

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Genética



**ANÁLISIS DE LA PROGRESIÓN LENTA A SIDA
EN LA INFECCIÓN POR VIH-1: FACTORES
VIRALES Y DEL HUÉSPED.**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

María del Rosario Salgado Bernal

Bajo la dirección de los doctores

Berta Rodés Soldevilla
Vicente Soriano Vázquez

Madrid, 2010

ISBN: 978-84-693-5997-6

© María del Rosario Salgado Bernal, 2010

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Genética



**ANÁLISIS DE LA PROGRESIÓN LENTA A SIDA EN LA
INFECCIÓN POR VIH-1: FACTORES VIRALES Y DEL
HUÉSPED**

TESIS DOCTORAL

María del Rosario Salgado Bernal

Madrid, 2010

TESIS DOCTORAL

ANÁLISIS DE LA PROGRESIÓN LENTA A SIDA EN LA INFECCIÓN POR VIH-1: FACTORES VIRALES Y DEL HUÉSPED

Esta memoria ha sido presentada para optar al grado de Doctor en Biología
por la Universidad Complutense de Madrid por la licenciada:

María del Rosario Salgado Bernal

Directores de Tesis:

Dra. Berta Rodés Soldevila
Doctora en Biología.
Laboratorio de Biología Molecular.
Servicio de Enfermedades Infecciosas.
Hospital Carlos III, Madrid.

Dr. Vicente Soriano Vázquez
Doctor en Medicina
Jefe de Sección.
Servicio de Enfermedades Infecciosas.
Hospital Carlos III, Madrid.

Madrid, 2010

Índice

<u>RESUMEN</u>	1
<u>INTRODUCCIÓN</u>	3
I.1. Estructura del VIH.....	4
I.2. Ciclo replicativo del VIH.....	8
I.3. Historia natural del VIH. LTNP y controladores de élite de la infección.....	10
I.4. Factores virales con influencia en la progresión.....	13
I.4.1. <i>Vif</i>	14
I.4.2. <i>Vpr</i>	14
I.4.3. <i>Vpu</i>	16
I.4.4. <i>Nef</i>	16
I.4.5. <i>Otros factores virales</i>	17
I.5. Factores del huésped con influencia en la progresión.....	19
<u>I.5.1. Factores celulares</u>	19
I.5.1.1. <i>Entrada viral</i>	19
I.5.1.2. <i>Fase celular</i>	20
I.5.1.3. <i>Salida viral</i>	21
I.5.1.4. <i>Búsqueda de nuevos factores celulares</i>	21
<u>I.5.2. Factores inmunológicos</u>	23
I.6. Otros factores con influencia en la progresión.....	26
I.7. Antecedentes de la cohorte de LTNP a estudio.....	26
<u>OBJETIVOS</u>	28

<u>CAPITULO 1: Caracterización de genes accesorios del VIH y su relación con la</u>	
progresión.	30
<u>1.1. Introducción</u>	31
<u>1.2. Pacientes y métodos</u>	33
1.2.1. Pacientes	33
1.2.2. Determinación de parámetros clínicos	33
1.2.3. Extracción de ácidos nucleicos	34
1.2.4. Amplificación y secuenciación de ácidos nucleicos	34
1.2.4.1. Vif	35
1.2.4.2. Vpr	35
1.2.4.3. Vpu	36
1.2.4.3. Nef	36
1.2.5. Secuenciación	37
1.2.6. Análisis de datos	37
<u>1.3. Resultados</u>	38
1.3.1. Características de la población estudiada	38
1.3.2. Análisis de las proteínas virales	39
1.3.2.1. Vif	39
1.3.2.2. Vpr	40
1.3.2.3. Vpu	44
1.3.2.4. Nef	46
<u>1.4. Discusión</u>	48
<u>CAPITULO 2: Características genóticas del hospedador relacionadas con la</u>	
progresión	53

<u>2.1. Introducción</u>	54
<u>2.2. Pacientes y métodos</u>	55
2.2.1. <i>Pacientes</i>	55
2.2.2. <i>Genotipado de CCR5 y determinación del número de copias del gen CCL3L1</i>	56
2.2.3. <i>Tipaje de HLA</i>	58
2.2.4. <i>Genotipado de SNP</i>	58
2.2.5. <i>Análisis estadístico</i>	59
<u>2.3. Resultados</u>	59
2.3.1. <i>Características de la población estudiada</i>	59
2.3.2. <i>Caracterización de genes relacionados con la entrada viral: CCR5 y CCL3L1</i>	60
2.3.3. <i>Diferencias en frecuencias alélicas de HLA entre pacientes LTNP y progresores</i>	61
2.3.4. <i>Asociación de haplotipos HLA con progresión de la enfermedad por desequilibrio de ligamiento</i>	63
2.3.5. <i>Frecuencias de SNP y su asociación con alelos HLA</i>	64
2.3.6. <i>Análisis conjunto de la asociación de HLA, polimorfismos y factores de entrada con la progresión de la enfermedad</i>	66
<u>2.4. Discusión</u>	67
<u>CAPITULO 3. Estudio de la expresión diferencial de genes celulares en LTNP y progresores</u>	73
<u>3.1. Introducción</u>	74
<u>3.2. Material y métodos</u>	75

3.2.1. Pacientes.....	75
3.2.2. Aislamiento de linfocitos T CD3+.....	75
3.2.3. Procesamiento del ARN.....	76
3.2.4. Hibridación y procesamiento de microarrays.....	76
3.2.5. Análisis de datos de arrays: pre-procesamiento y normalización.....	78
3.2.6. Análisis estadístico.....	78
3.2.7. Análisis Funcional.....	79
<u>3.3. Resultados.....</u>	80
3.3.1. Características de la población estudiada.....	80
3.3.2. Análisis de la expresión genética diferencial por microarrays.....	81
3.3.3. Análisis Funcional.....	82
3.3.4. Interacciones.....	85
<u>3.4. Discusión.....</u>	86
3.4.1. Diferencias en la desregulación del ciclo celular entre LTNP y progresores.....	88
3.4.2. Diferencias en genes relacionados con respuesta a estímulos asociados con daño al ADN.....	89
3.4.3. Regulación del citoesqueleto de actina activada en pacientes LTNP.....	90
3.4.4. Sobreexpresión de genes relacionados con la interacción de citoquinas y sus receptores en LTNP.....	91
3.4.5. Diferencias en los patrones de expresión de apoptosis.....	92
<u>CAPITULO 4: Análisis de las diferencias en la respuesta Th17 y su relación con la progresión.....</u>	94
<u>4.1. Introducción.....</u>	95

<u>4.2. Pacientes y Métodos</u>	96
4.2.1. Pacientes.....	96
4.2.2. Tinción en superficie para evaluar el nivel de expresión de IL17R en linfocitos T.....	97
4.2.3. Ensayo de producción intracelular de citoquinas IL17 e IFN γ	97
4.2.4. Análisis por citometría de flujo multiparamétrica.....	100
4.2.5. Análisis estadístico.....	101
<u>4.3. Resultados</u>	101
4.3.1. Descripción de los pacientes del estudio.....	101
4.3.2. Expresión de IL17R y producción de IL17 por células T CD4+ y CD8+..	102
4.3.3. Expresión diferencial de IL17R en LTNP y progresores.....	103
4.3.4. Diferencias en la producción de IL17 entre LTNP y progresores.....	103
<u>4.4. Discusión</u>	105
<u>CONCLUSIONES</u>	110
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	112
<u>ANEXO I</u>	130
<u>ANEXO II</u>	135
<u>ANEXO III</u>	146
<u>PUBLICACIONES SURGIDAS DURANTE ESTA TESIS</u>	150
<u>ABREVIATURAS</u>	153

Resumen

En el curso natural de la infección por VIH, un 95% de los pacientes desarrollan sida dentro de los 10 primeros años tras el contagio. El resto, controlan la infección y no llegan a tener síntomas o lo hacen tras muchos años. Estos constituyen los denominados progresores lentos de la enfermedad o LTNP (del inglés, long-term non-progressors). Estos pacientes han sido objeto de estudio en numerosos trabajos, sin determinar una causa común a todos ellos que explique la infección asintomática. Sin embargo, se conocen una serie de factores tanto virales como del huésped que conjuntamente tienen influencia en este fenotipo.

En este trabajo se han analizado muchos de estos factores en una cohorte bien establecida de pacientes LTNP. Se ha comprobado en primer lugar la ausencia de virus defectivos en los genes accesorios en casi la totalidad de los pacientes. De forma paralela, se han estudiado factores del huésped, tanto a nivel genotípico, como de expresión genética diferencial y por último a nivel inmunológico. De esta manera, se ha observado que los pacientes LTNP poseen un mayor número de factores genotípicos protectores que incluyen determinados alelos HLA C no descritos previamente en asociación con LTNP. Además, se ha visto un patrón de expresión genética característico en este grupo de pacientes, con la regulación a la alta de genes relacionados principalmente con la interacción entre citoquinas y la organización del citoesqueleto. Por último, a nivel inmunológico, los pacientes con progresión lenta se caracterizan por tener unos niveles de células T-helper17 superiores a los pacientes progresores.

Con todos estos datos se concluye que la causa predominante de no progresión en sujetos infectados por VIH reside principalmente en el hospedador y, más concretamente, en factores inmunológicos capaces de controlar la infección.

Introducción

I.1. ESTRUCTURA DEL VIH

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es el agente causal del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (sida) en humanos. Es un virus ARN clasificado dentro de la familia *Retroviridae* perteneciente al género *Lentivirus* (Barre-Sinoussi et al., 1983). Tiene como célula diana el linfocito T y es un virus citopático, con alta tasa de replicación, que presenta viremia libre y una alta variabilidad, que le permite escapar de la respuesta inmune.

Se han identificado dos tipos: VIH-1 y VIH-2. El VIH-1 es el más extendido y responsable de la mayor parte de los casos de infección por VIH en el mundo, mientras que el VIH-2 parece ser menos patogénico y menos transmisible. Dentro del VIH-1, las cepas se han clasificado en tres grandes grupos, según la homología genética de sus secuencias: grupo M (del inglés *main* o principal), grupo O (del inglés *outlier* o atípico) y grupo N (no M, no O). Recientemente se ha descrito un posible nuevo grupo al que se propone llamar grupo P (Plantier et al., 2009). La mayoría de cepas circulantes en el mundo pertenecen al grupo M, estando el resto de grupos limitado principalmente a África subsahariana occidental. Los virus del grupo M, responsables de más del 97% de todas las infecciones a nivel mundial, han sido subdivididos en varios subtipos denominados por letras (A-D, F-H, J, K), e incluso se encuentran virus recombinantes entre subtipos denominados CRF (formas recombinantes circulantes). Los subtipos no B dan cuenta del 95% de las infecciones en el mundo. Aún así, aunque con la gran movilidad de la población los límites geográficos entre subtipos van desapareciendo, el subtipo B sigue siendo el más predominante en Europa y América del Norte (UNAIDS, 2008).

La estructura y organización genómica del VIH se muestran en la Figura I.1a. El VIH está constituido por una envuelta externa (bicapa lipídica) en la cual se insertan la glicoproteína de superficie gp120 y la proteína transmembrana gp41. Esta envuelta porta además diversas proteínas celulares arrastradas por el virus en el proceso de gemación y que le permite al virus tener mayor infectividad. En el interior del virus se encuentran las proteínas de la matriz (p17), cápside (p24) y nucleocápside (p7). Dentro de la cápside viral, se localiza el material genético del virus constituido por dos cadenas sencillas de ARN de polaridad positiva de aproximadamente 9,8 kb asociadas a las proteínas de la nucleocápside, las enzimas esenciales para la replicación del virus (transcriptasa inversa, proteasa e integrasa) y las proteínas reguladoras y accesorias (Emerman et al., 1998; Seelamgari et al., 2004).

El VIH pertenece al grupo de retrovirus con genoma complejo, el cual consiste en 2 moléculas de ARN de cadena simple (+) que incluyen desde el extremo 5' al 3': un grupo "cap", un ARN de transferencia, las regiones codificantes y una secuencia equivalente a una cola poli-A. Las 2 moléculas de ARN están físicamente unidas mediante puentes de hidrógeno en sus extremos 5', lo que dificulta la encapsidación de más de dos moléculas en un mismo virus. Está considerado un virus diploide y su organización genética siempre es la misma: 5'-gag-pol-env-3'. Además, en el VIH-1 hay seis genes adicionales que solapan con los genes principales, dos de ellos reguladores (Tat y Rev), y cuatro accesorios (Nef, Vif, Vpr y Vpu) (Figura I.1b). Estos genes adicionales regulan y coordinan la expresión de genes virales (Tabla I.1). En ambos extremos del genoma ARN se encuentran regiones no codificantes flanqueantes de los genes provirales del VIH que darán lugar a las regiones LTR (del inglés *long terminal repeats*) donde se incluyen zonas reguladoras de la transcripción.

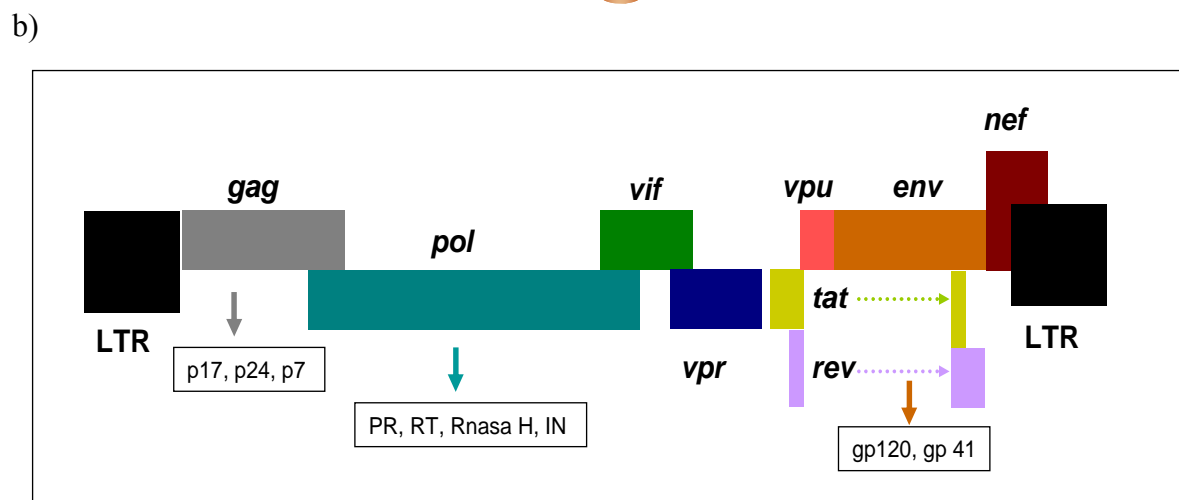
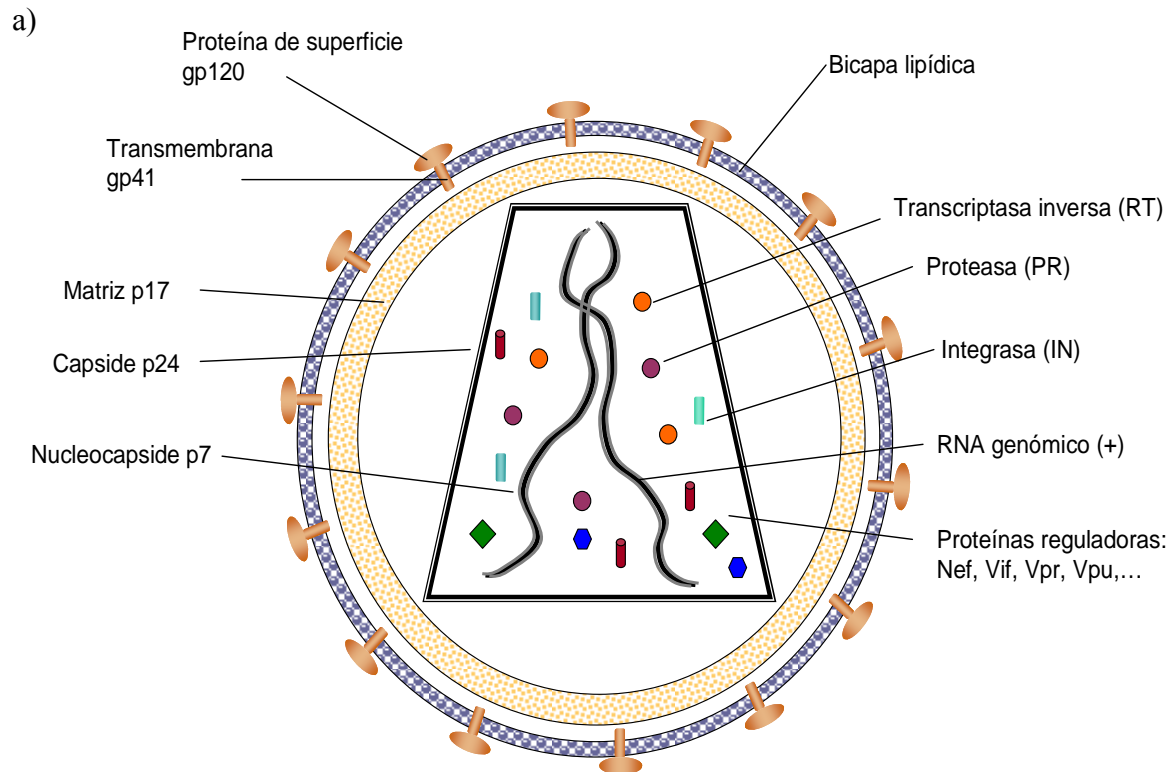


Figura I.1. Estructura y genoma del VIH. a) Esquema de la estructura del virión. b) Organización genómica del provirus.

