

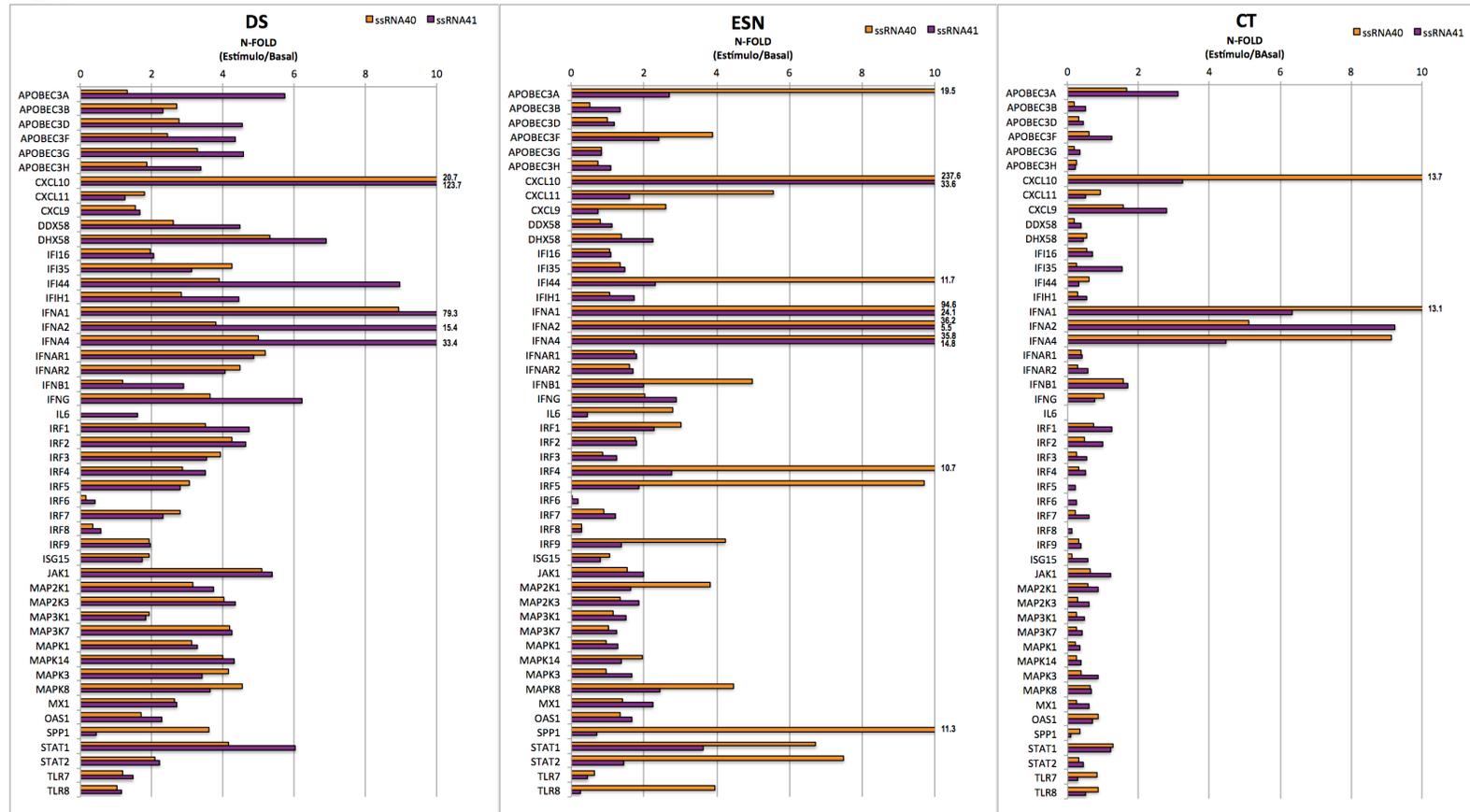
Se muestran gráficas que representan la expresión relativa (a un gen constitutivo GAPDH) en el eje "x" de los genes mostrados en el eje "y", donde se puede observar la expresión de los genes estimulados con ssRNA40 (barras de color naranja) y la expresión de su control negativo ssRNA41 (barras de color magenta) en células T CD4+ de las cohortes A) DS, B) ESN y C) CT.

\* Indican que hay una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos comparados.





CD8



p<0.05

Figura 41. Gráfica representativa de la expresión inducida por ssRNA40 comparada con la expresión de su control negativo ssRNA41, en linfocitos TCD8+ de las cohortes: DS, ESN y CT.

Se muestran gráficas que representan la expresión relativa (a un gen constitutivo GAPDH) en el eje "x" de los genes mostrados en el eje "y", donde se puede observar la expresión de los genes estimulados con ssRNA40 (barras de color naranja) y la expresión de su control negativo ssRNA41 (barras de color magenta) en células T CD8+ de las cohortes A) DS, B) ESN y C) CT.

\* Indican que hay una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos comparados.





---

---

## 8 ANÁLISIS DE RESULTADOS

Se ha reportado que posterior a la unión de IFN con sus respectivos receptores celulares, se activa la cinasa JAK1, seguida por la fosforilación y activación de STAT1 y STAT2 asociado con el factor regulador de IFN 9 (IRF9). Éstos últimos comprenden el complejo ISGF3 (IFN-stimulated gene factor 3) que migra al núcleo, donde se une a elementos de respuesta a IFN (ISRE) en los promotores de genes estimulados por IFN (ISG), tales como A3 [156-158].

En éste contexto diversos estudios apuntan a que IFN induce la expresión de miembros de la familia APOBEC, en células dendríticas [51, 157, 159] y en células del sistema nervioso central [160]. Incluso afirman que A3G es miembro del sistema IFN[127]. Sin embargo, también hay otros estudios donde la expresión de miembros de la familia A3 fueron pobremente inducidos por IFN[161] en ciertas estirpes celulares, de hecho, en linfocitos T no se ha observado tal inducción [129, 162, 163].

En nuestro estudio logramos observar una mínima inducción en la expresión de A3G producida por IFN en CMSP (39.C) la cual se pierde en linfocitos TCD4+ (39.A) y en linfocitos TCD8+ (39.B). Sin embargo, en ESN si logramos observar la inducción de otros ISGs como MX1, OAS1 e ISG15 (39.C) ; también en genes que codifican para factores reguladores de IFN como IRF7; y en genes que codifican para proteínas inducidas por IFN como IFI16, IFI44, IFIH1, CXCL10 y CXCL9. Los anteriores genes inducidos por IFN en CMSP, mantienen la misma tendencia de expresión en células TCD4+ (39.A) y CD8+ (39.B) aunque la diferencia no alcanza a ser significativa. De manera que la activación de ciertos genes, inducida por IFN se pierde al separar a las CMSP en estirpes celulares, lo que indica que la interacción de células más





---

---

complejas como células dendríticas, monocitos, macrófagos, etc. y todo el microambiente que ellas proporcionan, es necesario para dicha inducción.