Tabla I.1. Genes y proteínas del VIH-1.

Gen	Proteína	Función
<i>gag</i>	P24 (CA)	Proteína estructural que forma la cápside
	P17 (MA)	Proteína estructural que forma la matriz
	P7 (NC)	Proteína estructural que forma la nucleocápside
<i>pol</i>	PR	Enzima proteasa. Implicada en la maduración del virión
	RT	Enzima transcriptasa inversa. Cataliza el paso de ARN a ADN.
	IN	Enzima integrasa. Implicada en la integración del ADNds (ADN proviral) sintetizado en el genoma del huésped.
<i>env</i>	Gp120	Proteína estructural que forma la envuelta. Se une al receptor CD4.
	Gp41	Proteína estructural que forma la envuelta. Implicada en la fusión de membranas.
<i>tat</i>	Tat	Factor viral de transactivación transcripcional. Proteína reguladora esencial para la replicación del virus.
<i>rev</i>	Rev	Segunda proteína reguladora esencial para el virus. Es una fosfoproteína que promueve el transporte y estabilización del ARNm entre núcleo y citoplasma.
<i>nef</i>	Nef	Regulador negativo de la presencia del receptor CD4, CD3 TCR y moléculas MHC de clase I en la membrana celular.
<i>vif</i>	Vif	Factor de infectividad viral. Inhibe la acción antiviral de proteínas celulares (APOBEC) sobre el ARN viral.
<i>vpr</i>	Vpr	Proteína implicada en el transporte de complejos de preintegración, transactivación de genes celulares, parada del ciclo celular.
<i>vpu</i>	Vpu	Proteína única al VIH-1 implicada en la degradación de CD4 en el retículo endoplasmático y liberación de viriones.

I.2. CICLO REPLICATIVO DEL VIH

La replicación del VIH se puede dividir en las siguientes etapas (Figura I.2): 1) Interacción del virus con la célula diana (linfocitos T CD4+ principalmente) por medio de la unión de la glicoproteína gp120 con el receptor CD4. Aquí intervienen también otras proteínas de membrana celulares (CCR5 o CXCR4 mayoritariamente), cuya función fisiológica es la de ser receptores de quimiocinas pero que actúan como correceptores del virus en la infección; 2) fusión de las membranas virales y celulares; 3) liberación al citoplasma del contenido de la cápside viral; 4) transcripción inversa del ARN genómico viral y formación del ADN complementario de doble cadena mediado por la transcriptasa inversa; 5) transporte del ADN al núcleo celular; 6) integración en el genoma de la célula hospedadora mediante las secuencias LTR, por la acción de la integrasa; 7) transcripción de los genes provirales utilizando tanto factores celulares como virales que se van a unir a la región LTR presente en ambos extremos del provirus integrado; 8) procesamiento de los transcritos primarios hasta ARN genómico viral y ARNm viral. Traducción de los ARNm a las distintas proteínas virales en el citoplasma; 9) ensamblaje de las proteínas virales, 10) salida del virión por gemación, arrastrando parte de la membrana de la célula huésped. Maduración por medio de la acción de la proteasa viral que corta las poliproteínas precursoras para formar el virión infectivo (Levy, 1993). Las características del ciclo infectivo del VIH muestran varios puntos clave y que han sido elegidos para el diseño de fármacos antirretrovirales que bloqueen la replicación del virus. Las enzimas fundamentales que intervienen en el mismo son la transcriptasa inversa y la proteasa por lo que desde el primer momento se eligieron como dianas moleculares idóneas para la terapia antirretroviral. A las familias de inhibidores de la retrotranscriptasa y proteasa, ampliamente utilizados en la actualidad, les han seguido las de los fármacos inhibidores de la entrada y los inhibidores de la integrasa.

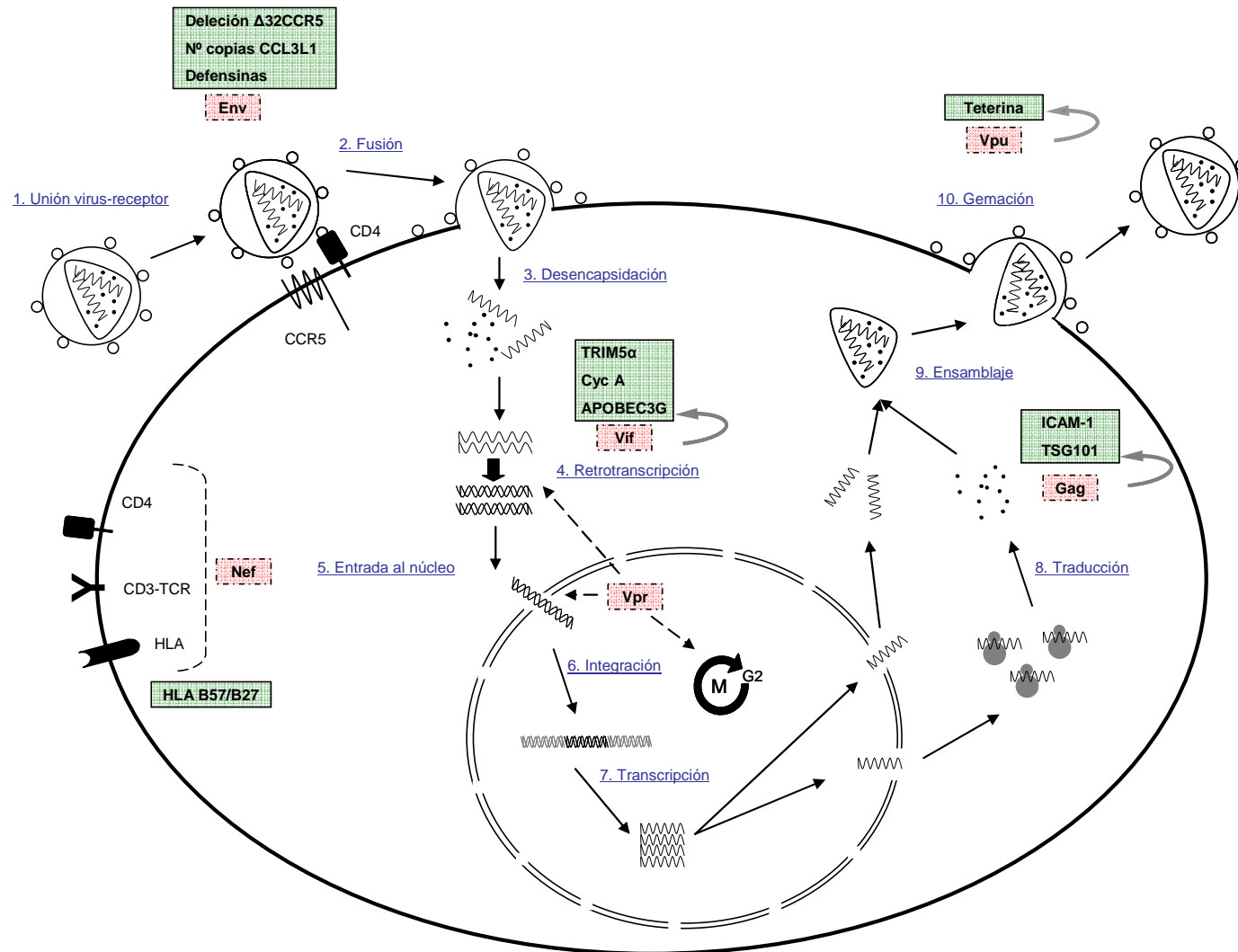


Figura I.2. Ciclo replicativo del VIH. En azul se representan las fases del ciclo replicativo. Las cajas describen factores asociados con la no progresión por parte del hospedador (verde) o del virus (rojo).

Con ello, se dispone de un gran arsenal terapéutico de antirretrovirales con los que se trata la enfermedad en lo que se conoce como terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA).

I.3. HISTORIA NATURAL DEL VIH. LTNP Y CONTROLADORES DE ÉLITE DE LA INFECCIÓN.

La infección por VIH presenta tres fases (Figura I.3) (Pantaleo et al., 1993). La primera de ellas denominada *primoinfección o infección aguda*, se caracteriza por la detección de una alta viremia además de algunos síntomas clínicos inespecíficos. Además se observa una disminución del número de linfocitos T CD4+. Una vez resuelto este periodo de entre 2-6 semanas, y coincidiendo con la aparición de inmunidad humoral y celular, la carga viral disminuye hasta alcanzar un valor que se mantendrá estable durante la mayor parte del curso de la infección. Durante esta segunda fase denominada *periodo de latencia*, generalmente se produce una gradual y paulatina disminución del número de linfocitos T CD4+. Esta caída conduce a la fase final de *sida*. En este momento la cifra de linfocitos T CD4+ es muy baja y hay un incremento de la viremia circulante. Es entonces cuando el paciente infectado puede desarrollar las infecciones oportunistas y otras patologías que definen el sida. Actualmente, mediante la administración del tratamiento antirretroviral se ha conseguido alargar la fase de latencia evitando llegar a la fase de sida. Las últimas guías de tratamiento proponen la administración de la TARGA cuando existan niveles de células T CD4+ por debajo de 350 células/ μ l o aparezcan síntomas definitorios la enfermedad (Mofenson et al., 2009). De manera natural y en ausencia de tratamiento antirretroviral, el periodo de latencia es muy variable en los pacientes. Así el 90% de las personas infectadas desarrollan el sida en un periodo entre 5-10 años mientras que existe

un 5% de personas que lo hacen antes, denominados Progresores Rápidos. El resto, son los llamados LTNP (del inglés *long-term-non-progressors*) o Progresores Lentos y se definen como personas VIH+ infectadas por un periodo igual o superior a 10 años y que, en ausencia de tratamiento antirretroviral, mantienen el nivel de linfocitos T CD4+ estable por encima de 500 células por microlitro (Pantaleo et al., 1995). Este grupo ha sido sometido a un gran número de estudios con el fin de determinar la causa del control de la infección y la posible aplicación a una vacuna o un tratamiento más eficaz de la enfermedad. De esta manera, existen un gran número de cohortes a nivel mundial establecidas para el estudio y seguimiento de la progresión.

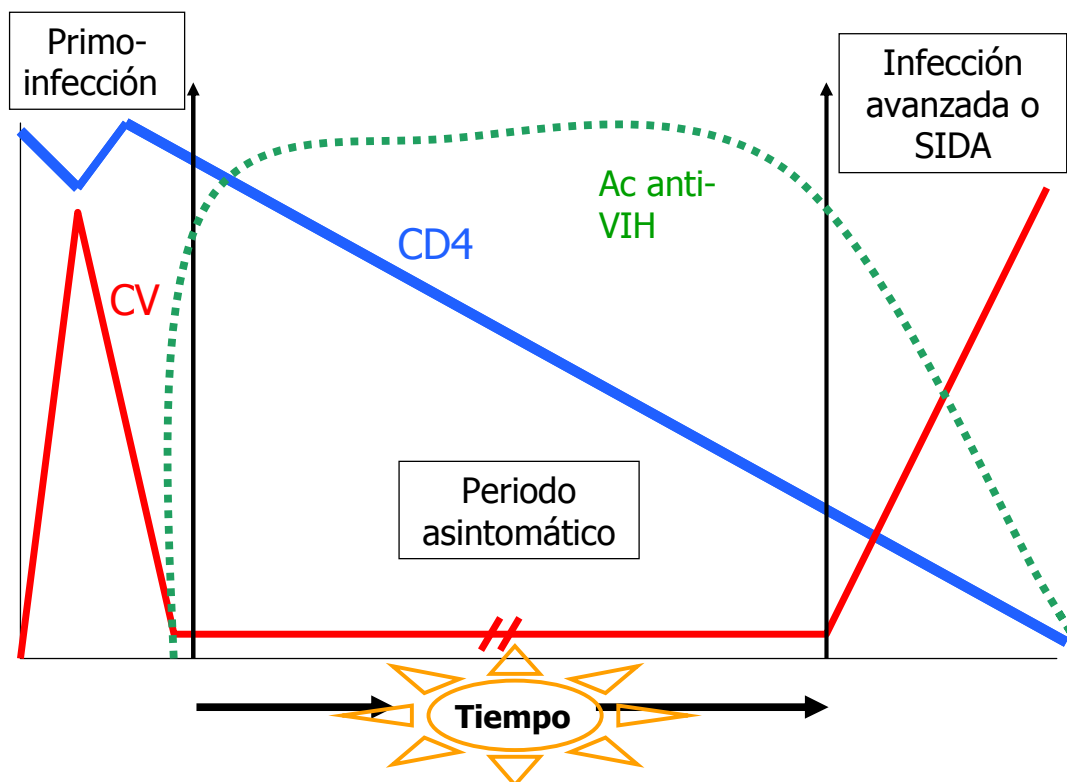


Figura I.3. Historia natural de la infección por VIH.

Recientemente, se ha empezado a hablar de otro grupo de pacientes definidos de manera diferente a los anteriores pero que parcialmente pueden coincidir. Son los denominados Controladores de Élite. La descripción de este grupo no está tan bien establecida como la de LTNP, pero en general se definen principalmente por los niveles de carga viral variando la descripción según si se tienen en cuenta o no los niveles de CD4 o el tiempo de infección. Actualmente se han establecido 2 grandes cohortes de controladores, el Consorcio de Controladores de VIH (Walker, 2007) y el grupo de estudio de controladores del VIH ANRS EP36 (Lambotte et al., 2005; Saksena et al., 2007) (Figura I.4). En la primera solamente se tienen en cuenta los niveles de viremia plasmática de los pacientes independientemente del resto de parámetros. Además distingue dos grupos de pacientes según la carga viral, denominando Controladores Virémicos los que mantienen carga viral detectable pero por debajo de 2000 copias/ml a lo largo del último año de seguimiento y en ausencia de TARGA; y Controladores de Elite, que se mantienen indetectables durante más de un año en ausencia de tratamiento. La segunda cohorte es más restrictiva ya que incluye como requisito que los pacientes se mantengan indetectables sin TARGA por más de 10 años. Por tanto, este último grupo de pacientes se corresponde con un subgrupo dentro de los LTNP que además controla la viremia.

Todas estas cohortes se han utilizado en numerosos estudios con el fin dilucidar la razón de la no progresión en estos grupos de pacientes, obteniendo diversos factores tanto por parte del virus como del huésped que están fuertemente relacionados con el retraso de la aparición del sida (resumido en Tabla I.2 y Figura I.2). Además de estos, los estudios más recientes que utilizan nuevas técnicas de *análisis de alto rendimiento* permiten una búsqueda amplia de posibles factores celulares del hospedador aún no relacionados con la infección. Los principales factores conocidos se describen detalladamente a continuación.

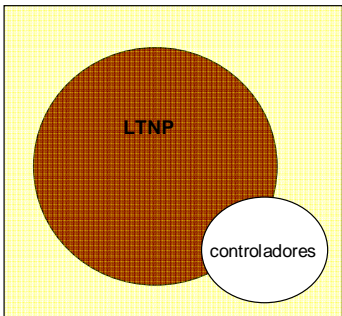
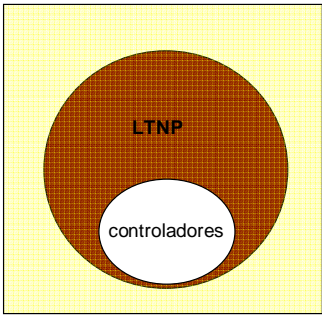
<h1>Controladores de la Infección VIH</h1>	
<p>Walker et al. (Top HIV Med. 2007 Aug-Sep;15(4):134-6) (<i>HIV Controllers Consortium</i>)</p> <p>-<u>Controladores élite</u>: ARN VIH <50 copias/mL No TARGA en el último año o antes Episodios de viremia son aceptables mientras no haya episodios consecutivos.</p> <p>-<u>Controladores virémicos</u>: ARN HIV <2000 copias/mL</p> 	<p>Saksena et al. (AIDS Rev. 2007 Oct-Dec;9(4):195-207)</p> <p>Lambotte et al. (Clin Infect Dis. 2005 Oct 1;41(7):1053-6) (<i>ANRS EP36 HIV CONTROLLERS study group</i>)</p> <p>- <u>Controladores élite</u>: ARN VIH <50 copias/mL No TARGA Infectados hace 10 años o más (LTNP con CV<50 copias/mL)</p> 

Figura I.4. Definiciones y cohortes de controladores de la infección por VIH.