Éstos resultados sugieren que algunas vías de señalización mediadas por IFN- $\alpha$  son funcionales y que existe algún otro mecanismo por el cual se pueda inducir la expresión de A3G en específico. Con IFN logramos ver notable inducción en A3A y A3B en CMSP (39.C), mientras que en los linfocitos T (39.A y B) la tendencia sólo se mantiene para A3A, es decir, la inducción de A3G y A3B se pierde al separar las células en estirpes celulares.

Anteriormente se habían estudiado los factores involucrados en la cascada de señalización de TLRs en una cohorte similar [139]. Sin embargo los genes analizados sólo se limitaron a las vías de TLR y no estudiaron otras vías, ni analizaron las vías de TLR en otras cohortes de pacientes. En nuestro estudio comparamos la expresión de estos genes en la cohorte de ESN con otras cohortes de individuos VIH positivos como los denominados controladores.

En este sentido al estudiar las CMSP estimuladas con IFN (Figura 36.B), se observan diferencias entre las cohortes DS y ESN en la expresión de los genes que codifican para proteínas inducibles por esta citocina como IFI16; así como en genes que codifican para diferentes tipos de IFN como IFNA1, IFNA2, IFNA4, IFNB1; en genes que codifican para genes reguladores de IFN como IRF2 e IRF8, e incluso de citocinas que sobre expresan a IFN como SPP1. De los genes anteriores, sólo IRF8, IRF2, e IFI16 muestran mayor expresión en los DS, en todos los demás genes la expresión es mayor en los ESN.

Se sabe que las proteínas reguladoras de IFN (IRF2 y 8) [164], actúan como represores transcripcionales, por ejemplo IRF2 inhibe competitivamente la activación transcripcional mediada por IRF1, ya que ambos se unen a la misma secuencia de nucleótidos[165]. Nuestros resultados indican que los IRF





---

---

represores se expresan más en DS que en ESN, siendo una posible explicación para la mayor expresión de SPP1 y de los interferones en los ESN que en los DS. Sin embargo, la expresión de A3G no se ve favorecida con IFN en ESN con respecto a DS, pero si se puede observa mayor expresión de otros ISGs como MX1, OAS1, ISG15 en DS que en ESN. De hecho en ninguna de las cohortes se observó una gran expresión de A3G con el estímulo de IFN, esto sugiere que existe otro mecanismo adicional por el cual se induzca la expresión de A3G.

Con respecto a la cohorte de CT (Figura 36.A), no se encontró diferencia significativa en la expresión de estos genes en comparación con ESN, lo cual muestra que ambos expresan un fenotipo muy similar, que por las características de cada cohorte podríamos asumir que tienen un fenotipo “protector” similar.

Cuando se analizan las células TCD4+ y células TCD8+ de las cohortes estudiadas, observamos la misma tendencia que en CMSP, aunque las diferencias no alcanzan a ser significativas (Figura 34 y Figura 35).

Por otro lado, en estudios anteriores se encontraron que el ARN del VIH-1, estimula células del sistema inmune innato como dendríticas, macrófagos y células NK[166] mediante la activación de TLR7 y 8 [52]. De manera que para poder observar si el VIH-1 *per se* es capaz de inducir la expresión de A3G, nosotros estimulamos las células con una cadena sencilla de ARN análogo viral rico en GU y es comparado con la cadena ssRNA41 la cual es una cadena sencilla rica en adeninas quien funge como control negativo de ssRNA40.

Se ha descrito que tanto TLR7 como 8 son dependientes de MYD88 y llevan a una respuesta inflamatoria mediada por MAPK-NFκB principalmente, sin embargo se ha visto que activan a IRF7 para favorecer la producción de IFN





---

---

tipo I mediante TRIF, y a IRF5 mediante TRAF6 en pDC para activar de igual forma la producción de IFN tipo I [49].

Sin embargo, no logramos observar la inducción de A3G pero si A3A, lo cual, de nueva cuenta, nos indica que puede existir un mecanismo diferente y específico para inducir la expresión de A3G.

Sin embargo, cuando se compara la expresión génica en células TCD4+ (Figura 40) y TCD8+(Figura 41) estimuladas con el análogo viral (ssRNA40) versus su control negativo (ssRNA41) no se observa ninguna diferencia estadísticamente significativa entre ellas, es decir, el genoma viral *per se* es incapaz de inducir la expresión de genes de familia APOBEC ni de IFN- $\alpha$ .

## 9 CONCLUSIONES

Metodológicamente, logramos obtener células con muy buena viabilidad (80%) de muestras congeladas desde, al menos, 5 años antes; de cuatro diferentes cohortes de pacientes (ESN, CT, PT, DS) del Centro de Investigación de Enfermedades Infecciosas del INER.

Dichas células fueron exitosamente separadas mediante citometría de flujo multiparamétrica acoplado a FACS, ésta metodología utiliza tecnología de punta, ya que además de cuantificar diferentes parámetros como lo hace la citometría de flujo, el FACS separa una por una, físicamente a aquellas células pertenecientes a una población de interés, de forma rápida, cuantitativa, eficiente, con alta pureza y a demás con excelente viabilidad, permitiendo a su vez, subsecuentes análisis de expresión en dicha población de interés.





---

---

Gracias a esto, logramos estimular a las subpoblaciones celulares de manera eficiente con diferentes estímulos como IFN- $\alpha$  y análogos del ARN del VIH-1.

Cuantificamos la expresión de hA3G, así como de diferentes genes involucrados en la cascada de señalización de TLRs y RIG-1, en cada una de las estirpes celulares en estado basal y con análogos de TLR correspondientes. Esto lo realizamos mediante RT-PCR en la plataforma, BioMark™HD System (Fluidigm®) la cual ofrece una capacidad para realizar 9216 reacciones de RT-PCR de forma cuantitativa en un solo experimento.

Nuestros resultados demostraron que las células de las personas expuestas seronegativas presentan una mayor expresión de genes de Interferón y de genes de respuesta como A3F y A3A, en estado basal y con estímulos de Interferón. Además se observó que en contacto con el análogo del genoma del VIH-1 (ssRNA40) la cohorte ESN sobre-expresan los genes de IFNs lo que nos podría indicar un posible mecanismo protector de este tipo de personas frente al Virus de Inmunodeficiencia Humana.

En el caso de APOBEC3G, la baja estimulación por medio de IFN nos sugiere que probablemente existe otro estímulo adicional para aumentar la expresión de A3G.





## 10 ANEXO A

### GENES CUANTIFICADOS

APOBEC3A	DDX3X	IL12A	MAP2K3	SPP1
APOBEC3B	DDX58	IL12B	MAP3K1	STAT1
APOBEC3D	DHX58	IL15	MAP3K7	STAT2
APOBEC3F	ELK1	IL1B	MAPK1	TBK1
APOBEC3G	FADD	IL6	MAPK14	TICAM1
APOBEC3H	FOS	IL8	MAPK3	TLR3
ATG5	HPRT1	IRAK1	MAPK8	TLR4
AZI2	HSP90AB1	IRF1	MAVS	TLR7
CASP10	IFI16	IRF2	MX1	TLR8
CASP8	IFI35	IRF3	MYD88	TLR9
CCL3	IFI44	IRF4	NFAT5	TNF
CCL5	IFIH1	IRF5	NFATC1	TRAF3
CD40	IFNA1	IRF6	NFATC2	TRAF6
CD80	IFNA2	IRF7	NFATC3	TRIM25
CD86	IFNA4	IRF8	NFATC4	TRIM5
CHUK	IFNAR1	IRF9	NFKB1	
CXCL10	IFNAR2	ISG15	NFKBIA	
CXCL11	IFNB1	JAK1	OAS1	
CXCL9	IFNG	JUN	RELA	
DAK	IKBKB	MAP2K1	RIPK1	

## 11 BIBLIOGRAFÍA

1. CDC. Pneumocystis Pneumonia-- Los Angeles. In: *Morbidity and Morbidity Weekly Report*; 1981.
2. CDC. Thirty Years of HIV--1981--2011. In: *Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)*; 2011.
3. Grmek M. UN FLAGELO DE NUESTRA ÉPOCA. In: *Historia del SIDA*. Edited by editores SX. Primera ed; 1992.
4. Vézinet-Brun; C. Rouzioux; W. Rozenbaum; L. Montagnier FB-SJCCFRMTNSCJGCDCA-BF. Isolation of a T-Lymphotropic Retrovirus from a Patient at Risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). *Science* 1983,**220**:868-871.
5. ONUSIDA. Como llegar a cero: Más rápido. Más inteligente. Mejor. In; 2011.
6. UNAIDS. El sida en cifras. 2013.
7. UNAIDS. Informe sobre la epidemia mundial de sida 2013. 2013.





8. CENSIDA. VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE CASOS DE VIH/SIDA EN MÉXICO REGISTRO NACIONAL DE CASOS DE SIDA ACTUALIZACION AL CIERRE DE 2013. 2013.
9. David M.Knipe PMH. Retroviridae: The Retroviruses and Their Replication. In: *Fields Virology*. Edited by Goff SP. 5th ed. Philadelphia, PA 19106 USA; 2007. pp. 1999.
10. David M.Knipe PMH. HIVs and Their Replication. In: *Fields Virology*. Edited by Eric O. Freed MAM. 5th ed. Philadelphia, PA 19106 USA; 2007. pp. 2113.
11. Levy JA. *EL VIH y la patogénesis del SIDA*. México .D.F; 2008.
12. Alan D. Frankel JATY. HIV-1: Fifteen Proteins and an RNA. *Annual Reviewa Biochemical* 1998,**67**:1-25.
13. M Caffrey MC, J Kaufman, S J Stahl, P T Wingfield, D G Covell, A M Gronenborn, and G M Clore. Three-dimensional solution structure of the 44 kDa ectodomain of SIV gp41. *EMBO J* 1998,**17**:4572-4584.
14. Liu J, Zheng Q, Deng Y, Cheng C-S, Kallenbach NR, Lu M. A seven-helix coiled coil. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2006,**103**:15457-15462.
15. Turner BG, Summers MF. Structural biology of HIV. *Journal of Molecular Biology* 1999,**285**:1-32.
16. Wyatt R KP, Desjardins E, Sweet RW, Robinson J, Hendrickson WA, Sodroski JG. The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. *Nature* 1998,**393**.
17. Choe H, Farzan M, Sun Y, Sullivan N, Rollins B, Ponath PD, *et al*. The Chemokine Receptors CCR3 and CCR5 Facilitate Infection by Primary HIV-1 Isolates. *Cell* 1996,**85**:1135-1148.
18. Gorry P, Ancuta P. Coreceptors and HIV-1 Pathogenesis. *Curr HIV/AIDS Rep* 2011,**8**.
19. Mild M, Kvist A, Esbjörnsson J, Karlsson I, Fenyö EM, Medstrand P. Differences in molecular evolution between switch (R5 to R5X4/X4-tropic) and non-switch (R5-tropic only) HIV-1 populations during infection. *Infection, Genetics and Evolution* 2010,**10**:356-364.
20. Doms RW, Trono D. The plasma membrane as a combat zone in the HIV battlefield. *Genes & Development* 2000,**14**:2677-2688.
21. Greene WC. Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy. *Nat Med* 2002,**8**:673-680.
22. L Scherer JJRaMSW. HIV life cycle. In. Edited by infection PapR-btftoH; 2007.
23. Sarafianos SG, Das K, Tantillo C, Clark AD, Ding J, Whitcomb JM, *et al*. Crystal structure of HIV-1 reverse transcriptase in complex with a polypurine tract RNA:DNA. *EMBO J* 2001,**20**:1449-1461.
24. Lewin B. *Genes VIII*. VIII ed. United States of America; 2004.
25. Chen JC-H, Krucinski J, Miercke LJW, Finer-Moore JS, Tang AH, Leavitt AD, *et al*. Crystal structure of the HIV-1 integrase catalytic core and C-terminal domains: A model for viral DNA binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2000,**97**:8233-8238.