I.4. FACTORES VIRALES CON INFLUENCIA EN LA PROGRESIÓN

Como se ha descrito anteriormente, el VIH posee en su genoma 9 genes de los cuales 5 (*gag*, *pol*, *env*, *tat* y *rev*) son esenciales para la replicación viral por su actividad estructural, enzimática o reguladora (Figura I.1). El resto (*nef*, *vif*, *vpu* y *vpr*) son genes dedicados a varios aspectos de la evasión y manipulación de la respuesta inmune innata y adaptativa. Defectos en estos últimos han sido relacionados con la no progresión de la enfermedad al dar lugar a una infección menos patogénica (Michael et al., 1995). A continuación se detalla como influye el efecto de cada uno de estos genes accesorios en la ausencia de progresión de la enfermedad.

I.4.1. Vif

La función de Vif es la inhibición directa de un grupo de proteínas humanas que tiene un gran potencial antiviral denominadas APOBEC y principalmente de la variante APOBEC3G (A3G) y en menor medida APOBEC3F (Figura I.5b). Tal es la potencia de este factor antiviral que en ausencia de Vif sería suficiente para prevenir la infección productiva del VIH (Sheehy et al., 2002). La proteína APOBEC3G es una citidina deaminasa que actúa en el proceso de replicación viral introduciendo cambios de Guaninas por Adeninas, lo que se conoce como hipermutación G-A. Parece que con esto se produce una catástrofe de error que es suficiente para evitar la propagación viral (Navarro et al., 2004). Aunque este parece ser el mecanismo más importante de la acción antiviral de APOBEC3G, existen otros relacionados específicamente con el proceso de integración por los que se impide la síntesis de DNA viral independientemente de la deaminación (Luo et al., 2007). Vif simultáneamente se une a una región específica de A3G lo que provoca el ensamblaje de una serie de proteínas celulares dando lugar a una cascada de señalización que lleva a la degradación de la proteína APOBEC3G por la vía del proteasoma. El equilibrio entre Vif y APOBEC3G es dinámico y sujeto a variación. Descompensaciones de los niveles de estas proteínas o polimorfismos en las mismas se han asociado con variaciones en la progresión de la enfermedad.

I.4.2. Vpr

Si bien Vpr es considerada también una proteína accesoria, su función es la más amplia y trascendental para la replicación. Entre las funciones que realiza tiene un efecto en la eficacia y precisión de la transcripción inversa, participa en el transporte nuclear del ADN viral como componente del complejo de preintegración, modifica la progresión del ciclo celular deteniéndolo en la fase G2 y además regula la apoptosis (Figura I.5b) (Le

Rouzić et al., 2005). El objetivo final de estos procesos es favorecer la replicación viral. Se han descrito diversos polimorfismos en esta proteína que están representados mayoritariamente en personas que no progresan a sida (Mologni et al., 2006; Caly et al., 2008).

Tabla I.2. Principales factores tanto virales como del huésped que se han asociado con la no progresión.

Factor	Función	Variante	Asociación no progresión
Virus			
Nef	Regulación de la expresión de CD4, HLA o CD3-TCR	Defectos en la secuencia	Retraso aparición SIDA
Vif	Inhibición de APOBEC3G	Y124A/Y127A	Disminuye la infectividad viral
Vpu	Regulación CD4. Inhibición de Teterina	Δ19 pb	Retraso aparición SIDA
Vpr	Parada del ciclo celular en G2, complejo de preintegración,...	Delección	Inhibición de la salida viral
Env	Relacionado con el tropismo viral	R77Q	Retraso aparición SIDA
Gag	Parte estructural de la cápside	V3 H34S	Retraso aparición SIDA
Subtipo		Tropismo CCR5	Retraso aparición SIDA
		Stop p17 y p24	Retraso aparición SIDA
		Subtipo E	Acelera la aparición de SIDA
Huésped			
<i>Celulares</i>			
<i>Entrada viral</i>			
CCR5	Coreceptor entrada viral	Δ32homozg Δ32hetezg C101X G106R/C178R ↑ n° copias	Resistencia a la infección Retraso aparición SIDA Previene la infección junto con Δ32 Resistencia/Retraso aparición SIDA Protección contra HIV infección
CCL3L1	Agonista de CCR5		
Defensinas	Regulación CD4, interrupción entrada viral		Efecto antiviral
<i>Fase celular</i>			
Trim5α	Efecto deletéreo de la capsida	I36Q Haplotipo 9	Protección contra HIV infección Incrementa la transmisión de VIH
Ciclofilina A APOBEC3G	Cofactor para la desencapsidación Proteína antiviral por hipermutación	1650 G 186R, C40693T ↑ expresión	Retraso aparición SIDA Acelera aparición de SIDA Retraso aparición SIDA
<i>Salida viral</i>			
TSG101	Encapsidación. Interacción con P6 de Gag	183C	Acelera la caída de CD4
ICAM-1	Usada por el virus para evadir respuesta humoral	↑ expresión	Aumenta la infectividad
Teterina (BST-2)	Anclaje del virus a la membrana		Desconocido
<i>Inmunológicos</i>			
HLA clase I	Presentación antigénica células CD8	HLA B*57 HLA B*58 HLA B*35 HLA B*07 SNP HCP5 mutado SNP HLAC5' mutado	Retraso aparición SIDA Retraso aparición SIDA Acelera la aparición de SIDA Acelera la aparición de SIDA Retraso aparición SIDA Retraso aparición SIDA
Células B	Respuesta inmunológica humoral	Anticuerpos neutralizantes	Retraso aparición SIDA
Células T	Respuesta inmunológica celular	↑ Funcionalidad ↓ PD1 ↓ CTLA4 Células Th17 ↑ Células Treg	Retraso aparición SIDA Retraso aparición SIDA Retraso aparición SIDA Retraso aparición SIDA Acelera la aparición de SIDA

I.4.3. Vpu

Vpu se ha implicado en la regulación de la expresión del receptor CD4 en la superficie de la membrana. Pero además de esta función, recientemente se ha descrito otra más importante. Parece que Vpu inhibe una proteína celular que afectaría directamente a la liberación del virus (Neil et al., 2008). Esta proteína se denomina Teterina (o BST-2, del inglés bone marrow stromal cell antigen-2) y sirve para unir las balsas lipídicas ricas en colesterol de la membrana plasmática. El virus sale de la célula a través de esa zona, donde la Teterina actúa anclando el virus a la membrana celular e impidiendo así su salida (Figura I.5b) (Pérez-Caballero et al., 2009). No está claro aún como actúa Vpu inhibiendo este proceso pero parece que virus defectivos en Vpu son menos patogénicos ya que no pueden salir de la célula.

I.4.4. Nef

La relevancia de *nef* en la progresión de la infección fue descrita por primera vez en una cohorte australiana de pacientes infectados por la misma transfusión de sangre y que recibieron un virus que tenía este gen deletado (Learmont et al., 1992). Se vio una correlación entre defectos en este gen y la progresión lenta a sida, lo que se confirmó después, tanto en humanos como en primates (Tolstrup et al., 2004). La proteína Nef está asociada con la cara citoplasmática de la membrana y es una de las primeras proteínas expresadas tras la infección, por lo que parece que tiene un papel importante en el tiempo o magnitud de la propagación (Cheng-Mayer et al., 1989). Se ha visto que está implicada (en algunos casos junto con Vpu) en la regulación de la actividad, localización y abundancia de una gran cantidad de receptores celulares de membrana como CD4, HLA o CD3-TCR (Figura I.5a) (revisado en Dang et al., 2009). Esto influye en la replicación, diseminación y persistencia del virus ya que se ve afectada la señalización entre células que es

fundamental para la correcta respuesta inmune. Por tanto, las personas infectadas con virus defectivos en *nef* podrían mantener una mayor conservación de esta respuesta que evite la progresión de la enfermedad.

1.4.5. Otros factores virales

Algunas de las demás proteínas virales también se han visto implicadas en la no progresión en ciertos trabajos, aunque en menor medida. Un ejemplo es la envuelta y más específicamente la región V2-V3 que determina el tropismo viral. Parece que en LTNPs el tropismo viral es mayoritariamente hacia el correceptor CCR5 y las cepas son fundamentalmente no inductoras de sincitios (Masciotra et al., 2002). Además, se ha descrito que tanto la longitud de estas regiones como sustituciones en determinados aminoácidos está fuertemente asociado con la no progresión.

También otras regiones del genoma viral, como determinados codones de parada en las regiones p17 y p24 del gen *gag*, se han relacionado con no progresión (Saksena et al., 2007). Mutaciones en estos genes pueden también afectar a la cinética de replicación del virus y de esta manera a los niveles de carga viral influyendo así en el grado de progresión.

Por otro lado hay evidencias de que el subtipo genético del virus influye en la inmunogenicidad, cinética de replicación, tropismo celular, patrones de transmisión, patogénesis y grado de progresión en el hospedador. Así, algunos estudios revelan que pacientes infectados por subtipo D del VIH-1 progresan más rápidamente a sida y mueren antes que aquellos infectados por subtipo A (Vasan et al., 2006).

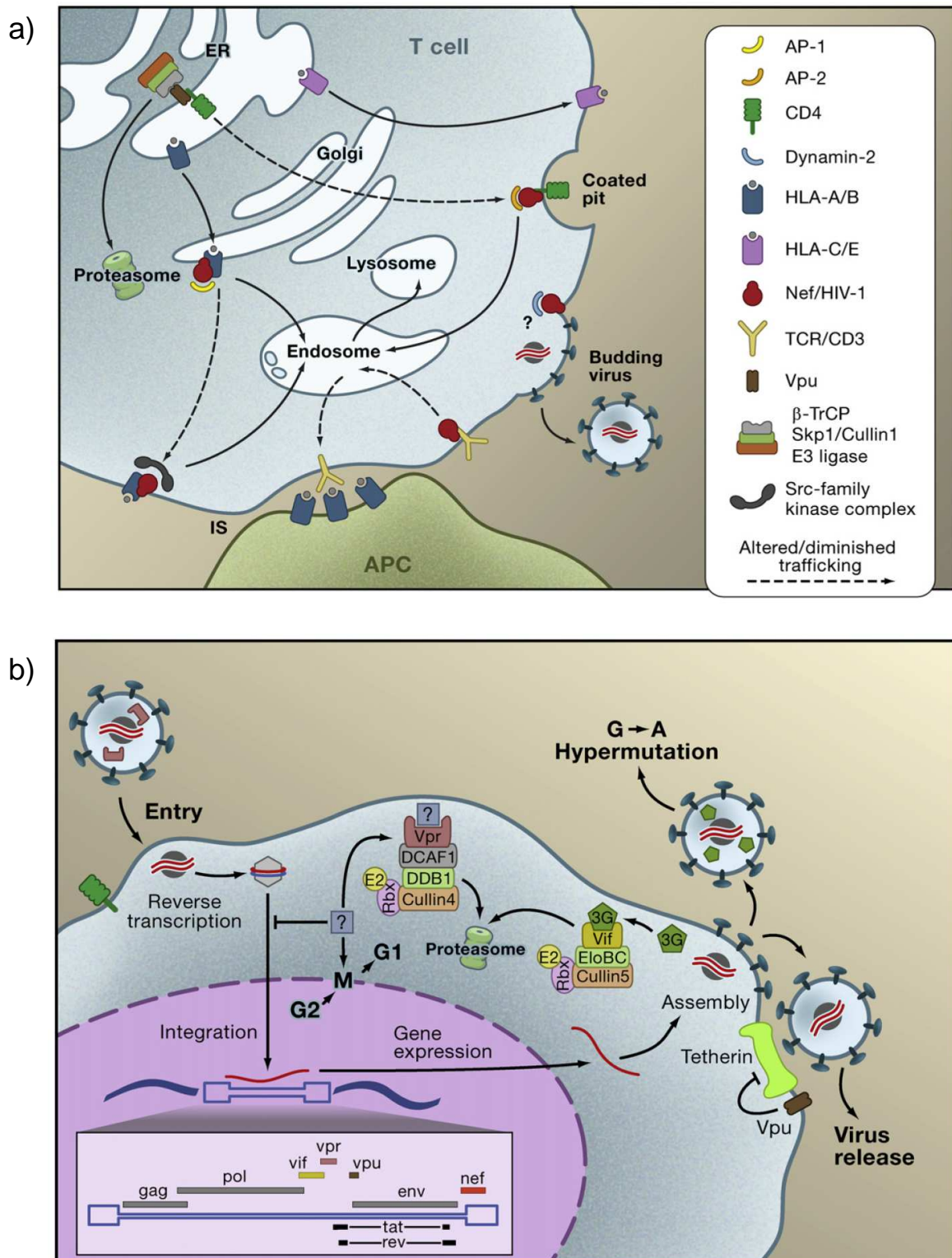


Figura I.5. Representación esquemática de la función de las proteínas accesorias virales Nef (a), Vif, Vpu y Vpr (b). (Adaptado de Malim et al., 2008).

I.5. FACTORES DEL HUÉSPED CON INFLUENCIA EN LA PROGRESIÓN

Son numerosos los factores del huésped, tanto genéticos como celulares o inmunológicos, que se han relacionado con el control de la infección por VIH ([revisado en Lama et al., 2007](#)). Estos factores afectan a diferentes fases del ciclo viral, lo que se describe en detalle a continuación (Figura I.2, Tabla I.2).

I.5.1 Factores celulares

5.1.1. Entrada viral

Uno de los factores que se han relacionado más firmemente con la no progresión a sida es la delección de 32 pares de bases en el receptor celular CCR5. Esta mutación se presenta con una frecuencia de 4-15% (1% en homocigosis) en caucásicos aunque mayor en el norte de Europa, y es raro encontrarla en Asiáticos y Africanos ([Stephens et al., 1998](#)). El receptor CCR5 es el que mayoritariamente utiliza el virus como coreceptor de entrada a la célula. No existen evidencias de infección por cepas VIH-1 con tropismo hacia CCR5 en personas que poseen esta delección en homocigosis, sino que las infecciones conocidas son por cepas CXCR4. Por otro lado existe una gran representación de la mutación en heterocigosis en pacientes LTNPs ([Stewart et al., 1997](#)). Además de esta mutación, han sido descritos otros polimorfismos en este gen que generan también un coreceptor truncado y se relacionan con una progresión lenta aunque en menor medida ([Blanpain et al., 2000](#)).

También se ha observado una implicación de algunas citoquinas que son ligando natural de estos coreceptores en la defensa antiviral. Es el caso de la proteína MIP1 α , ligando natural de CCR5, que está codificada por el gen CCL3. En el genoma existe una duplicación de este gen en tándem (denominándose CCL3L1) de forma que parece que a

mayor número de copias del mismo hay una mayor protección frente a la infección por VIH ([González et al., 2005](#)). MIP1 α actuaría compitiendo con el virus por el sitio de unión al correceptor. Además, una vez unido ligando y receptor, este dejaría de expresarse en la membrana y dificultaría así la entrada del virus. Por esta razón, el aumento de la producción de la proteína MIP1 α se considera un mecanismo potente en la inhibición de la entrada viral.

Variaciones en otros receptores de quimiocinas como son CCR2, además del ligando natural de CXCR4, conocido como SDF-1 u otro ligando de CCR5, RANTES, también se han relacionado en menor medida con la progresión de la enfermedad ([Winkler et al., 1998](#); [Mangano et al., 2000](#); [An et al., 2002](#)).

Otras moléculas implicadas en la protección frente a la infección son las denominadas defensinas ([Klotman et al., 2006](#)). Estas moléculas actúan a diferentes niveles de la entrada viral modulando la expresión de la molécula CD4 e impidiendo la fusión de las membranas viral y celular. El papel real de estas proteínas no está muy claro pero parece que podrían afectar a la susceptibilidad y progresión de la enfermedad.

1.5.1.2. Fase celular

Hay diversas proteínas celulares que influyen en los procesos post-entrada del virus. Algunas de ellas son TRIM5 α (tripartite motif 5 α) y Ciclofilina A. Estas dos proteínas actúan en el mismo momento pero con efectos diferentes. TRIM5 α parece influir sobre la desencapsidación prematura, bloquea la transcriptasa inversa e impide el transporte del virión al núcleo ([revisado en Strebel et al., 2009](#)). Los estudios indican que la ciclofilina A estaría protegiendo la cápside del efecto de TRIM5 α ([Luban, 2007](#)). Ambas se unen a la cápside del virión una vez que ha entrado pero, mientras que la Ciclofilina A parece ser necesaria en los primeros pasos de la replicación viral, TRIM5 α tiene un efecto deletéreo

de la misma aunque no está claro si un factor depende del otro (Stremlau et al., 2006). Polimorfismos en ambas proteínas afectan al virus dando lugar a una mayor o menor replicación viral (Kootstra et al., 2007).