- 
- 
26. Park SH, Mrse AA, Nevzorov AA, Mesleh MF, Oblatt-Montal M, Montal M, *et al.* Three-dimensional Structure of the Channel-forming Trans-membrane Domain of Virus Protein "u" (Vpu) from HIV-1. *Journal of Molecular Biology* 2003,**333**:409-424.
  27. Geyer M, Munte CE, Schorr J, Kellner R, Kalbitzer HR. Structure of the anchor-domain of myristoylated and non-myristoylated HIV-1 Nef protein. *Journal of Molecular Biology* 1999,**289**:123-138.
  28. Arold S, Franken P, Strub M-P, Hoh F, Benichou S, Benarous R, *et al.* The crystal structure of HIV-1 Nef protein bound to the Fyn kinase SH3 domain suggests a role for this complex in altered T cell receptor signaling. *Structure* 1997,**5**:1361-1372.
  29. Hoffman R, and Kamps. *HIV Medicine*; 2005.
  30. David M. Knipe PMH. HIV-1: Pathogenesis, Clinical Manifestations, and Treatment. In: *Fields Virology*. Edited by Daniel R. Kuritzkes BDW. 5th ed. Philadelphia, PA 19106 USA; 2007. pp. 2187.
  31. Keele BF, Giorgi EE, Salazar-Gonzalez JF, Decker JM, Pham KT, Salazar MG, *et al.* Identification and characterization of transmitted and early founder virus envelopes in primary HIV-1 infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2008,**105**:7552-7557.
  32. Nelson PW, Mittler JE, Perelson AS. Effect of Drug Efficacy and the Eclipse Phase of the Viral Life Cycle on Estimates of HIV Viral Dynamic Parameters. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 2001,**26**:405-412.
  33. Uniprot. Q9NNX6 (CD209\_HUMAN). In. <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9NNX6>; 2012.
  34. McMichael AJ, Borrow P, Tomaras GD, Goonetilleke N, Haynes BF. The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nat Rev Immunol* 2010,**10**:11.
  35. Geijtenbeek TBH, Kwon DS, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GCF, Middel J, *et al.* DC-SIGN, a Dendritic Cell Specific HIV-1-Binding Protein that Enhances trans-Infection of T Cells. *Cell* 2000,**100**:587-597.
  36. Veazey RS, DeMaria M, Chalifoux LV, Shvets DE, Pauley DR, Knight HL, *et al.* Gastrointestinal Tract as a Major Site of CD4+ T Cell Depletion and Viral Replication in SIV Infection. *Science* 1998,**280**:427-431.
  37. Brenchley JM, Schacker TW, Ruff LE, Price DA, Taylor JH, Beilman GJ, *et al.* CD4+ T Cell Depletion during all Stages of HIV Disease Occurs Predominantly in the Gastrointestinal Tract. *The Journal of Experimental Medicine* 2004,**200**:749-759.
  38. Mattapallil JJ, Douek DC, Hill B, Nishimura Y, Martin M, Roederer M. Massive infection and loss of memory CD4+ T cells in multiple tissues during acute SIV infection. *Nature* 2005,**434**.
  39. Chun T-W, Carruth L, Finzi D, Shen X, DiGiuseppe JA, Taylor H, *et al.* Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature* 1997,**387**:183.





- 
- 
40. Alter G, Teigen N, Ahern R, Streeck H, Meier A, Rosenberg ES, *et al.* Evolution of Innate and Adaptive Effector Cell Functions during Acute HIV-1 Infection. *Journal of Infectious Diseases* 2007,**195**:1452-1460.
  41. Martin DJ. Immunology of HIV Infection and the Host Response. In: *From the Ground Up: Building Comprehensive HIV/AIDS Care Programs in Resource-Limited Settings*. Edited by Marlink RG TS. Washington, DC: Elizabeth Glaser Pediatric AIDS Foundation; 2009.
  42. Coffin J, Swanstrom R. HIV Pathogenesis: Dynamics and Genetics of Viral Populations and Infected Cells. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2013,**3**.
  43. Wei Q, Robinson M, Fu-jie Z. Factors influencing the natural history of HIV-1 infection. *Chinese Medical Journal* 2008,**121**:2613-2621.
  44. Forsman A, Weiss RA. Why is HIV a pathogen? *Trends in Microbiology* 2008,**16**:555-560.
  45. Morgan D, Mahe C, Mayanja B, Okongo JM, Lubega R, Whitworth JAG. HIV-1 infection in rural Africa: is there a difference in median time to AIDS and survival compared with that in industrialized countries? *AIDS* 2002,**16**:597-603.
  46. Santiago ÁR. Evolución del virus de inmunodeficiencia humana: Polimorfismos en el gen pol y presión selectiva por antígeno leucocitario humano y terapia antirretroviral en población mexicana: Universidad Nacional Autónoma de México; 2009:174.
  47. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *CELLULAR AND MOLECULAR IMMUNOLOGY*. 6th ed. Philadelphia, PA; 2007.
  48. Lester RT, Yao X-D, Ball TB, McKinnon LR, Orange WR, Kaul R, *et al.* HIV-1 RNA Dysregulates the Natural TLR Response to Subclinical Endotoxemia in Kenyan Female Sex-Workers. *PLoS ONE* 2009,**4**.
  49. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 2010,**11**.
  50. Zhou Y, Wang X, Liu M, Hu Q, Song L, Ye L, *et al.* A critical function of toll-like receptor-3 in the induction of anti-human immunodeficiency virus activities in macrophages. *Immunology* 2010,**131**:40-49.
  51. Wang F-x, Huang J, Zhang H, Ma X, Zhang H. APOBEC3G upregulation by alpha interferon restricts human immunodeficiency virus type 1 infection in human peripheral plasmacytoid dendritic cells. *Journal of General Virology* 2008,**89**:722-730.
  52. Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, *et al.* Species-Specific Recognition of Single-Stranded RNA via Toll-like Receptor 7 and 8. *Science* 2004,**303**:1526-1529.
  53. Kuroda MJ. Macrophages: do they impact AIDS progression more than CD4 T cells? *Journal of Leukocyte Biology* 2010,**87**:569-573.
  54. Coleman C, Wu L. HIV interactions with monocytes and dendritic cells: viral latency and reservoirs. *Retrovirology* 2009,**6**:51.