Por otro lado, como se ha descrito anteriormente, también se encuentra en el citoplasma APOBEC3G que provoca hipermutación en virus defectivos en Vif. En LTNP se ha visto una mayor expresión de esta proteína respecto a progresores normales con lo que se confirma su papel como protector antiviral (Jin et al., 2007).

1.5.1.3. Salida viral

En el proceso de encapsidación son necesarias varias proteínas celulares, entre ellas Tsg101 que interacciona con la proteína P6 de Gag. No se sabe muy bien cómo afectan a la progresión cambios en esta proteína, ya que se ha descrito un polimorfismo que retrasa la progresión *in vitro* pero parece que tiene el efecto contrario *in vivo* (Bleiber et al., 2005).

Además de ésta, se han identificado recientemente la proteína Teterina, con un papel significativo en la salida como se ha descrito anteriormente, y la proteína ICAM-1 que influye en la evasión de virus frente a la respuesta inmune humoral. Esta proteína de adhesión celular pasa a la membrana viral en el proceso de salida e impide la unión de los anticuerpos específicos de Gp120 a sus epítomos, haciendo a los viriones más resistentes a la respuesta inmune (Fortin et al., 1997). Cambios en la expresión de esta proteína se relacionan con la progresión.

1.5.1.4. Búsqueda de nuevos factores celulares

Las últimas y más novedosas investigaciones plantean el uso de técnicas de alto rendimiento para estudiar factores de progresión haciendo un rastreo celular. Estas técnicas se basan en lo que se han denominado microarray que es una matriz bidimensional en la

que se encuentra inmovilizado una gran cantidad de material biológico que permite la automatización simultánea de miles de ensayos. Dependiendo de la naturaleza del material que se inmoviliza se pueden estudiar polimorfismos en el ADN genómico, ARNm expresados por determinadas células o cantidad y distribución de proteínas.

Con esto, se ha abierto un nuevo campo en la búsqueda de factores relacionados con la no progresión ya que permiten hacer un rastreo a través de la genética celular dando una gran cantidad de información de este grupo particular de pacientes.

Así, se ha visto en un estudio pionero que el VIH necesita alrededor de 200 proteínas celulares para llevar a cabo correctamente la infección ([Brass et al., 2008](#)). Posteriormente otros trabajos, que utilizaron para el experimento líneas celulares diferentes, coinciden sólo parcialmente en estas proteínas, aunque verifican la necesidad de otras tantas ([Konig et al., 2008](#); [Zhou et al., 2008](#)). Un metanálisis posterior condensando los resultados de estos estudios concluye que los genes comunes están involucrados en gran medida con funciones relacionadas con la replicación viral, abriendo un gran campo de estudio de nuevos factores con influencia en la infección ([Bushman et al., 2009](#)).

Por otro lado, a partir de lo que se conoce como estudios de asociación a lo largo de todo el genoma (en inglés GWAS, *genome wide association studies*), se han descrito tres polimorfismos de un solo nucleótido (*single nucleotide polymorphisms*, SNP) localizados en los genes HCP5, HLA C y ZNRD1 que explican el 15% de la variabilidad interindividual en el nivel de viremia tras la primoinfección ([Fellay et al., 2007](#)). Los tres polimorfismos están localizados en regiones asociadas a determinados HLA (la mutación en HCP5 se relaciona fuertemente con la presencia de HLA B*5701) lo que apoya la importancia de este factor en el curso de la infección.

I.5.2. Factores inmunológicos

Son muy numerosos los aspectos relacionados tanto con la inmunidad innata como adaptativa que se han relacionado con la protección de la infección por VIH.

Algunos de estos factores se han visto representados especialmente en personas que no progresan a sida como es el caso de determinados HLA y su asociación con un mayor o menor control de la replicación viral. Así, están descritos numerosos alelos asociados tanto con progresión rápida como lenta (Tabla I.3), como los supertipos B27 y B58, y específicamente los alelos B*5701 y B*2705 que se han visto representados en mayor proporción en pacientes LTNP caucásicos respecto a progresores normales (Deeks SG, 2007). Esto se explica posiblemente por la relación de estos HLA con una respuesta inmunológica más eficaz. Asimismo, otros supertipos de HLA como el B7 donde se encuentran el alelo B*35, se han relacionado mayoritariamente con la progresión rápida (Flores-Villanueva et al., 2003). Como se ha comentado anteriormente, los nuevos estudios relacionan principalmente dos polimorfismos localizados en el gen HCP5 y HLA C respectivamente con un control mejor de la infección (Fellay et al., 2007; Limou et al., 2009).

Tabla I.3. Asociación de alelos de HLA clase I con la progresión de la infección por VIH en población caucásica (Adaptado de Stephens, 2005). PR, progresión rápida; NP, no progresión.

HLA	Alelos no protectivos (Asociados con PR)	Alelos protectivos (Asociados con NP)
A	01, 23, 24, 29	25, 26, 32, 34, 66
B	07, 08, 1508, 22, 35, 37, 44, 49, 53, 54, 55, 56, 67, 78	13, 14, 1503, 1509, 1510, 1518, 27, 38, 39, 48, 51, 57, 58, 73, 81
C	04, 07, 16	08

En la infección por VIH, como en otras infecciones virales, la respuesta inmunológica de tipo celular (mediada por linfocitos T CD4+ y CD8+) probablemente juega un papel más importante que la humoral (mediada por anticuerpos). La mayoría de las proteínas del virus son capaces de inducir anticuerpos y algunos de estos anticuerpos (especialmente los dirigidos contra la proteína de la envuelta) poseen capacidad neutralizante. Sin embargo los niveles de anticuerpos con esta capacidad son generalmente bajos y muy rápidamente se observa un escape viral ya que la zona contra la que suelen dirigirse (lazo V3 de la glicoproteína gp120) es una de las que presenta mayor variabilidad genética ([Wei et al., 2003](#)). Algunos estudios han visto que en pacientes que no progresan a sida se produce un mayor y más amplio espectro de anticuerpos neutralizantes ante el propio virus pero también ante virus heterólogos ([Mahalanabis et al., 2009](#)).

Aún así, en este campo hay datos contradictorios y probablemente sea más importante el papel de la respuesta celular, y más específicamente la respuesta de las células T CD8+. El hallazgo experimental más contundente para apoyar el papel de este tipo de respuesta, proviene de estudios en simios en los que se han eliminado las células CD8+ de la circulación. En dichos animales el virus replica de forma incontrolada y progresan rápidamente a sida ([Schmitz et al., 1999](#)). Recientemente, hay estudios que han observado que la funcionalidad de las células T CD8+ es mayor en no progresores que en progresores ([Betts et al., 2006](#)), además de que hay menor expresión en pacientes que no progresan de la molécula PD1, inhibidora de la proliferación de los linfocitos T CD8+ ([Barber et al., 2006](#)). Por otro lado, hay descritos epítomos virales que están relacionados con una mejor respuesta citotóxica en determinados contextos de HLA del paciente ([Miura et al., 2008b](#)).

En cuanto a la actividad de las células T CD4+ parece que la pérdida masiva en las primeras fases de la infección es determinante en la progresión posterior ([Guadalupe et al.,](#)

2003), bien por su función en el establecimiento de la respuesta inmune o por la acción que pueden ejercer en mantener la capacidad citotóxica de las células CD8+. Además, en LTNPs se ha observado una mayor capacidad de proliferación de los linfocitos T CD4+ (Migueles et al., 2002). Recientemente, esto se ha relacionado con la molécula CTLA-4, inhibidora de la proliferación de células T CD4+, que se encuentra menos expresada en LTNP (Martínez et al., 2005).

Por otro lado, parece que existe una mayor conservación de la producción de la interleukina 17 por parte de las células T CD4+ en niños que mantienen la carga viral indetectable (Ndhlovu et al., 2008). La IL17 es una citoquina pro-inflamatoria identificada en células T citotóxicas de ratón y que en humanos es producida por un subgrupo de células T CD4+ (T helper, Th), las células Th17. Estas células tienen un papel importante en controlar infecciones bacterianas y fúngicas, además de estar relacionadas con regeneración epitelial y reclutamiento de neutrófilos (Ye et al., 2001; Cooper, 2007; von Vietinghoff et al., 2009; Freitas et al., 2009). Así, parece que la depleción o disfunción de las células Th17 durante la infección por VIH podría ser un factor importante en la patogénesis de la infección (Khaitan et al., 2009), lo que se ha corroborado en trabajos en los que se ha analizado el tejido linfático asociado a intestino (revisado en Hofer et al., 2009).

Otro grupo de células T que parece que pueden influir en la progresión son las T reguladoras (Treg), que tienen un papel crítico en el mantenimiento de una adecuada respuesta inmunológica, suficiente para controlar infecciones pero sin llegar a causar inmunopatología. Respecto a la función que juegan estas células en la infección por VIH existe bastante controversia, habiendo trabajos que muestran papeles contradictorios. Por un lado se les da un valor negativo a través de la inhibición de la respuesta inmune antiviral y peor progresión de la enfermedad. Por el contrario, otros muestran una

asociación de un mayor número de estas células con progresión más lenta de la enfermedad por reducir la activación celular y por tanto la apoptosis ([revisado en Sempere et al., 2007](#)).

En resumen, parece que el grupo de pacientes no progresores podría tener una respuesta inmunológica más conservada frente al VIH, lo que ayudaría a controlar la infección por más tiempo.

I.6. OTROS FACTORES CON INFLUENCIA EN LA PROGRESIÓN

Además de los ya descritos, un gran número de parámetros, más relacionados con el ambiente, se han identificado con influencia en la progresión. Más que como factores de no progresión, estos actúan como cofactores de la replicación viral haciendo más rápido el curso de la infección. Entre ellos se encuentran la coinfección con otros virus como VHB, VHC o HTLV-1, 2 o VIH-2, además de otros patógenos como micoplasmas.

La edad también se ha visto que puede estar influyendo, ya que, en general, cuanto más avanzada es la edad en que se produce la infección, más rápida es la progresión a sida. Como excepción están los recién nacidos que también suelen presentar una progresión más rápida que el resto de infectados. El sexo no parece jugar un papel importante. Asimismo, la raza o la zona geográfica no tienen influencia ya que se han encontrado no progresores de múltiples etnias y países.

I.7. ANTECEDENTES DE LA COHORTE DE LTNP A ESTUDIO

La cohorte utilizada en el presente estudio se estableció en el año 1996 en el Hospital Carlos III de Madrid, incluyendo en ella pacientes VIH+ con más de diez años de infección asintomática en ausencia de tratamiento antirretroviral, y que han mantenido unos niveles de células T CD4+ por encima de 500 células/ μ l ([Soriano et al., 1996](#)). Por

tanto se trata de una cohorte bien definida y con un seguimiento regular de 2-3 visitas por año, llegando algunos de los pacientes que la componen a reportar una infección asintomática superior a veinte años ([Rodés et al., 2004](#)). Además de los parámetros clínicos, a lo largo de este tiempo se han evaluado algunos otros factores. Así se ha visto que todos los pacientes están infectados con el subtipo B del virus, llevando además una región LTR funcional en su mayoría, observando solamente un mayor número de defectos en la región promotora Sp1 respecto a los virus de progresores ([Ramírez de Arellano et al., 2007](#)). Además se ha observado cómo estos pacientes presentan, respecto a progresores típicos, un mayor nivel de determinadas subpoblaciones de células T CD8⁺ en respuesta a estímulos policlonales, aunque no se demostraron diferencias en la respuesta CD8⁺ específica frente a Gag y Nef. ([López et al., 2008](#)).

En el presente trabajo se ha utilizado esta cohorte de pacientes para analizar diferentes parámetros virales y del huésped tanto a nivel genómico como celular e inmunológico.

Objetivos

1. Caracterizar los genes virales accesorios *vif*, *vpr*, *vpu* y *nef* en pacientes LTNP y progresores típicos. Examinar la proporción de pacientes con virus defectivos.
2. Analizar los principales factores genotípicos del hospedador que podrían proteger de la progresión en la infección por VIH.
3. Comparar la expresión genética diferencial de las células T CD3+ en un grupo de no progresores respecto a progresores típicos de la infección por VIH. Identificar posibles patrones de expresión diferencial en cada grupo.
4. Investigar el papel de las células Th17 en la progresión de la infección por VIH. Identificar los patrones de expresión de la molécula IL17 y su receptor IL17R en linfocitos T CD4+ y CD8+ y su relación con el retraso de la aparición de sida.

Capítulo 1

Caracterización de genes accesorios del VIH y su relación con la progresión

1.1. INTRODUCCIÓN

En 1992 se observó una gran proporción de defectos genéticos en la secuencia del VIH-1 (específicamente en la proteína Nef) en un grupo de pacientes infectados con el mismo virus a partir de una transfusión sanguínea. Todos ellos presentaban una progresión lenta de la enfermedad ([Learmont et al., 1992](#)) con lo que esta característica común llevó a pensar que el determinante de la progresión podría estar relacionado con virus defectuosos. Tras este hallazgo inicial y con el estudio de otros pacientes con progresión lenta se han descrito nuevos factores, tanto por parte del virus como del hospedador, como causa del retraso de la enfermedad. Defectos en los genes accesorios virales (*vif*, *vpu*, *vpr* y *nef*), se han asociado con la progresión lenta a sida ya que, si bien no son imprescindibles para la replicación del VIH, son muy importantes para llevar a cabo una infección patogénica *in vivo* ([revisado en Li et al., 2005](#)).

Tanto *vif* como *vpu* son dos genes con una función similar ya que se encuentran en el genoma viral con el fin de contrarrestar la acción de dos proteínas antivirales humanas. Por un lado Vif antagoniza la acción de APOBEC3G, una citidin deaminasa que se encuentra de manera natural en el citoplasma celular y que se encapsida con los viriones dando lugar a lo que se conoce como fenómeno de hipermutación en la nueva infección ([revisado en Harris et al., 2004](#)). Este fenómeno consiste en provocar cambio de guaninas por adeninas en el proceso de replicación, introduciendo gran número de errores en el genoma, lo que conduciría a la catástrofe de error. Vif se une específicamente a esta molécula degradándola e impidiendo que se de este gran efecto antiviral ([Holmes et al., 2007](#)), por lo que el balance de estas moléculas en el citoplasma puede hacer que la célula sea más o menos permisiva para el VIH.

Por otro lado Vpu antagoniza una molécula celular recientemente descubierta denominada Teterina o BST-2. Esta proteína ejerce un efecto antiviral en el momento de salida del virión de la célula, uniéndose a él y anclándolo a la superficie, lo que impide la liberación del mismo. Vpu actúa uniéndose a la Teterina antes de que llegue a la membrana celular, provocando su degradación por la vía del proteasoma (Douglas et al., 2009). Vpu también tiene un efecto alternativo impidiendo que la molécula CD4 se exprese en la superficie de la célula (Margottin et al., 1998). Este efecto es similar al que tiene Nef, proteína especializada en reordenar diferentes moléculas celulares. Nef regula a la baja la expresión en superficie tanto de la molécula CD4 como del complejo MHC y también del complejo CD3-TCR. Todo esto conduce a una inhibición del reconocimiento entre células necesario para llevar a cabo la correcta respuesta inmune (Das et al., 2005).

Por último, Vpr también esta encargada de modular la maquinaria celular en varios puntos para el beneficio del virus. Así, participa en la formación del complejo de preintegración, apoptosis y parada del ciclo celular en la fase G2, lo que parece que es beneficioso para la activación de los complejos LTR que activan transcripción viral (Le Rouzic et al., 2005).

En este estudio se han caracterizado genéticamente estas proteínas accesorias en un grupo de LTNP en comparación con pacientes progresores típicos, evaluando posibles diferencias a nivel de secuencia viral que expliquen la progresión.

1.2. PACIENTES Y MÉTODOS

1.2.1. Pacientes

Se utilizaron para el estudio 33 LTNP de la cohorte del Hospital Carlos III y 15 pacientes VIH+ progresores. Tal y como se ha descrito en la introducción, los LTNP se definieron como pacientes VIH+ con niveles de células T CD4+ por encima de 500 células/ μ l durante más de 10 años de infección. El grupo control de pacientes VIH+ con progresión típica, se definió como individuos naïve con un descenso significativo de células T CD4+ mayor de 100 células/ μ l/año o que en un momento posterior a la recogida de la muestra han iniciado terapia antirretroviral como indicador de progresión. La gran mayoría de los progresores presenta estas características dentro de los cinco primeros años de seroconversión. Todos los pacientes estaban infectados cepas virales clasificadas dentro del subtipo B del VIH-1.

1.2.2. Determinación de parámetros clínicos

La carga viral del VIH se determinó cuantificando el ARN viral en plasma, utilizando una técnica comercial de bDNA (branched DNA assay; Versant HIV-1 RNA v3.0 Siemens, Barcelona, España) con un límite de detección de 50 copias de ARN-VIH/ml.

El nivel de células T CD4+ se evaluó por citometría de flujo. La sangre total fue tratada con el kit comercial IMMUNOPREP (Beckman-Coulter, Miami, FL) que rompe los glóbulos rojos, estabiliza los leucocitos y fija la membrana celular. A continuación la muestra se incubaba con el reactivo CYTO-STAT[®]tetraCHROME[™] (Beckman-Coulter, Miami, FL), que incluye, entre otros, el anticuerpo CD4-RD1-PE y se analiza empleando un citómetro de flujo FC 500 (Beckman Coulter, Fullerton, CA). El resultado se expresa en

forma de cifra absoluta de células por microlitro de sangre y como porcentaje respecto al total de linfocitos circulantes.

1.2.3. Extracción de ácidos nucleicos

A partir de muestras de sangre de estos pacientes se obtuvieron mediante un gradiente de densidad por Ficoll-Histopaque (Sigma Diagnostics, USA) tanto el plasma, donde se encuentra el virus circulante, como células mononucleares de sangre periférica (CMSP), en cuyo ADN se encuentra integrado el material genético viral.

Después se extrajo el ARN viral a partir de plasma o el ADN total desde células usando un kit de extracción de ARN (QIAamp viral RNA mini extracción kit, Qiagen, Alemania) o ADN (QIAamp DNA blood extraction kit, Qiagen, Alemania) respectivamente. Todas las amplificaciones se realizaron preferentemente a partir de ARN, utilizando sólo el ADN cuando no era posible amplificar el ARN debido a cargas virales bajas.

1.2.4. Amplificación y secuenciación de ácidos nucleicos

Se usaron diferentes combinaciones de cebadores para la amplificación y secuenciación de cada uno de los genes analizados. En todos los casos se llevaron a cabo PCR anidadas con el fin de conseguir una mayor eficiencia de amplificación. Se usó el kit AccessQuick RT-PCR system (Promega, USA) cuando se partió de ARN para realizar un paso previo de transcripción inversa junto con la PCR. Cuando se partió de ADN, se utilizó PCR master mix (Promega, USA) siguiendo siempre las condiciones del fabricante. Los cebadores y condiciones de cada ensayo se detallan a continuación.

1.2.4.1. Vif

La amplificación de la región Vif (579 pares de bases), se llevó a cabo a partir del ARN o ADN de los pacientes infectados mediante una RT-PCR o PCR respectivamente, seguidas de PCR anidada. La 1ª PCR (ó RT-PCR) externa, se realizó con los cebadores VIF-IS (5' GTA CAA ATG GCA GTA TTC ATC CAC 3') y VIF-IA (5' TTA TTA TGG CTT CCA CTC CTGCCC 3'). Para la 2ª PCR interna se amplificó a partir del producto de la PCR externa con los cebadores VIF-F (5' GGT GAA GGG GCA GTA GTA ATA CAA 3') y VIF-R (5' GTG TCC ATT CAT TGT ATG GCT CCC 3'). Las condiciones de la primera reacción fueron (tras un periodo de 48°C/45min en el caso de que se lleve a cabo el paso de transcripción inversa): 94°C/2min, 40 ciclos de 94°C/30 sg, 45°C/30 sg, y 72°C/2 min, con una extensión final a 72°C durante 10 minutos. Las condiciones de la PCR interna fueron las mismas, excepto que la temperatura de hibridación fue a 55°C.

1.2.4.2. Vpr

La amplificación de la región Vpr (288 pares de bases), se llevó a cabo a partir del ARN o ADN de los pacientes infectados mediante una RT-PCR o PCR respectivamente, seguidas de PCR anidada. La 1ª PCR (ó RT-PCR) externa, se realizó con los cebadores 5195D (5' GTT CAG AAG TAC ACA TCC CAC TAG G 3') y 6486R (5' GTG GGT TGG GGT CTG TGG GTA CAC A 3'). Para la 2ª PCR interna se amplificó a partir del producto de la PCR externa con los cebadores 5287D (5'CAG GGA GTC TCCA TAG AAT GGA G 3') y 5991R (5' TGT CTC CGC TTC TTC CTG CCA TAG G 3'). Las condiciones de la primera reacción fueron (tras un periodo de 48°C/45min en el caso de que se lleve a cabo el paso de transcripción inversa): 94°C/1min, 40 ciclos de 94°C/1min, 45°C/45 sg, y 72°C/45 sg, con una extensión final a 72°C durante 10 minutos. Las condiciones de la PCR interna fueron las mismas.

1.2.4.3. Vpu

La amplificación de la región Vpu (246 pares de bases), se llevó a cabo a partir del ARN o ADN de los pacientes infectados mediante una RT-PCR o PCR respectivamente, seguidas de PCR anidada. La 1ª PCR (ó RT-PCR) externa, se realizó con los cebadores Vpu-F1 (5' GGC ATC TCC TAT GGC AGG 3') y Vpu-R1 (5' GGG GTC TGT GGG TAC AC 3'). Para la 2ª PCR interna se amplificó a partir del producto de la PCR externa con los cebadores Vpu-F2 (5' GCG GAG ACA GCG ACG AAG 3') y Vpu-R2 (5' CCA TAA TAG ACT GTG ACC 3'). Las condiciones de la primera reacción fueron (tras un periodo de 48°C/45min en el caso de que se lleve a cabo el paso de transcripción inversa): 94°C/2min, 40 ciclos de 94°C/15sg, 50°C/5 sg, y 72°C/15 sg, con una extensión final a 72°C durante 10 minutos. Las condiciones de la PCR interna fueron las mismas.

1.2.4.4. Nef

La amplificación de la región Nef (615 pares de bases), se llevó a cabo a partir del ARN o ADN de los pacientes infectados mediante una RT-PCR o PCR respectivamente, seguidas de PCR anidada. La 1ª PCR (ó RT-PCR) externa, se realizó con los cebadores Nef-1 (5' GCA GTA GCT GAG GGG ACA GAT AGG 3') y Nef-3 (5' GTA CAG GCA AAA AGC AGC TGC 3'). Para la 2ª PCR interna se amplificó a partir del producto de la PCR externa con los cebadores Nef-2 (5' ATA CCT AGA AGA ATA AGA CAG G 3') y Nef-4 (5' TTA TAT GCA GGA TCT GAG GG 3'). Las condiciones de la primera reacción fueron (tras un periodo de 48°C/45min en el caso de que se lleve a cabo el paso de transcripción inversa): 94°C/3min, 40 ciclos de 94°C/30sg, 43°C/1min, y 72°C/1min, con una extensión final a 72°C durante 7 minutos. Las condiciones de la PCR interna fueron las mismas.

1.2.5. Secuenciación

El producto de la PCR anidada (amplicón) fue purificado y posteriormente secuenciado en ambas direcciones mediante secuenciación automática utilizando el kit comercial dRhodamine Dye Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems, USA) en un secuenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystem, USA). Los cebadores utilizados en la reacción de secuencia fueron los mismos que se utilizaron en la 2ª PCR como cebadores internos. Todas las secuencias obtenidas se editaron utilizando el programa Lasergene versión 7 (DNASTAR, USA).

1.2.6. Análisis de datos

A partir de las secuencias obtenidas se realizaron diferentes alineamientos para cada gen estudiado. El alineamiento múltiple de las secuencias se hizo automáticamente utilizando el programa Clustal X (Thompson et al., 1994), eliminando las columnas que contenían desapareamientos y “gaps”. Una vez alineadas todas las secuencias, la matriz de distancias evolutivas fue estimada usando el parámetro de Kimura localizado dentro del programa MEGA (Tamura et al., 2007). La topología del árbol fue obtenida usando el método de Neighbour-Joining.

A partir de los alineamientos corregidos con el programa GENEDOC (Nicholas et al., 1997) y utilizando como consenso las proteínas de la cepa de referencia para VIH-1, HXB2, se buscaron zonas descritas en la bibliografía con una relevancia en la estructura y función de la proteína o con una asociación previa con la no progresión.

La determinación de la selección positiva se hizo a partir del cálculo del número de cambios sinónimos (dS) y no sinónimos (dNS) utilizando el programa MEGA (Tamura et al., 2007), siendo efectiva cuando se cumple que $dNS > dS$ de una manera significativa usando el test estadístico exacto de Fisher (valor $p < 0.05$).

El estudio de hipermutación en las secuencias se realizó a partir de la herramienta Hypermut 2.0 (Rose et al., 2000) de la base de datos de Los Álamos (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HYPERMUT/hypermut.html>) donde se tienen en cuenta los cambios G=>A ocasionados específicamente por la proteína APOBEC3G. Para especificar si una secuencia específica está hipermutada la herramienta usa un test exacto de Fisher, considerando que hay hipermutación significativa cuando valor $p < 0.05$.

1.3. RESULTADOS

1.3.1. Características de la población estudiada

En la Tabla 1.1 se resumen las características de los pacientes del estudio, donde se observa cómo las poblaciones analizadas son claramente diferentes, principalmente en las vías de transmisión y en los parámetros clínicos, ya que el grupo de LTNP posee niveles más conservados de células T CD4+ y una carga viral menor. Un 73% de los pacientes progresores iniciaron tratamiento tras la recogida de la muestra como un indicio de progresión.

Tabla 1.1 Características de la población estudiada.

Características	Pacientes (n=48)		Valor p
	LTNP (n=33)	Progresores (n=15)	
Sexo (nºhombres)	24 (72,7%)	13 (86,7%)	0,287
Edad (años)	41 [37-47]	32 [28-38]	0,002
Tiempo seguimiento (años)	16 [13-21]	1 [1-3]	<0,001
Grupo de riesgo			<0,001
ADPV	28 (84,8%)	1 (6,7%)	
HMSX	3 (3,91%)	11 (77,3%)	
HTSX	2 (6,1%)	3 (20%)	
CD4abs (cels/ul)	575 [433-797]	352 [275-481]	0,004
CD4%	30 [24,5-37]	22 [18-24]	0,003
LogCV (log copias/ml)	2,65 [1,7-3,42]	4,28 [3,81-4,86]	<0,001

NOTA. Los datos se presentan como mediana [rango intercuartílico]

1.3.2. Análisis de las proteínas virales

En este estudio se han analizado los genes *vif*, *vpu*, *vpr* y *nef*, tanto de LTNP como de progresores examinando en primer lugar posibles defectos genéticos en la secuencia de aminoácidos que puedan relacionarse con la mejor o peor funcionalidad de la proteína. En segundo lugar, a partir de las secuencias de nucleótidos de cada gen se realizó un árbol filogenético para contrastar la separación entre las dos poblaciones virales estudiadas. Por último se midió si existe una presión selectiva hacia una evolución positiva de las secuencias, así como un mayor o menor efecto antiviral a través del fenómeno de hipermutación de la proteína APOBEC3G del huésped, reflejado en la existencia de diferencias en el número de bases Adenina y Guanina.

1.3.2.1. Vif

Tras la amplificación se obtuvo la secuencia de nucleótidos de 23 LTNP y 13 progresores. Estas secuencias se tradujeron a aminoácidos y alinearon con el fin de estudiar grandes defectos genéticos en los virus de los pacientes. Ningún paciente presentó inserciones o deleciones en su secuencia. Además se analizaron diferentes regiones que previamente se han reportado con importancia en la funcionalidad de la proteína (Figura 1.1a). Así, los residuos triptófano de las posiciones 5, 11, 21, 38, 79 y 89 (en línea azul) parecen ser esenciales para la supresión selectiva de APOBEC3G y APOBEC3F (Tian et al., 2006). El dominio DRMR₁₇, en verde, determina la especificidad de Vif hacia diferentes proteínas A3G celulares por unión directa (Schrofelbauer et al., 2004). El dominio WxSLVK₂₆ (en violeta) representa un motivo funcional que juega un papel crítico en regular la actividad neutralizante contra A3G y A3F (Dang et al., 2009). Por otro lado, las regiones YRHHY₄₄ (Simon et al., 2005) y la región YxxL₇₂ (naranja y azul respectivamente) (He et al., 2008; Yamashita et al., 2008), se han identificado por su papel en la unión específica con A3G y A3F. Los aminoácidos E₈₈, C₁₁₄ y C₁₃₃ (En línea verde),

son críticos para la infectividad en estudios *in vitro* (Ma et al., 1994; Fujita et al., 2003). Por último, Vif contiene el motivo constante SLQYLA₁₄₉ (en rojo), donde determinadas mutaciones impiden el bloqueo y degradación de la proteína APOBEC3G inducido por Vif (Yu et al., 2003; Schmitt et al., 2009).

En el análisis realizado, la mayoría de los motivos resultaron ser zonas conservadas en todos los pacientes. Sólo se observaron cambios en los motivos DRMR₁₇ e YRHHY₄₄ por aminoácidos de la misma carga química. Esto no supone a priori un cambio sustancial en la estructura de la molécula y además no fueron característicos de alguno de los grupos estudiados. Sí se observaron pequeñas deleciones de un aminoácido en algunas de estas zonas en 5 pacientes LTNP (NP1, NP14, NP21, NP29 y NP35) y un progresor (C11), aunque no siempre las mismas.

Por otro lado, se observó que las secuencias de nucleótidos de ambos grupos no se distribuyeron en clusters diferentes y separados (Figura 1.1b). Tampoco se vio una evolución positiva de las secuencias ya que no hay un mayor número de cambios no sinónimos que sinónimos en ninguno de los dos grupos. Además se observó que no hay una hipermutación significativa producida por APOBEC3G de ninguna de las secuencias, ni en LTNP ni en progresores (Anexo I).

1.3.2.2. Vpr

Se analizaron secuencias Vpr de 14 LTNP y 12 de progresores. Tras el alineamiento de aminoácidos no se vieron grandes defectos en ninguna de las secuencias. Posteriormente se examinaron las zonas reportadas con influencia en la funcionalidad de la proteína. Los principales dominios están representados en la Figura 1.2b.