- 
- 
55. Biasin M, Clerici M, Piacentini L. Innate Immunity in Resistance to HIV Infection. *Journal of Infectious Diseases* 2010,**202**:S361-S365.
  56. Moretta A, Bottino C, Mingari MC, Biassoni R, Moretta L. What is a natural killer cell? *Nat Immunol* 2002,**3**:6.
  57. Fiorentini S, Riboldi E, Facchetti F, Avolio M, Fabbri M, Tosti G, *et al.* HIV-1 matrix protein p17 induces human plasmacytoid dendritic cells to acquire a migratory immature cell phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2008,**105**:3867-3872.
  58. Chaudhry A, Das SR, Hussain A, Mayor S, George A, Bal V, *et al.* The Nef Protein of HIV-1 Induces Loss of Cell Surface Costimulatory Molecules CD80 and CD86 in APCs. *The Journal of Immunology* 2005,**175**:4566-4574.
  59. Bordon Y. Dendritic cells: An inner eye for HIV. *Nature Reviews Immunology* 2010,**10**:678-679.
  60. Fitzgerald-Bocarsly P, Jacobs ES. Plasmacytoid dendritic cells in HIV infection: striking a delicate balance. *Journal of Leukocyte Biology* 2010,**87**:609-620.
  61. Freel S, Saunders K, Tomaras G. CD8+T-cell-mediated control of HIV-1 and SIV infection. *Immunologic Research* 2011,**49**:135-146.
  62. Yamamoto H, Matano T. Anti-HIV adaptive immunity: determinants for viral persistence. *Reviews in Medical Virology* 2008,**18**:293-303.
  63. Piazza P, Fan Z, Rinaldo CR. CD8+ T-cell immunity to HIV infection. *Clinics in laboratory medicine* 2002,**22**:773-797.
  64. Moreno-Fernandez ME, Presicce P, Chougnet CA. Homeostasis and Function of Regulatory T Cells in HIV/SIV Infection. *Journal of Virology* 2012,**86**:10262-10269.
  65. Murphy K, Travers P, Walport M. *Inmunobiología de JANEWAY*. Septima ed; 2009.
  66. Cerutti A, Puga I, Cols M. Innate control of B cell responses. *Trends in immunology* 2011,**32**:202-211.
  67. Wei X, Decker JM, Wang S, Hui H, Kappes JC, Wu X, *et al.* Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* 2003,**422**:307-312.
  68. Malim MH, Bieniasz PD. HIV Restriction Factors and Mechanisms of Evasion. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2012,**2**.
  69. Strebel K, Luban J, Jeang K-T. Human cellular restriction factors that target HIV-1 replication. *BMC Medicine* 2009,**7**:48.
  70. Huthoff H, Towers GJ. Restriction of retroviral replication by APOBEC3G/F and TRIM5 $\pm$ . *Trends in Microbiology* 2008,**16**:612-619.
  71. Newman RM, Johnson WE. A Brief History of TRIM5 $\alpha$ . *AIDS Reviews* 2007,**9**:114-125.
  72. Neil SJD, Zang T, Bieniasz PD. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature* 2008,**451**:425-430.
  73. Mangeat B, Gers-Huber G, Lehmann M, Zufferey M, Luban J, Piguet V. HIV-1 Vpu Neutralizes the Antiviral Factor Tetherin/BST-2 by Binding It and Directing Its Beta-TrCP2-Dependent Degradation. *PLoS Pathog* 2009,**5**:1000574.





- 
- 
74. Sheehy AM, Gaddis NC, Choi JD, Malim MH. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* 2002,**418**:646-650.
  75. Jin X, Brooks A, Chen H, Bennett R, Reichman R, Smith H. APOBEC3G/CEM15 (hA3G) mRNA Levels Associate Inversely with Human Immunodeficiency Virus Viremia. *Journal of Virology* 2005,**79**:11513-11516.
  76. Harris RS, Bishop KN, Sheehy AM, Craig HM, Petersen-Mahrt SK, Watt IN, et al. DNA Deamination Mediates Innate Immunity to Retroviral Infection. *Cell* 2003,**113**:803-809.
  77. Miyagi E, Opi S, Takeuchi H, Khan M, Goila-Gaur R, Kao S, et al. Enzymatically Active APOBEC3G Is Required for Efficient Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *Journal of Virology* 2007,**81**:13346-13353.
  78. Jarmuz A, Chester A, Bayliss J, Gisbourne J, Dunham I, Scott J, et al. An Anthropoid-Specific Locus of Orphan C to U RNA-Editing Enzymes on Chromosome 22. *Genomics* 2002,**79**:285-296.
  79. Zhang K-L, Mangeat B, Ortiz M, Zoete V, Trono D, Telenti A, et al. Model Structure of Human APOBEC3G. *PLoS ONE* 2007,**2**.
  80. Chen K-M, Harjes E, Gross PJ, Fahmy A, Lu Y, Shindo K, et al. Structure of the DNA deaminase domain of the HIV-1 restriction factor APOBEC3G. *Nature* 2008,**452**:116-119.
  81. Furukawa A, Nagata T, Matsugami A, Habu Y, Sugiyama R, Hayashi F, et al. Structure and real-time monitoring of the enzymatic reaction of APOBEC3G which is involved in anti-HIV activity. *Nucleic Acids Symposium Series* 2009,**53**:87-88.
  82. Goila-Gaur R, Strebel K. HIV-1 Vif, APOBEC, and Intrinsic Immunity. *Retrovirology* 2008,**5**:51.
  83. Soros VB, Yonemoto W, Greene WC. Newly Synthesized APOBEC3G Is Incorporated into HIV Virions, Inhibited by HIV RNA, and Subsequently Activated by RNase H. *PLoS Pathog* 2007,**3**:15.
  84. Luo K, Liu B, Xiao Z, Yu Y, Yu X, Gorelick R, et al. Amino-Terminal Region of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nucleocapsid Is Required for Human APOBEC3G Packaging. *Journal of Virology* 2004,**78**:11841-11852.
  85. Alce TM, Popik W. APOBEC3G Is Incorporated into Virus-like Particles by a Direct Interaction with HIV-1 Gag Nucleocapsid Protein. *Journal of Biological Chemistry* 2004,**279**:34083-34086.
  86. Malim MH. APOBEC proteins and intrinsic resistance to HIV-1 infection. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 2009,**364**:675-687.
  87. Strebel K, Khan M. APOBEC3G encapsidation into HIV-1 virions: which RNA is it? *Retrovirology* 2008,**5**:55.
  88. Wang T, Zhang W, Tian C, Liu B, Yu Y, Ding L, et al. Distinct viral determinants for the packaging of human cytidine deaminases APOBEC3G and APOBEC3C. *Virology* 2008,**377**:71-79.





- 
89. Khan M, Goila-Gaur R, Kao S, Miyagi E, Walker R, Strebel K. Encapsidation of APOBEC3G into HIV-1 virions involves lipid raft association and does not correlate with APOBEC3G oligomerization. *Retrovirology* 2009,**6**:99.
  90. Ma J, Li X, Xu J, Zhang Q, Liu Z, Jia P, *et al.* The cellular source for APOBEC3G's incorporation into HIV-1. *Retrovirology* 2011,**8**:2.
  91. Green LA, Liu Y, He JJ. Inhibition of HIV-1 Infection and Replication by Enhancing Viral Incorporation of Innate Anti-HIV-1 Protein A3G: A NON-PATHOGENIC Nef MUTANT-BASED ANTI-HIV STRATEGY. *Journal of Biological Chemistry* 2009,**284**:13363-13372.
  92. Chiu Y-L, Greene WC. The APOBEC3 Cytidine Deaminases: An Innate Defensive Network Opposing Exogenous Retroviruses and Endogenous Retroelements. *Annual Review of Immunology* 2008,**26**:317-353.
  93. Furukawa A, Nagata T, Matsugami A, Habu Y, Sugiyama R, Hayashi F, *et al.* Structure, interaction and real-time monitoring of the enzymatic reaction of wild-type APOBEC3G. *EMBO J* 2008,**28**:440-451.
  94. Li X-Y, Guo F, Zhang L, Kleiman L, Cen S. APOBEC3G Inhibits DNA Strand Transfer during HIV-1 Reverse Transcription. *Journal of Biological Chemistry* 2007,**282**:32065-32074.
  95. Lecossier D, Bouchonnet F, Clavel F, Hance AJ. Hypermutation of HIV-1 DNA in the Absence of the Vif Protein. *Science* 2003,**300**.
  96. Mangeat B, Turelli P, Caron G, Friedli M, Perrin L, Trono D. Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature* 2003,**424**:99-103.
  97. Haché G, Mansky LM, Harris RS. Human APOBEC3 Proteins, Retrovirus Restriction, and HIV Drug Resistance. *AIDS Reviews* 2006,**8**:148-157.
  98. Harris RS, Liddament MT. Retroviral restriction by APOBEC proteins . *Nat Rev Immunol* 2004,**4**:868.
  99. Sadler HA, Stenglein MD, Harris RS, Mansky LM. APOBEC3G Contributes to HIV-1 Variation through Sublethal Mutagenesis. *Journal of Virology* 2010,**84**:7396-7404.
  100. Hultquist JF, Harris RS. Leveraging APOBEC3 proteins to alter the HIV mutation rate and combat AIDS. *Future Virology* 2009,**4**:605-619.
  101. Wang X, Ao Z, Chen L, Kobinger G, Peng J, Yao X. The Cellular Antiviral Protein APOBEC3G Interacts with HIV-1 Reverse Transcriptase and Inhibits Its Function during Viral Replication. *Journal of Virology* 2012,**86**:3777-3786.
  102. Iwatani Y, Chan DSB, Wang F, Maynard KS, Sugiura W, Gronenborn AM, *et al.* Deaminase-independent inhibition of HIV-1 reverse transcription by APOBEC3G. *Nucleic Acids Research* 2007,**35**:7096-7108.
  103. Bishop KN, Verma M, Kim E-Y, Wolinsky SM, Malim MH. APOBEC3G Inhibits Elongation of HIV-1 Reverse Transcripts. *PLoS Pathog* 2008,**4**.
  104. Smith HC. APOBEC3G: a double agent in defense. *Trends in Biochemical Sciences* 2011,**36**:239-244.
  105. Luo K, Wang T, Liu B, Tian C, Xiao Z, Kappes J, *et al.* Cytidine Deaminases APOBEC3G and APOBEC3F Interact with Human Immunodeficiency Virus Type





- 
- 
- 1 Integrase and Inhibit Proviral DNA Formation. *Journal of Virology* 2007,**81**:7238-7248.
106. Russell RA, Smith J, Barr R, Bhattacharyya D, Pathak VK. Distinct Domains within APOBEC3G and APOBEC3F Interact with Separate Regions of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vif. *Journal of Virology* 2009,**83**:1992-2003.
107. Mehle A, Wilson H, Zhang C, Brazier AJ, McPike M, Pery E, *et al.* Identification of an APOBEC3G Binding Site in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vif and Inhibitors of Vif-APOBEC3G Binding. *Journal of Virology* 2007,**81**:13235-13241.
108. Donahue JP, Vetter ML, Mukhtar NA, D'Aquila RT. The HIV-1 Vif PPLP motif is necessary for human APOBEC3G binding and degradation. *Virology* 2008,**377**:49-53.
109. Wolfe LS, Stanley BJ, Liu C, Eliason WK, Xiong Y. Dissection of the HIV Vif Interaction with Human E3 Ubiquitin Ligase. *Journal of Virology* 2010,**84**:7135-7139.
110. Yu X, Yu Y, Liu B, Luo K, Kong W, Mao P, *et al.* Induction of APOBEC3G Ubiquitination and Degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF Complex. *Science* 2003,**302**:1056-1060.
111. Miller J, Presnyak V, Smith H. The dimerization domain of HIV-1 viral infectivity factor Vif is required to block virion incorporation of APOBEC3G. *Retrovirology* 2007,**4**:81.
112. Shao Q, Wang Y, Hildreth JEK, Liu B. Polyubiquitination of APOBEC3G Is Essential for Its Degradation by HIV-1 Vif. *Journal of Virology* 2010,**84**:4840-4844.
113. Albin JS, Harris RS. Interactions of host APOBEC3 restriction factors with HIV-1 in vivo: implications for therapeutics. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 2010,**12**:null-null.
114. HachE G, Shindo K, Albin JS, Harris RS. Evolution of HIV-1 Isolates that Use a Novel Vif-Independent Mechanism to Resist Restriction by Human APOBEC3G. *Current biology : CB* 2008,**18**:819-824.
115. Kao S, Khan MA, Miyagi E, Plishka R, Buckler-White A, Strebel K. The Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vif Protein Reduces Intracellular Expression and Inhibits Packaging of APOBEC3G (CEM15), a Cellular Inhibitor of Virus Infectivity. *Journal of Virology* 2003,**77**:11398-11407.
116. Bennett RP, Salter JD, Liu X, Wedekind JE, Smith HC. APOBEC3G Subunits Self-associate via the C-terminal Deaminase Domain. *Journal of Biological Chemistry* 2008,**283**:33329-33336.
117. Opi S, Kao S, Goila-Gaur R, Khan MA, Miyagi E, Takeuchi H, *et al.* Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vif Inhibits Packaging and Antiviral Activity of a Degradation-Resistant APOBEC3G Variant. *Journal of Virology* 2007,**81**:8236-8246.
118. Martin KL, Johnson M, D'Aquila RT. APOBEC3G Complexes Decrease Human Immunodeficiency Virus Type 1 Production. *Journal of Virology* 2011,**85**:9314-9326.