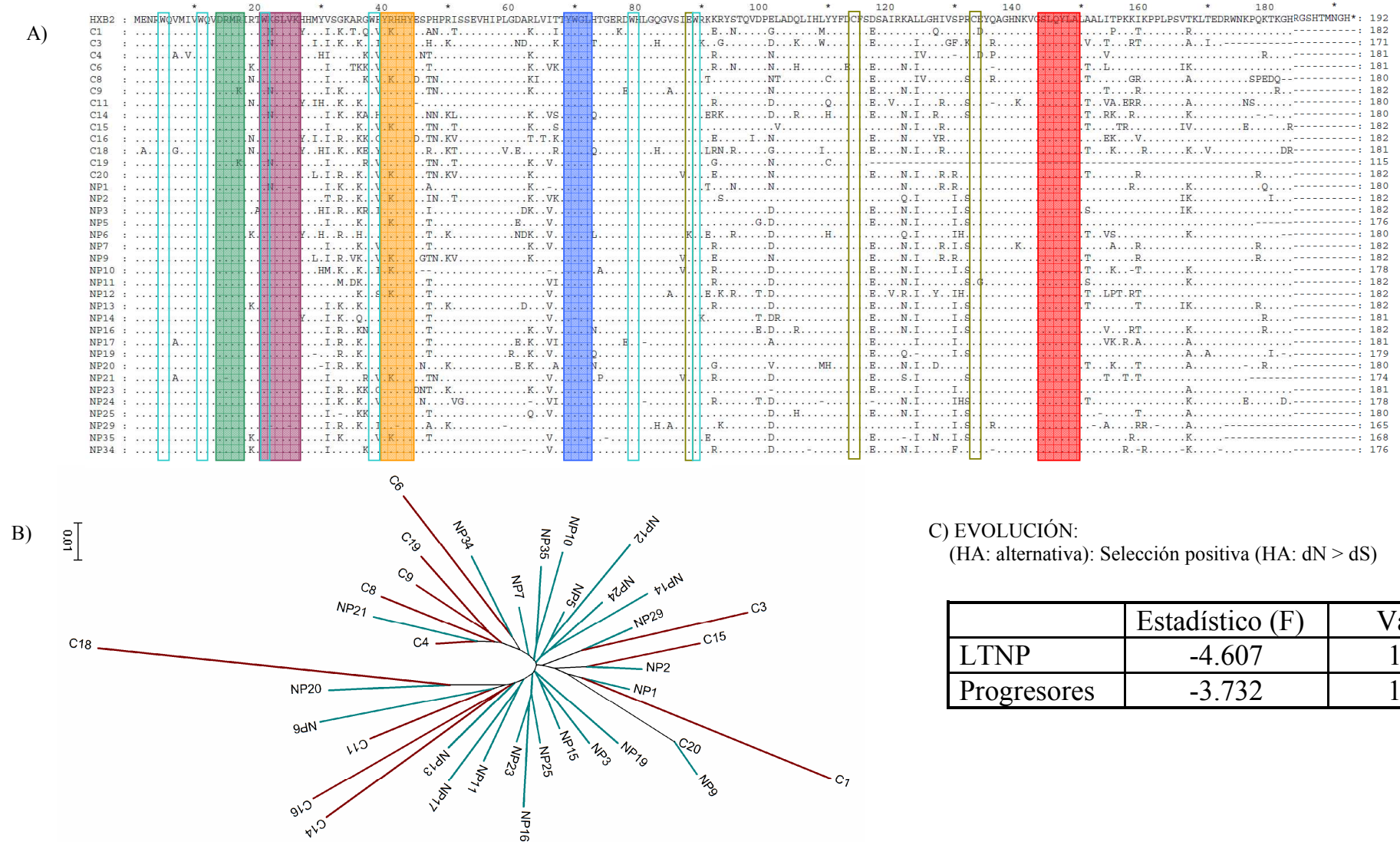


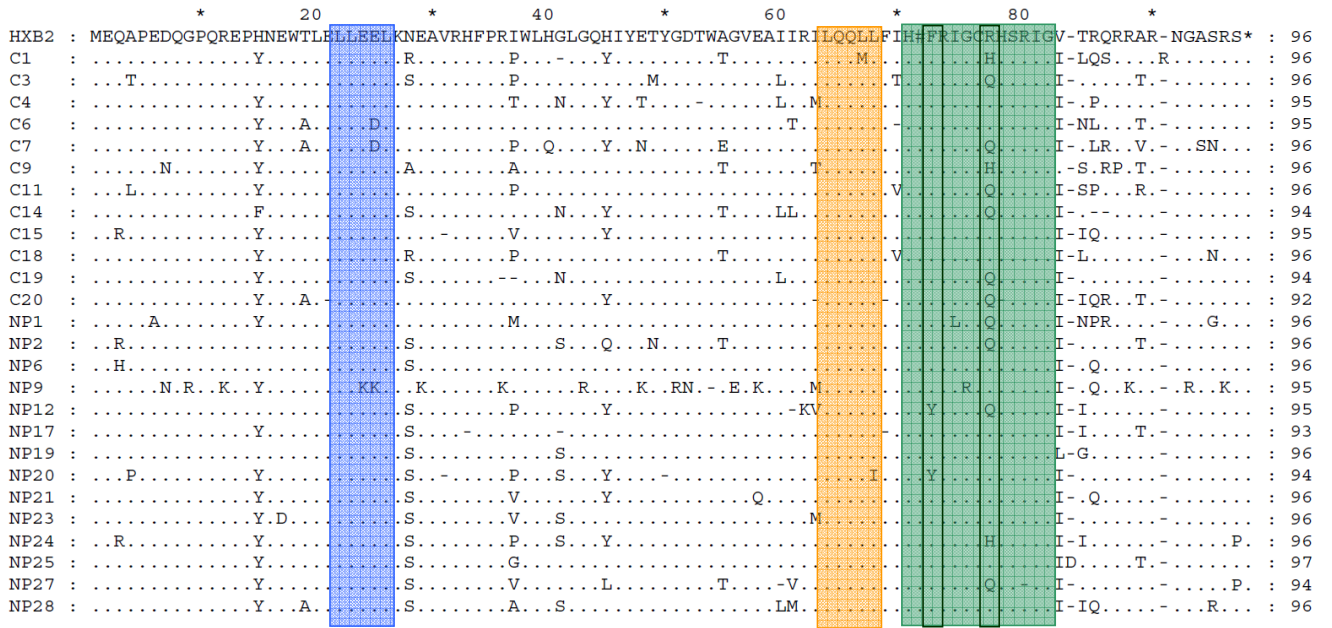
Figura 1.1. Análisis del gen *vif*. A) Alineamiento de las secuencias aminoacídicas con los motivos importantes descritos en el texto. B) Árbol filogenético de las secuencias, indicando en rojo las secuencias de progresores y en verde las de LTNP. C) Datos de evolución.

El primer dominio LLEEL₂₆ (en azul), está en la zona de α -hélice y es importante para la incorporación de Vpr a las nuevas partículas virales. Por otro lado la localización nuclear de Vpr esta controlada por el dominio LQQLL₆₈ (en naranja), mientras que la parada del ciclo celular es controlado por el dominio C-terminal (HFRIGCRHSRIG₈₂) (en verde) (Macreadie et al., 1995; Mahalingam et al., 1995; Mahalingam et al., 1997). Dentro de este último dominio se encuentran tanto la mutación puntual F72L, que en LTNP se ha identificado como responsable de un menor transporte nuclear de Vpr (Caly et al., 2008), como la mutación R77Q descrita en mayor proporción en pacientes LTNP en comparación con progresores en varios estudios (Lum et al., 2003; Mologni et al., 2006). Parece que esta mutación genera que la proteína Vpr induzca un menor nivel de apoptosis.

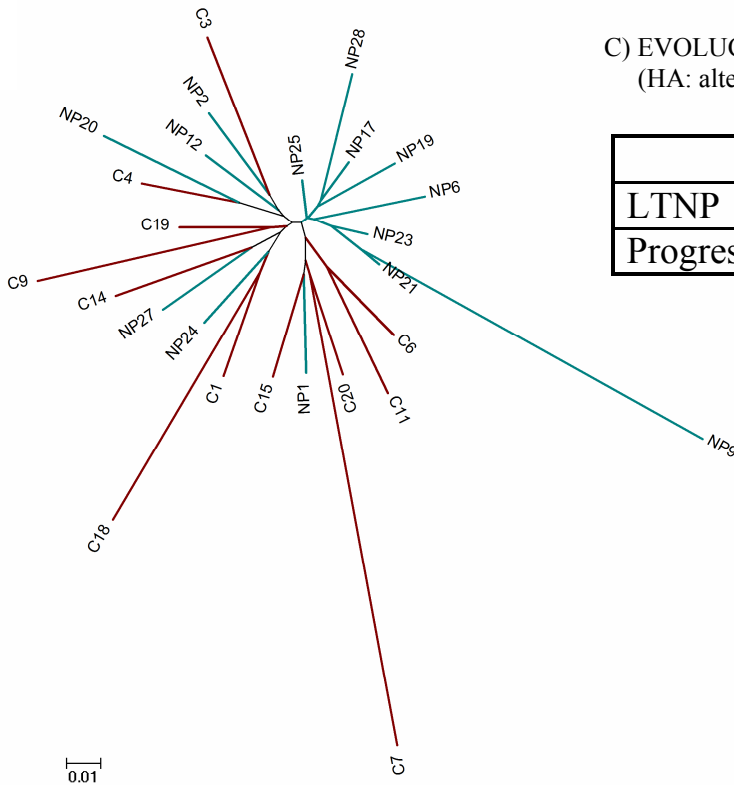
Sólo el paciente NP9 presenta cambios puntuales en el dominio LLEEL₂₆ y HFRIGCRHSRIG₈₂ que suponen una variación en la carga química. Por otra parte los pacientes C20 y NP27 poseen deleciones puntuales de un solo aminoácido en alguna de las regiones importantes. En la zona variable que se corresponde con el nucleótido 77 no se observan diferencias en las frecuencias de glutamina entre LTNP y progresores, incluso hay mayor proporción en progresores (LTNP 4/14, 29% vs progresores 6/12, 50%, p=0.26).

De la misma manera, se analizó la filogenia de las secuencias de nucleótidos de ambos grupos no encontrándose una distribución diferenciada en clusters (Figura 1.2b). Tampoco se vio una evolución positiva de las secuencias ya que no hay un mayor número de cambios no sinónimos frente a sinónimos en ninguno de los dos grupos. Complementariamente se determinó el nivel de hipermutación de las secuencias producida por APOBEC3G y no se observó ninguna diferencia significativa en las distintas secuencias, ni tampoco entre LTNP ni progresores (Anexo I).

A)



B)



C) EVOLUCIÓN:

(HA: alternativa): Selección positiva (HA: dN > dS)

	Estadístico (F)	Valor p
LTNP	-6.363	1.000
Progresores	-4.594	1.000

Figura 1.2. Análisis del gen *vpr*. A) Alineamiento de las secuencias aminoacídicas con los motivos importantes descritos en el texto. B) Árbol filogenético de las secuencias, indicando en rojo las secuencias de progresores y en verde las de LTNP. C) Datos de evolución.

1.3.2.3. Vpu

Para la proteína Vpu se consiguieron amplificar un total de 26 secuencias, 15 de LTNP y 11 de progresores. Tal y como se ha explicado anteriormente, se alinearon tras la traducción a aminoácidos, observándose que los pacientes progresores C13 y C15 presentaban una inserción de 8 y 3 aminoácidos respectivamente (Figura 1.3a)

Por otro lado se analizaron las zonas reportadas como importantes para la funcionalidad de la proteína que en este caso sólo ha sido una, el dominio DSGxxS₅₇ de Vpu (en verde). La eliminación óptima de la proteína BST-2 o Teterina por parte de Vpu requiere la proteína celular b-TrCP (del inglés *beta-transducin repeat containing*), un adaptador de sustrato para un complejo ligasa-ubiquitina con distintas subunidades con el que interacciona Vpu. Mutaciones en este dominio de unión con la proteína celular hacen que empeore tanto la regulación a la baja de BST-2 como la liberación de los viriones (Evrard-Todeschi et al., 2006; Mitchell et al., 2009). En los pacientes estudiados no se encontró ninguna variación en el dominio que supusiera un cambio en la carga química y que pudiese afectar a la unión.

Adicionalmente, se analizó la filogenia de las secuencias de nucleótidos de ambos grupos. En el árbol se puede apreciar un cluster formado por un grupo de 9 LTNP, los cuales presentan mayor variabilidad en la región N-terminal de la proteína aunque no existe un patrón común claro. El resto de secuencias de LTNP se mezclan con los progresores (Figura 1.2b). Tampoco se vio una evolución positiva de las secuencias ya que no hay un mayor número de cambios no sinónimos frente a sinónimos en ninguno de los dos grupos. Por último, se estimó el nivel de hipermutación sin encontrar un cambio significativo producido por APOBEC3G en ninguna de las secuencias (Anexo I).

1.3.2.4. Nef

En cuanto a la proteína Nef solamente se consiguieron amplificadas de pacientes LTNP con lo que no se pudo comparar las secuencias con el grupo de progresores para estudiar si existen diferentes clusters en el análisis filogenético. Se analizó el alineamiento de aminoácidos de los 29 amplificadas obtenidos de pacientes LTNP, observando que el paciente NP3 presentaba varias regiones delecionadas en esta proteína, en total 129 nucleótidos menos (Figura 1.4a). Además, el paciente NP24 presentó una inserción de 10 aminoácidos en su secuencia, de la misma manera que los pacientes NP13, NP16, NP22, NP23 y NP25, que tuvieron todas pequeñas inserciones en la misma zona correspondiente al dominio de la α -hélice N-terminal. No se conoce la importancia de este dominio para el correcto funcionamiento de Nef.

Además se estudiaron las zonas importantes para la funcionalidad de la proteína (Figura 1.4^a). Al inicio de la proteína se encuentra el dominio conocido como sitio de miristoilación (MGGKWSK₇, en granate), que es la zona de unión de Nef a la membrana para llevar a cabo su papel en el ciclo celular (Harris, 1995). A continuación se encuentra el motivo WL₅₈ (rojo) que es un punto de corte específico de la proteasa viral que determina la organización modular de Nef, separando diferentes dominios (Freund et al., 1994). Seguidamente aparece el motivo EEEE₆₅ (en amarillo) que se relaciona con la regulación a la baja de las moléculas MHC I al ser retenidas por Nef en el aparato de Golgi (Piguet et al., 2000). Próximo a este dominio se halla el motivo (4PxxP)₇₈ (en verde claro) que a través de la interacción con diversas moléculas celulares está implicado en la activación celular requerida por el virus para llevar a cabo la replicación (Saksela et al., 1995). El motivo RR₁₀₆ (en naranja) está relacionado con el aumento de la activación celular a partir de quinasas activadas para llevar a cabo una mejor infectividad viral.

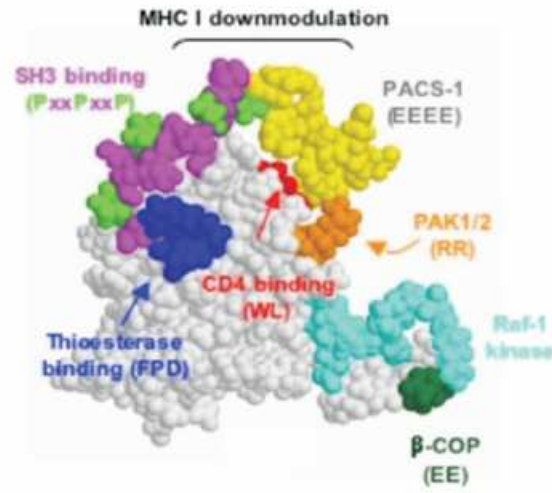
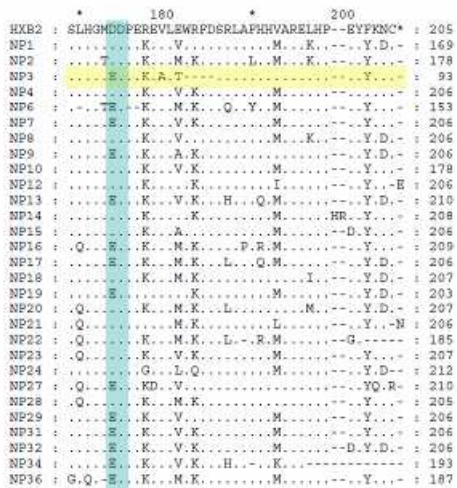
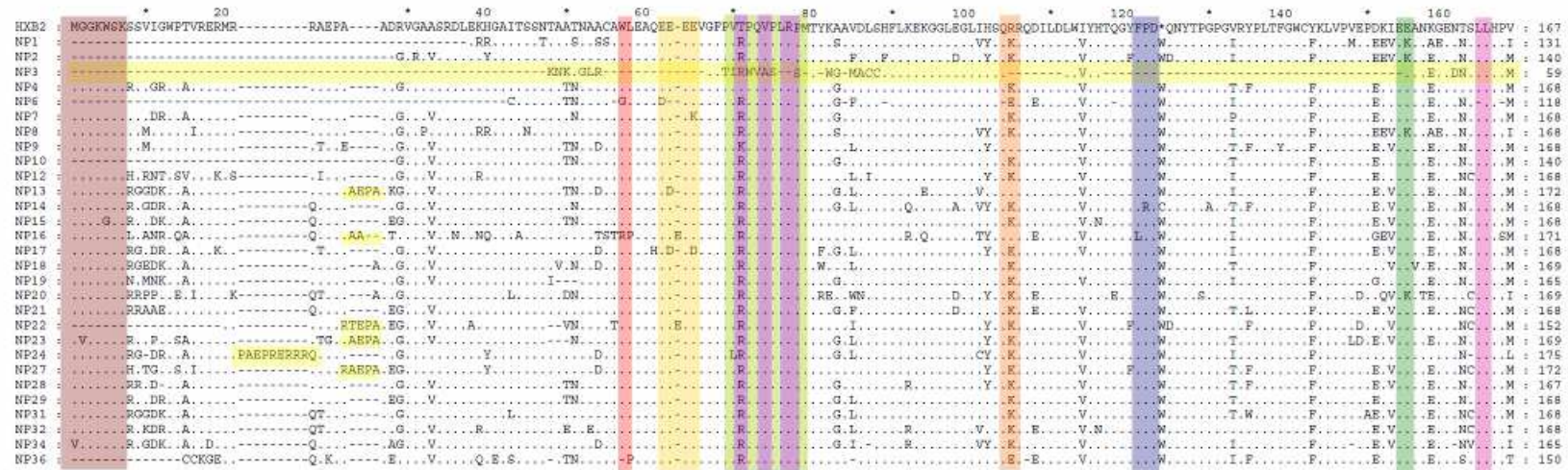


Figura 1.4. Análisis del gen *nef* A) Alineamiento de las secuencias aminoacídicas con los motivos importantes. B) Modelo tridimensional de la región central de Nef donde se muestran los distintos dominios funcionales en distintos colores (Adaptado de Das et al., 2005).

FPD₁₂₃ (en azul) interacciona con tioesterasas humanas participando en la regulación a la baja de la molécula CD4 (Sawai et al., 1995). Mutaciones en este dominio, específicamente el cambio P122R disminuye la eficiencia de este proceso (Cohen et al 2000), así como cambios en D₁₂₃, afectan también a otras funciones de Nef como son la regulación a la baja del complejo MHC I (Cohen et al., 2000; Liu et al., 2000). Por último, los motivos EE₁₅₅, LL₁₆₅ y DD₁₇₅ (verde, rosa y celeste, respectivamente) activan la ruta de las quinasas para la activación celular, además de regular a la baja la molécula CD4 (Aiken et al., 1996; Bentham et al., 2003; Na et al., 2004).

En este estudio se han evaluado los cambios aminoacídicos que suponen variaciones en la carga química en los diferentes motivos previamente reportados. 10 de los 29 pacientes (NP1, NP2, NP6, NP7, NP8, NP14, NP16, NP20, NP22 y NP36) presentaron algún cambio de carga en las zonas importantes, pero tan sólo 3 de ellos (NP16, NP22, NP36) presentaron más de un motivo mutado o alguna inserción o deleción además del cambio de carga observado. Por otro lado, se midió la posible evolución de las secuencias (dNS>dS) siendo no significativa (Estadístico (F): -2.426, valor p: 1.000). Adicionalmente se observó que no hay una hipermutación significativa de ninguna de las secuencias producida por APOBEC3G (Anexo I).

1.4. DISCUSIÓN

Mientras que la infección por VIH es relativamente nueva en humanos, han existido infecciones por retrovirus en nuestra especie durante millones de años (Bannert et al., 2004). Por ello, aunque no especializadas para el VIH, el ser humano posee defensas que son operativas frente a este virus y los retrovirus han tenido que evolucionar creando proteínas accesorias que le permiten replicar en el contexto de mecanismos ancestrales de

defensa del hospedador (revisado en [Malim et al., 2008](#)). En consecuencia, aunque estas proteínas del VIH no parecen tener un papel directo en el ciclo replicativo viral, sus diferentes funciones en los procesos de replicación y patogénesis *in vivo* hacen que sean imprescindibles para llevar a cabo una infección progresiva. Defectos en estas proteínas pueden cambiar significativamente el curso y severidad de la infección viral ([Bour et al., 2000](#)).

En los primeros estudios de análisis de secuencias de VIH se hallaron defectos genéticos que aparecían con una mayor frecuencia en el grupo de pacientes con progresión lenta de la enfermedad ([Schwartz et al., 1996](#); [Alexander et al., 2000](#); [Wang et al., 2003](#)). Estos trabajos llevaron a pensar que la presencia de virus defectivos podía ser la causa de la no progresión en LTNP aunque simultáneamente también hubo estudios que no encontraban diferencias en ninguna de las proteínas accesorias analizadas en estos grupos ([Zhang et al., 1997](#)).

Más recientemente, un trabajo ha examinado el genoma viral de un grupo de pacientes controladores de élite en comparación con progresores típicos ([Miura et al., 2008a](#)). Evalúan tanto grandes defectos genéticos como mutaciones puntuales, no encontrando diferencias entre los dos grupos que expliquen la menor replicación viral en LTNP. Otro estudio analiza igualmente secuencias de *vif* en una cohorte de progresores lentos no hallando diferencias entre distintos fenotipos ([Rangel et al., 2009](#)).

La principal diferencia entre unos estudios y otros radica en el número de pacientes incluidos en el análisis. Así, los primeros, realizados con pocas secuencias, hallaban defectos que posteriormente se ha visto que no son representativos de la población general.

En el presente trabajo se han analizado las secuencias de las proteínas Vif, Vpu, Vpr y Nef en un grupo de LTNP con el fin de analizar si la presencia de virus defectivos se asocia con la progresión lenta, comparándolos además con secuencias de un grupo de

pacientes VIH+ progresores típicos. De esta manera, se ha observado que tan sólo un paciente LTNP lleva una gran delección, específicamente en el gen *nef*. A pesar de no tener datos a nivel de expresión de proteína, lo más probable es que la funcionalidad de Nef se vea afectada y tenga un cierto grado de influencia en la no progresión de este paciente. La presencia de la proteína Nef defectiva (con múltiples delecciones) es uno de los factores con gran representación en una gran cohorte australiana de LTNP infectados a partir de la misma donación de sangre ([Learmont et al., 1992](#)). Precisamente en la proteína Nef es en la que se han observado un mayor número de defectos en los pacientes del estudio, viéndose en varios individuos cambios que se relacionan con una menor regulación a la baja de la molécula de CD4 y el complejo MHC I, que podría afectar también al grado de progresión. En estos casos, los cambios son puntuales y serían necesarios estudios funcionales de la proteína para precisar hasta que punto esto podría relacionarse con el fenotipo observado en los pacientes.

En el resto de genes analizados no se han visto grandes defectos genéticos. Sin embargo, si existen pequeñas delecciones, inserciones o cambios de aminoácidos de diferente carga química en algunas regiones importantes para la funcionalidad de estos genes. Estos defectos observados no predominan en ninguno de los fenotipos estudiados ya que aparecen tanto en las secuencias de LTNP como de progresores en una proporción similar. Por tanto, a pesar de que estas alteraciones puedan afectar individualmente a la funcionalidad de cada proteína, no parecen estar asociados a la no progresión en el grupo de pacientes estudiado.

Los resultados presentados concuerdan con los estudios más recientes ya que no aparecen grandes defectos en las secuencias virales que expliquen la no progresión de una manera determinante en el grupo de pacientes estudiados.

Complementariamente, se analizó si las secuencias de cada fenotipo se agrupaban en clusters diferentes, lo que no se demostró en ninguno de los tres genes analizados (*vif*, *vpr* y *vpu*). Esto indica que la divergencia de las secuencias no es más alta en ninguno de los dos grupos y además los virus de los pacientes LTNP no parecen tener un ancestro común. Esto está apoyado por la ausencia de evolución positiva de las secuencias en cualquiera de los genes estudiados en cada grupo de pacientes. De la misma manera que ocurre con los defectos genéticos, algunos artículos que evalúan un número pequeño de pacientes, han observado una pérdida de evolución de las secuencias en LTNP (Wang et al., 2003). Por el contrario, trabajos realizados en pacientes progresores perciben la existencia de una evolución de las secuencias que se asocia a una pérdida de control inmune celular (Kemal et al., 2008). En el presente estudio, no aparece una asociación significativa entre el grado de diversidad genética y el estadio de progresión, al igual que se ha observado previamente en otros trabajos con un número de pacientes similar (Zhang et al., 1997).

Por último se analizó el nivel de hipermutación producido por las proteínas APOBEC3G en todas las secuencias estudiadas, no observando cambios significativos en ninguno de los pacientes para ninguna de las proteínas, ni siquiera en los que presentaban algún cambio en la secuencia de aminoácidos de Vif, lo que indica que la proteína es funcional en todos los casos. Resultados similares se han visto previamente (Ulenga et al., 2008; Piantadosi et al., 2009), no asociando el nivel de hipermutación con mayor progresión, aunque existen otros estudios que sí relacionan un mayor nivel de hipermutación con valores más altos de CD4 (Land et al., 2008) o menores de carga viral (Pace et al., 2006). Aún así, estos estudios no analizan cohortes específicas de pacientes con progresión lenta. El único estudio que lo hace tampoco muestra diferencias en los

niveles de hipermutación entre pacientes controladores de élite y pacientes en tratamiento (Gandhi et al., 2008).

En conclusión, los resultados presentados en este estudio inclinan la balanza hacia los factores del huésped como la posible causa de la no progresión en los pacientes de la cohorte analizada. A la vista del análisis de las secuencias virales, no existen grandes defectos en las proteínas accesorias de los virus obtenidos de pacientes LTNP (excepto sólo en uno de ellos). Además no se observan diferencias en la evolución de las secuencias respecto a los pacientes con progresión típica. Otros factores relacionados con la defensa del huésped podrían estar jugando un papel más importante en el retraso de los síntomas asociados a sida en la cohorte de pacientes estudiada, aunque no se descarta que los pequeños defectos encontrados en algunas de las secuencias puedan contribuir parcialmente al retraso de la enfermedad.

Capítulo 2

**Características genotípicas del hospedador
relacionadas con la progresión**

2.1. INTRODUCCIÓN

Diversos estudios han descrito variaciones alélicas en genes que codifican para receptores de citoquinas y sus ligandos, HLA y proteínas que intervienen en la inmunidad celular en relación con el progreso de la infección por VIH. Recientemente, a partir de la cohorte de pacientes VIH+ euroCHAVI (centro de investigación de vacunas e inmunología de VIH/sida), se ha realizado un estudio de variabilidad genética a lo largo del genoma en asociación con la infección por VIH. En él se identificaron variantes alélicas de los genes ZNRD1, HCP5 y HLA-C que explican el 15% de la variabilidad observada entre pacientes en el nivel de viremia tras la primoinfección (Fellay et al., 2007). Posteriormente se han publicado otros estudios similares realizados en cohortes de pacientes no progresores confirmando la relación del polimorfismo en el gen HCP5 (*rs2395029*) o HLA C (*rs9264942*) con la no progresión e identificando nuevas asociaciones, todas ellas cerca de la región del HLA (Limou et al., 2009, van Manen et al., 2009). Esta región es la más polimórfica de todo el genoma humano (Marsh et al., 2000), por lo que, además de las variaciones de un solo nucleótido, la dotación alélica del HLA se considera un potente predictor de progresión a través de su influencia en la inmunidad celular (Kaslow et al., 1996). Así, tanto HLA B*5701 como B*2705 se han visto en alta representación en pacientes con progresión lenta a sida (Kaslow et al., 1996; Hendel et al., 1999; Migueles et al., 2000; Flores-Villanueva et al., 2003; Trachtenberg et al., 2003; Catano et al., 2008).

Por otro lado, el gen CCR5, correceptor mayoritario de la entrada del VIH, así como el gen CCL3L1 que codifica para la proteína MIP1 α , principal y más potente ligando de este correceptor (Irving et al., 1990), son fundamentales para la patogénesis viral. Mutaciones en el gen CCR5 se han relacionado con la no progresión en LTNP (Huang et al., 1996). Además, el mayor número de copias en el genoma del gen CCL3L1 se traduce

en mayores niveles de la proteína que codifica, la citoquina MIP1 α , lo que disminuye el riesgo de infección por VIH ([González et al., 2005](#)). El eje CCL3L1-CCR5 que determina grupos de riesgo genético (GRGs) influye en la patogenia del VIH principalmente por su efecto sobre parámetros dependientes de la entrada viral. Además, algunos estudios indican una influencia de CCL3L1-CCR5 sobre distintos aspectos de la respuesta inmune, como la inmunidad celular, la regeneración de células T o la sinapsis inmunológica que modificarían el curso clínico de la infección por VIH independientemente de su efecto sobre los mecanismos de entrada ([Dolan et al., 2007](#); [Kulkarni et al., 2008](#)).

En este estudio se ha analizado la asociación de estos parámetros genéticos del hospedador con la progresión de la enfermedad, para lo cual se ha comprobado la prevalencia de estos factores en la cohorte de LTNPs así como en el grupo de progresores típicos.

2.2. PACIENTES Y MÉTODOS

2.2.1. Pacientes

Se utilizaron para el estudio 30 LTNP de la cohorte del Hospital Carlos III y 30 pacientes VIH+ con progresión típica de la enfermedad. 13 LTNP se consideraron controladores de élite (carga viral menos de 50 copias/ml de forma persistente). Los progresores se eligieron a partir de pacientes con una progresión típica reportada en la historia clínica, estando un 87% de ellos ya en tratamiento en el momento de inclusión en el estudio. En aquellos pacientes que no estaban en tratamiento se consideró como criterio de progresión un descenso significativo de células T CD4+ mayor de 100 células/ μ l/año dentro de los 5 primeros años de seroconversión. Todos los pacientes estaban infectados por cepas virales clasificadas dentro del subtipo B del VIH.

Tanto la determinación de parámetros clínicos como el aislamiento de CMSP y extracción de ácidos nucleicos se hizo tal y como se describe en el capítulo 1.

2.2.2. Genotipado de CCR5 y determinación del número de copias del gen CCL3L1

La presencia del alelo CCR5-Δ32 fue determinada por PCR específica a partir del DNA genómico extraído de CMSP. Para llevar a cabo la PCR se utilizaron los cebadores: CCR5-U: 5'-CCT GGC TGT CGT CCA TGC T-3' y CCR5-D: 5'-CCA GCA GCG GCA GGA CCA GC-3'. Las condiciones del ensayo fueron: 94°C/5min, 35 ciclos de 94°C/30 sg, 62°C/30 sg, y 72°C/1 min, con una extensión final a 72°C durante 7 minutos ([descrito previamente en Samson et al., 1996](#)).

El número de copias del gen CCL3L1 fue estimado según el método de Townson y González ([Townson et al., 2002](#); [González et al., 2005](#)) con algunas modificaciones. Brevemente, se realizó una PCR a tiempo real (con sondas Taqman®) usando las condiciones universales en un sistema *Applied Biosystems 7300 real-time PCR* con el fin de detectar la fluorescencia de FAM para la sonda en CCL3L1 y VIC para la sonda en el gen β-globina (HBB) durante la amplificación. La secuencia de los cebadores para CCL3L1 fue: CCL3Fw: 5'-TCT CCA CAG CTT CCT AAC CAA GA-3', y CCL3Rv: 5'-CTG GAC CCA CTC CTC ACT GG-3' y la secuencia de la sonda: 5'-FAM-AGG CCG GCA GGT CTG TGC TGA-TAMRA-3'. La secuencia de los cebadores de β-globina fue: HBBFw: 5'-GGC AAC CCT AAG GTG AAG GC-3' y HBBRv: 5' GGT GAG CCA GGC CAT CAC TA-3', y la secuencia de la sonda: 5'-VIC-CAT GGC AAG AAA GTG CTC GGT GCC T-TAMRA-3'. Previamente al ensayo, el gen CCL3L1 fue clonado usando el kit TOPO® TA Cloning (Invitrogen, Gran Bretaña) partiendo de un amplicón obtenido por PCR con los cebadores: pcrCCL3Fw 5'- CAG CCT TCA GGA GCC TAT CG 3' y pcrCCL3Rv 5'- TCA GGC ACT CAG CTC CAG GTC -3'. Se comprobó que el clon

elegido tuviera una sola copia por plásmido a través de secuenciación con los mismos cebadores. Con este plásmido se comprobó que el DNA comercial usado para la cuantificación de β -globina (Roche Applied Science, Alemania) (gen utilizado como constitutivo y del que se conoce que posee dos copias de HHB por genoma diploide) llevaba igualmente dos copias de CCL3L1 por genoma diploide.

Así, se determinó el Ct o ciclo en el cual empieza la fase exponencial de la reacción de amplificación y que es proporcional a la cantidad de secuencia diana inicial. Se usaron cuatro diluciones seriadas con el fin de generar curvas patrón donde se enfrentan valores Ct contra el logaritmo de la concentración de DNA para los genes HHB y CCL3L1 (Figura 2.1). Cada determinación se hizo a partir de 2-10ng de DNA de cada muestra y en duplicado para ambos genes, convirtiendo el Ct obtenido en cantidad de secuencia inicial a través de curvas patrón. El número de copias se obtuvo calculando la ratio entre la cantidad de CCL3L1 y β -globina y multiplicando por dos.

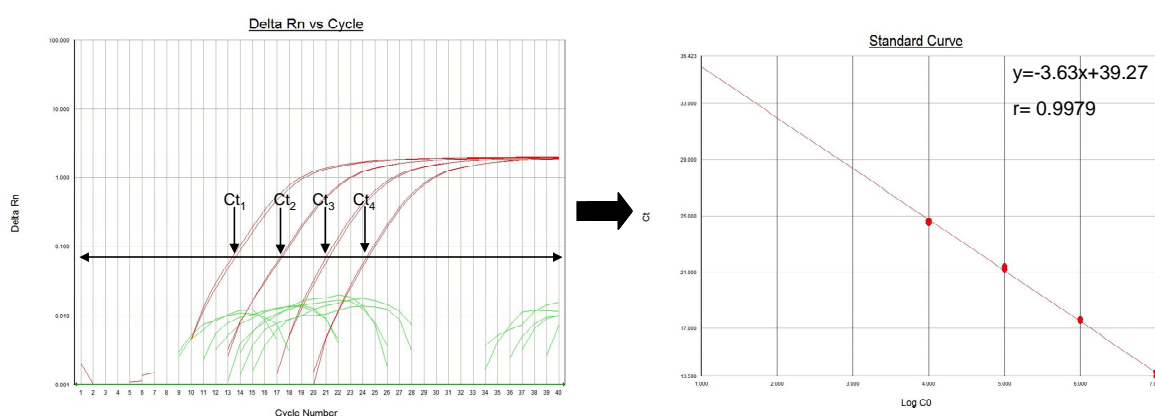


Figura 2.1. Ejemplo de la imagen obtenida tras la amplificación del gen CCL3L1 mediante PCR a tiempo real partiendo de diferentes concentraciones de DNA. Con los valores Ct obtenidos se construye la curva patrón.

2.2.3. Tipaje de HLA

El HLA de los pacientes fue analizado en el centro de transfusiones de la Comunidad de Madrid. El tipaje fue realizado por PCR-SSO (secuencia específica de oligonucleótido) con la tecnología Luminex (Gen-Probe, San Diego, USA) para los locus de clase I A, B y C, determinando específicamente el haplotipo de HLA a nivel de alelo.

El criterio entre HLA protector o no protector fue definido usando la bibliografía revisada previamente para población caucásica (Stephens, 2005; Sidney et al., 2008). En general se estableció como alelos protectores aquellos dentro de los supertipos B27 y B58, además de otros alelos específicos descritos individualmente. Se definieron como no protectores los alelos clasificados dentro del supertipo B7, además de otros alelos específicos (Descrito en detalle en la Tabla I.3).