119. Chiu Y-L, Greene WC. APOBEC3G: an intracellular centurion. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 2009,**364**:689-703.
120. Jern P, Russell RA, Pathak VK, Coffin JM. Likely Role of APOBEC3G-Mediated G-to-A Mutations in HIV-1 Evolution and Drug Resistance. *PLoS Pathog* 2009,**5**.
121. Kim E-Y, Bhattacharya T, Kunstman K, Swantek P, Koning FA, Malim MH, *et al.* Human APOBEC3G-Mediated Editing Can Promote HIV-1 Sequence Diversification and Accelerate Adaptation to Selective Pressure. *Journal of Virology* 2010,**84**:10402-10405.
122. Gifford RJ, Rhee S-Y, Eriksson N, Liu TF, Kiuchi M, Das AK, *et al.* Sequence editing by Apolipoprotein B RNA-editing catalytic component-B and epidemiological surveillance of transmitted HIV-1 drug resistance. *AIDS* 2008,**22**:717-725 710.1097/QAD.1090b1013e3282f1095e1007a.
123. Berkhout B, de Ronde A. APOBEC3G versus reverse transcriptase in the generation of HIV-1 drug-resistance mutations. *AIDS* 2004,**18**:1861-1863.
124. Mulder LCF, Harari A, Simon V. Cytidine deamination induced HIV-1 drug resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2008,**105**:5501-5506.
125. Pillai S, Wong J, Barbour J. Turning up the volume on mutational pressure: Is more of a good thing always better? (A case study of HIV-1 Vif and APOBEC3). *Retrovirology* 2008,**5**:26.
126. Armitage AE, Deforche K, Chang C-h, Wee E, Kramer B, Welch JJ, *et al.* APOBEC3G-Induced Hypermutation of Human Immunodeficiency Virus Type-1 Is Typically a Discrete "All or Nothing" Phenomenon. *PLoS Genet* 2012,**8**.
127. Chen K, Huang J, Zhang C, Huang S, Nunnari G, Wang F-x, *et al.* Alpha Interferon Potently Enhances the Anti-Human Immunodeficiency Virus Type 1 Activity of APOBEC3G in Resting Primary CD4 T Cells. *Journal of Virology* 2006,**80**:7645-7657.
128. Trapp S, Derby NR, Singer R, Shaw A, Williams VG, Turville SG, *et al.* Double-Stranded RNA Analog Poly(I:C) Inhibits Human Immunodeficiency Virus Amplification in Dendritic Cells via Type I Interferon-Mediated Activation of APOBEC3G. *Journal of Virology* 2009,**83**:884-895.
129. Stopak KS, Chiu Y-L, Kropp J, Grant RM, Greene WC. Distinct Patterns of Cytokine Regulation of APOBEC3G Expression and Activity in Primary Lymphocytes, Macrophages, and Dendritic Cells. *Journal of Biological Chemistry* 2007,**282**:3539-3546.
130. Macian F. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat Rev Immunol* 2005,**5**:10.
131. Farrow MA, Kim E-Y, Wolinsky SM, Sheehy AM. NFAT and IRF Proteins Regulate Transcription of the Anti-HIV Gene, APOBEC3G. *Journal of Biological Chemistry* 2011,**286**:2567-2577.
132. Yokota S-i, Okabayashi T, Fujii N. The Battle between Virus and Host: Modulation of Toll-Like Receptor Signaling Pathways by Virus Infection. *Mediators of Inflammation* 2010,**2010**.





- 
- 
133. An P, Bleiber G, Duggal P, Nelson G, May M, Mangeat B, *et al.* APOBEC3G Genetic Variants and Their Influence on the Progression to AIDS. *Journal of Virology* 2004,**78**:11070-11076.
  134. Do H, Vasilescu A, Diop G, Hirtzig T, Heath SC, Coulonges C, *et al.* Exhaustive Genotyping of the CEM15 (APOBEC3G) Gene and Absence of Association with AIDS Progression in a French Cohort. *Journal of Infectious Diseases* 2005,**191**:159-163.
  135. Biasin M, Piacentini L, Lo Caputo S, Kanari Y, Magri G, Trabattoni D, *et al.* Apolipoprotein B mRNA—Editing Enzyme, Catalytic Polypeptide—Like 3G: A Possible Role in the Resistance to HIV of HIV-Exposed Seronegative Individuals. *Journal of Infectious Diseases* 2007,**195**:960-964.
  136. Wei M, Xing H, Hong K, Huang H, Tang H, Qin G, *et al.* Biased G-to-A hypermutation in HIV-1 proviral DNA from a long-term non-progressor. *AIDS* 2004,**18**:1863-1865.
  137. Gandhi SK, Siliciano JD, Bailey JR, Siliciano RF, Blankson JN. Role of APOBEC3G/F-Mediated Hypermutation in the Control of Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Elite Suppressors. *Journal of Virology* 2008,**82**:3125-3130.
  138. Ulenga NK, Sarr AD, Thakore-Meloni S, Sankalé J-L, Eisen G, Kanki PJ. Relationship between Human Immunodeficiency Type 1 Infection and Expression of Human APOBEC3G and APOBEC3F. *Journal of Infectious Diseases* 2008,**198**:486-492.
  139. Biasin M, Piacentini L, Lo Caputo S, Naddeo V, Pierotti P, Borelli M, *et al.* TLR Activation Pathways in HIV-1-Exposed Seronegative Individuals. *The Journal of Immunology* 2010,**184**:2710-2717.
  140. Steinkamp JA. Flow cytometry. *Review of Scientific Instruments* 1984,**55**:1375-1400.
  141. Misha Rahman AL, Angie Swindell, Sarah Bartram. *Introduction to Flow Cytometry*.
  142. HERZENBERG DRPaLA. Fluorescence-Activated Cell Sorting:Theory Experimental Optimization, and Applications in Lymphoid Cell Biology. *Methods in Enzymology* 1984,**108**:199-241.
  143. Bonner WA, Hulett HR, Sweet RG, Herzenberg LA. Fluorescence Activated Cell Sorting. *Review of Scientific Instruments* 1972,**43**:404-409.
  144. Mous K, Jennes W, De Roo A, Pintelon I, Kestens L, Van Ostade X. Intracellular detection of differential APOBEC3G, TRIM5alpha, and LEDGF/p75 protein expression in peripheral blood by flow cytometry. *Journal of Immunological Methods* 2011,**372**:52-64.
  145. ssRNA40/LyoVec. In: *InvivoGen*. Edited by InvivoGen. 3950 Sorrento Valley Blvd. Suite 100 San Diego, CA 92121 - USA ; 2012. pp. 1.
  146. ssRNA41/LyoVec. In: *InvivoGen*. Edited by InvivoGen. 3950 Sorrento Valley Blvd. Suite 100, San Diego, CA 92121 - USA; 2012. pp. 1.
  147. Poly(I:C)/LyoVec. In: *InvivoGen*. Edited by InvivoGen. 3950 Sorrento Valley Blvd. Suite 100 San Diego, CA 92121 - USA ; 2012. pp. 1.





- 
- 
148. Miller RL, Gerster JF, Owens ML, Slade HB, Tomai Ma. Review Article Imiquimod applied topically: a novel immune response modifier and new class of drug. *International Journal of Immunopharmacology* 1999,**21**:1-14.
  149. Imiquimod-R837. In: *InvivoGen*. Edited by InvivoGen. 3950 Sorrento Valley Blvd. Suite 100 San Diego, CA 92121 - USA; 2012. pp. 1.
  150. source pi. Human Iterferon Alpha. In. <https://http://www.interferonsource.com/content/human-interferon-alpha>; 2012.
  151. Support T. NanoDrop 1000 Spectrophotometer. In: *Thermo Scientific*. Edited by Scientific TF. Wilmington, DE 19810 USA.; 2008.
  152. Marc A. Unger H-PC, Todd Thorsen, Axel Scherer, and Stephen Quake,. Monolithic Microfabricated Valves and Pumps by Multilayer Soft Lithography. *Science* 2000,**288**:113-116.
  153. Fluidigm W. Technology. In; 2012.
  154. Peng G, Lei KJ, Jin W, Greenwell-Wild T, Wahl SM. Induction of APOBEC3 family proteins, a defensive maneuver underlying interferon-induced anti-HIV-1 activity. *The Journal of Experimental Medicine* 2006,**203**:41-46.
  155. Samuel CE. Antiviral Action of Interferons. *Clin.Microbiol.Rev* 2001,**14**.
  156. Mehta HV, Jones PH, Weiss JP, Okeoma CM. IFN- $\alpha$  and Lipopolysaccharide Upregulate APOBEC3 mRNA through Different Signaling Pathways. *The Journal of Immunology* 2012,**189**:4088-4103.
  157. Chen H, Wang L-W, Huang Y-Q, Gong Z-J. Interferon-alpha Induces High Expression of APOBEC3G and STAT-1 in Vitro and in Vivo. *International Journal of Molecular Sciences* 2010,**11**:3501-3512.
  158. Haller O, Kochs G, Weber F. Interferon, Mx, and viral countermeasures. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2007,**18**:425-433.
  159. Mohanram V, Sköld AE, Bächle SM, Pathak SK, Spetz A-L. IFN- $\alpha$  Induces APOBEC3G, F, and A in Immature Dendritic Cells and Limits HIV-1 Spread to CD4+ T Cells. *The Journal of Immunology* 2013,**190**:3346-3353.
  160. Argyris EG, Acheampong E, Wang F, Huang J, Chen K, Mukhtar M, *et al.* The interferon-induced expression of APOBEC3G in human blood-brain barrier exerts a potent intrinsic immunity to block HIV-1 entry to central nervous system. *Virology* 2007,**367**:440-451.
  161. Harper MS, Barrett BS, Smith DS, Li SX, Gibbert K, Dittmer U, *et al.* IFN- $\alpha$  Treatment Inhibits Acute Friend Retrovirus Replication Primarily through the Antiviral Effector Molecule Apobec3. *The Journal of Immunology* 2013,**190**:1583-1590.
  162. Ying S, Zhang X, Sarkis PTN, Xu R, Yu X. Cell-specific Regulation of APOBEC3F by Interferons. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 2007,**39**:297-304.
  163. Sarkis PTN, Ying S, Xu R, Yu X-F. STAT1-Independent Cell Type-Specific Regulation of Antiviral APOBEC3G by IFN- $\alpha$ . *The Journal of Immunology* 2006,**177**:4530-4540.
  164. Welsz A, Kirchhoff S, Levi B-Z. IFN consensus sequence binding protein (ICSBP) is a conditional repressor of IFN inducible promoters. *International Immunology* 1994,**6**:1125-1131.





- 
- 
165. Harada H, Fujita T, Miyamoto M, Kimura Y, Maruyama M, Furia A, *et al.* Structurally similar but functionally distinct factors, IRF-1 and IRF-2, bind to the same regulatory elements of IFN and IFN-inducible genes. *Cell* 1989,**58**:729-739.
  166. Alter G, Suscovich TJ, Teigen N, Meier A, Streeck H, Brander C, *et al.* Single-Stranded RNA Derived from HIV-1 Serves as a Potent Activator of NK Cells. *The Journal of Immunology* 2007,**178**:7658-7666.





---

---

## 12 INDICE DE ABREVIATURAS

A3G	APOBEC3G
ADN	Ácido Desoxiribonucleico
APOBEC	Apolipotrotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide, por sus siglas en ingles.
ARN	Ácido Ribonucleico
BCR	Receptor de Células B
CA	Cápside
CD	Célula Dendrítica
CDC	Center of Diseases Control
CMSP	Células Mononucleares de Sangre Periférica
CPA	Célula Presentadora de Antígeno
CpGs	Sitios C-fosfato-G
CT	Individuos Controladores de la Infección
CTL	Linfocitos T citotóxicos
CTR	Complejo de Retrotranscripción
CXCR4 Y CCR5	Receptores de quimiocinas
CYPs	Citocromo P450
DC	Tejido linfoide asociado a mucosa
DDX58	Gen que codifica para RIG
DS	Individuos Donadores Sanos
env	envoltura
ESN	Individuos Expuestos seronegativos
FACS	Fluorescence-activated cell sorting, por sus siglas en ingles.
gag	grupo antígeno específico
GPI	Glicofosfatidilinositol
HMM	Alto peso molecular
IFI	Proteína inducible por interferón
IF	Interferon
IL-#	Interleucina





IN	Integrasa
IRF	Factor regulador de Interferón
ISG	Gen estimulado por Interferón
JAK	Gen Janus Cinasa
LMM	Bajo peso molecular
LPS	Lipopolisacarido
LTNPs	Long-term nonprogressor, por sus siglas en ingles.
LTR	Long Terminal Repeat
MA	Matriz
MAPK	Proteín-cinasa Mitogeno Activada
MHC	Complejo Principal de Histocompatibilidad
MIP	Proteína Inflamatoria de Macrófagos
MyD88	Factor de diferenciación mieloide 88
NC	Nucleocápside
Nef	Factor regulador negativo
NFAT	Factor Nuclear de Células T Activadas
NK	Células Natural Kille, por sus siglas en ingles
NLR	Nod-like receptors, por sus siglas en ingles.
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAMPs	Patrones Moleculares Asociados a Patógenos
pDCs	Céulas Dendriticas plasmacitoides
PIC	Complejo de preintegración
pol	polimerasa
poly (I:C)	Cadena policitidil-poliinositol
PR	proteasa
PRRs	Patrones de Reconocimiento de Patrones
PT	Individuos Progresores Tipicos
RE	Retículo Endoplásmico
Rev	Proteína regulador de la expresión del virión
RIG	Gen inducible por ácido retinoico
RLRs	RIG-I-like receptor, por sus siglas en ingles





---

---

ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
RT	Retrotranscriptasa
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
STAT	Traductor de señales y activador de la transcripción
SU (gp120)	Glicoproteína de superficie
Tat	Proteína transactivador de la transcripción
TCR	Receptor de Células T
TLRs	Toll-like receptors por sus siglas en ingles
TM (gp41)	Glicoproteína transmembranal
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
TRIM	Tripartite Motif family, por sus siglas en ingles.
VAL	Virus Asociado a Linfadenopatía
Vif	Factor de Infectividad viral
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
Vpr	Proteína viral R
Vpu	Proteína viral única