Para estudiar las asociaciones entre los diferentes alelos HLA predominantes dentro de cada fenotipo se usó la herramienta de desequilibrio de ligamiento de la base de datos de inmunología de los Álamos (<http://www.hiv.lanl.gov/content/immunology>) (Korber et al., 2007).

2.2.4. Genotipado de SNP

Se genotiparon dos polimorfismos de un solo nucleótido, uno en la región codificante del gen HCP5 (rs2395029 => TGG ACA CAT ACT GTC CAA TTC CCC TG [T>G] GGC AGC TGT AAT GTG TAG TTC AAT G) y el otro situado a 35 kb en la región anterior al gen HLA-C (rs9264942 => GTC CCA CAA GAG ACA GAC CCA CTT CC [T>C] AGG CAC TGT GGG ACT TTC TGA GCC C). Para ello se utilizó el sistema de *Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR* según las instrucciones del fabricante. Los cebadores y sondas fueron obtenidos a partir de Custom TaqMan® SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems, USA).

2.2.5. Análisis estadístico

Se realizó un análisis chi-cuadrado para evaluar las diferencias en la prevalencia de los diversos factores estudiados en los dos grupos de pacientes (LTNP y progresores) y la prueba no paramétrica de Mann-Whitney para comparar las medianas de variables cuantitativas. Además se utilizó regresión logística multivariante para discriminar que factores estaban asociados a la no progresión. Todos los análisis se hicieron con el programa estadístico SPSS v15.

2.3. RESULTADOS

2.3.1. Características de la población estudiada

En la Tabla 2.1 se resumen las características de los pacientes del estudio, en la que se observa cómo las poblaciones estudiadas son claramente diferentes, principalmente en las vías de transmisión y en los parámetros clínicos, ya que el grupo de LTNP posee niveles más conservados de células T CD4⁺ y menores de carga viral. En el caso de los pacientes bajo tratamiento, los parámetros clínicos mostrados se corresponden con la última medición tomada antes del inicio de tratamiento.

Tabla 2.1 Características de la población estudiada

Características	Pacientes (n=60)		Valor p
	LTNP (n=30)	Progresores (n=30)	
Sexo (nºhombres)	25 (83,3%)	21 (70%)	0,220
Edad (años)	44 [39-46]	39 [32-47]	0,314
Tiempo seguimiento (años)	19 [14-21]	3 [2-17]	<0,001
Grupo de riesgo			0,013
ADPV	25 (83,3%)	15 (50%)	
HMSX	3 (10%)	13 (43,3%)	
HTSX	2 (6,7%)	2 (6,7%)	
CD4abs (cels/ul)	619 [461-803]	336 [180-441]	<0,001
CD4%	32 [26-39]	21 [13-27]	<0,001
LogCV (log copias/ml)	2,52 [1,70-3,42]	4,66 [4,15-5,00]	<0,001

NOTA. Los datos se presentan como mediana [rango intercuartílico]

2.3.2. Caracterización de genes relacionados con la entrada viral: CCR5 y CCL3L1

En el estudio del gen CCR5 se observó una mayor frecuencia de la delección de 32 pares de bases (siempre en heterocigosis) en LTNP, aunque las diferencias no llegan a ser significativas. Mientras que el grupo de LTNP presentó la delección en un 17% de los casos, en el grupo de progresores estaba presente sólo en un 7% (Tabla 2.1).

Por otro lado, el número de copias del gen CCL3L1 medido en la población de este estudio tenía una distribución similar a la población europea descrita en González et al., (2005), con una media de 2 copias por genoma diploide. Cuando se comparó el número de copias entre los dos fenotipos estudiados, los LTNP tuvieron una mediana similar que los progresores (Tabla 2.2). Aún así se observó una tendencia cuando se representa la distribución del número de copias en las dos poblaciones (Figura 2.2), viéndose un ligero desplazamiento hacia mayor número de copias en LTNP.

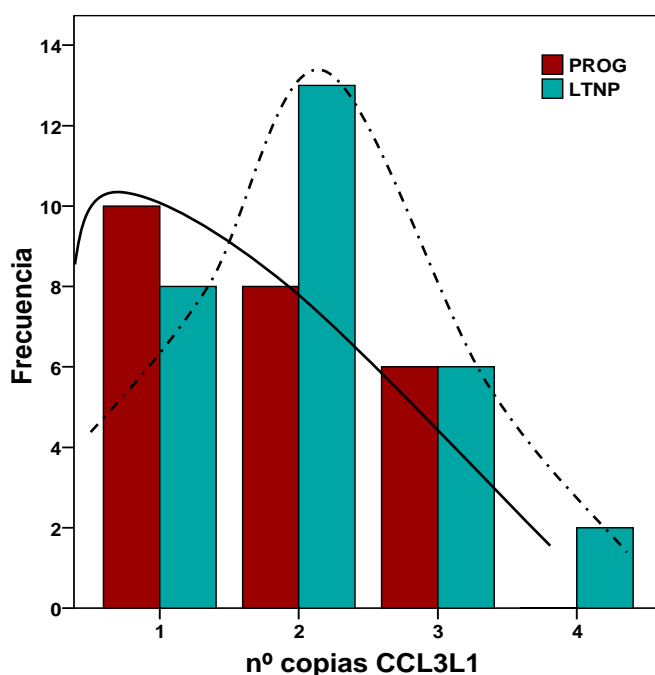


Figura 2.2. Distribución de frecuencias del número de copias de gen CCL3L1.

Tabla 2.2. Frecuencia de los factores genéticos relacionados con la entrada viral con influencia en la progresión de la enfermedad: proporción de la delección en CCR5 y grupos de riesgo genético (GRG) en LTNP y progresores; nº copias del gen CCL3L1 (mediana [rango intercuatílico]) en ambos grupos.

Factor Genético	Progresores	LTNP	Valor p
CCR5			0.246
wt	26/28 (93%)	24/29 (83%)	
$\Delta 32$ /wt	2/28 (7%)	5/29 (17%)	
$\Delta 32/\Delta 32$	0	0	
Nº copias CCL3L1	2 [1-2.75]	2 [1-3]	0.363
GRG			
CCL3L1 ^{alto} -CCR5 ^{del} (bajo)	1/29 (3.4%)	4/29 (13.8%)	0.160
CCL3L1 ^{bajo} -CCR5 ^{del} (moderado)	1/28 (3.6%)	1/30 (3.4%)	0.960
CCL3L1 ^{alto} -CCR5 ^{no-del} (moderado)	5/24 (20.8%)	6/28 (21.4%)	0.958
CCL3L1 ^{bajo} -CCR5 ^{no-del} (alto)	16/26 (69.6%)	17/29 (55.8%)	0.416

La contribución del genotipo combinado CCL3L1-CCR5 a la progresión de la enfermedad fue medido por la presencia de genotipos de bajo riesgo (CCL3L1^{alto}CCR5^{del}), riesgo moderado (CCL3L1^{bajo}CCR5^{del} y CCL3L1^{alto}CCR5^{no-del}) o alto (CCL3L1^{bajo}CCR5^{no-del}). Según esta clasificación, se observó una mayor prevalencia de GRG bajo en pacientes LTNP (LTNP: 13.8% vs Progresores: 3.4% p= 0.16) (Tabla 2.1), no observándose diferencias en el resto de GRG (moderado y alto).

2.3.3. Diferencias en frecuencias alélicas de HLA entre pacientes LTNP y progresores.

Para cada paciente se obtuvieron los genotipos de HLA clase I A, B y C a nivel de alelo. En primer lugar se midió la frecuencia de alelos previamente descritos como protectores o no protectores en cada grupo de pacientes para determinar la posible asociación de estos con cada fenotipo. Se observó una mayor proporción de pacientes

LTNP con alelos clasificados como protectores (LTNP: 90% vs progresores: 63%; $p=0.015$), aunque en el grupo de progresores no existía una representación significativamente mayor de los alelos no protectores (LTNP: 70% vs progresores: 83%; $p=0.222$)

Conjuntamente, se analizó la frecuencia de alelos específicos en cada grupo de pacientes. Se encontró asociación de los fenotipos estudiados con determinados alelos de HLA B y C, pero no con A. Se observó que en el grupo de LTNP estaban representados en mayor proporción, además de HLA B*5701 y B*2705, que ya se conoce su relación con la no progresión, tres nuevos alelos no asociados previamente con no progresión HLA C, Cw0102, Cw0602 y Cw1203 (Figura 2.3).

Además, el HLA B*35 (de B*3501 a B*3508), descrito previamente en relación con la progresión rápida, no se observó con una frecuencia significativamente mayor en progresores. En el grupo de pacientes progresores se encontró una mayor proporción de alelos Cw0501 y Cw0701, aunque las diferencias no fueron significativas (Figura 2.3).

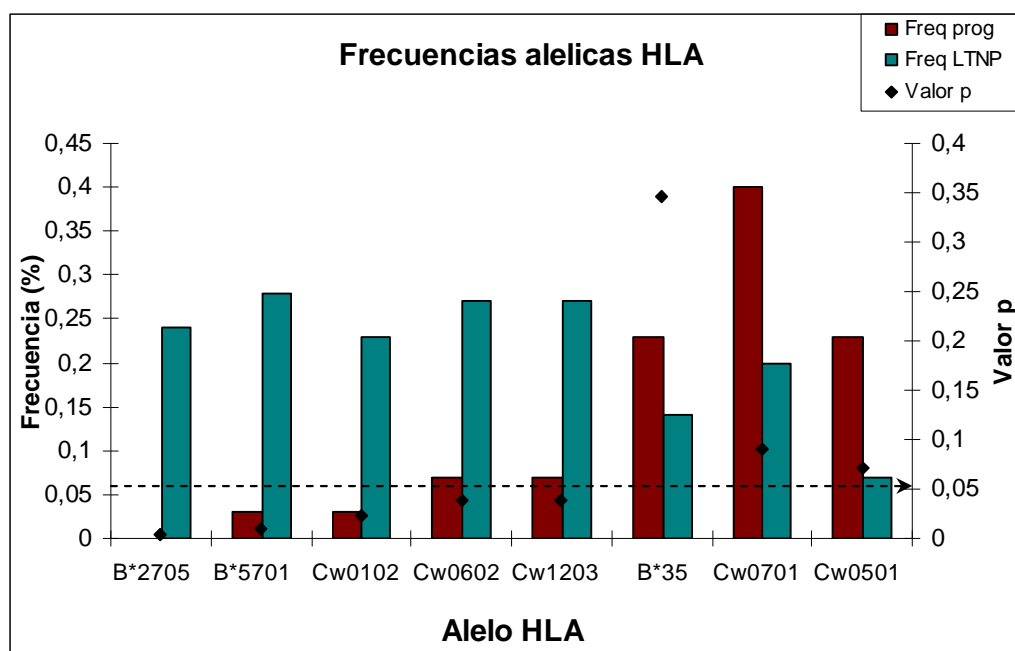


Figura 2.3. Frecuencias alélicas de HLA obtenidas del análisis. En rombos se representan los valores p. La línea de puntos marca el punto de corte de significación.

2.3.4. Asociación de haplotipos HLA con progresión de la enfermedad por desequilibrio de ligamiento

Con el fin de realizar un estudio alternativo de las asociaciones entre diferentes alelos HLA y los estadios de progresión, se usó la herramienta de desequilibrio de ligamiento de HLA de la base de datos de Inmunología de los Álamos (<http://www.hiv.lanl.gov/content/immunology>). Así, se midió el desequilibrio de ligamiento entre los diferentes alelos representados mayoritariamente en cada grupo, observándose una asociación entre ellos y a su vez con uno de los fenotipos (Tabla 2.3). De esta manera, en el grupo de LTNP, un 75% de pacientes HLA B*5701 tenía también HLA Cw0602. Asimismo, 71% de los pacientes con HLA B*2705 tenía Cw0102, mientras que un 57% posee además A*1101. Aunque con una menor proporción, HLA Cw1203 estaba asociado con HLA A*2601 y B*3801 (P=0.020).

Tabla 2.3. Haplotipos HLA asociados con cada fenotipo según el análisis en la base de datos de Inmunología de Los Álamos (<http://www.hiv.lanl.gov/content/immunology>)

LTNP				
HLA A	HLA B	HLA C	Valor p	Frecuencia
	B*5701	Cw0602	0.001	0.75
	B*2705	Cw0102	0.003	0.71
A*1101	B*2705	Cw0102	0.016	0.57
A*2601	B*3801	Cw1203	0.020	0.25
PROGRESORES				
HLA A	HLA B	HLA C	Valor p	Frecuencia
A*3002	B*1801	Cw0501	0.009	0.43
A*0101	B*0801	Cw0701	0.018	0.33

En cuanto a los progresores, no se vieron asociaciones entre HLA B*3501 y otros alelos. En cambio, un 43% de los pacientes con HLA Cw0501 tenían además A*3002 y B*1801. HLA Cw0701, que individualmente se asoció débilmente con progresión, aparece relacionado con dos alelos previamente descritos como no protectores, A*0101 y B*0801, lo que confirma su relación con este fenotipo (Tabla 2.3).

2.3.5. Frecuencias de SNP y su asociación con alelos HLA

En la Figura 2.4 se representan las frecuencias de los polimorfismos en los genes HCP5 y HLA-C en los diferentes grupos de pacientes estudiados. El cambio TT=>GT en el gen HCP5 se asoció con el fenotipo de no progresión de forma significativa, no existiendo pacientes con el cambio en homocigosis. Igualmente, se observó una mayor proporción de genotipo mutado (TC+CC) en los pacientes LTNP en el análisis del polimorfismo HLA C5'. Por último se analizó la proporción de pacientes que portan los dos cambios, siendo nuevamente mayor en el grupo de LTNP.

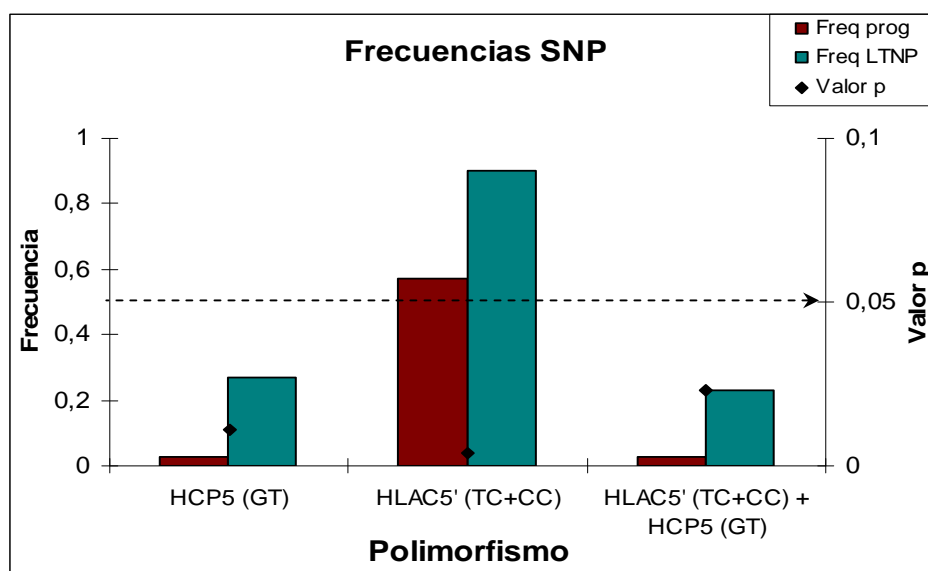


Figura 2.4. Frecuencia de cambios en los polimorfismos genéticos con influencia en la progresión a sida (HCP5 y HLA C5') en LTNP y progresores. Los rombos representan los valores p de las diferencias. La línea de puntos marca el punto de corte de significación.

Por otro lado, se midió la asociación de estos polimorfismos con la presencia de determinados alelos HLA (Tabla 2.4). De esta manera, se encontró una relación altamente significativa entre tener genotipo GT en HCP5 y la presencia de HLA B*5701, así como con el alelo Cw0601. El polimorfismo en el gen HLA-C se relacionó significativamente con el alelo no protector HLA Cw0701 pero específicamente con la forma silvestre (TT). También se encontró una ligera asociación de la presencia de HLA B*2705 con el fenotipo mutado (TC+CC), lo que apoya el papel protector del cambio en este nucleótido.

Tabla 2.4. Asociaciones de cada polimorfismo estudiado y alelos HLA específicos.

	HCP5 rs2395029		
	wt TT	GT	Valor p
HLA-B*5701	0/50 (0 %)	9/9 (100%)	<0,001
HLA-Cw0602	4/51 (8 %)	6/9 (67%)	<0,001
	HLA C rs9264942		
	wt TT	(TC+CC)	Valor p
HLA-B*35	5/16 (31%)	6/43 (14%)	0,130
HLA-Cw0701	9/16 (56%)	9/44 (21%)	0,007
HLA-B*2705	0/16 (0)	7/43 (16,3)	0,086

2.3.6. Análisis conjunto de la asociación de HLA, polimorfismos y factores de entrada con la progresión de la enfermedad.

Después de analizar la influencia de cada factor por separado en la progresión, se evaluó el efecto aditivo de todos ellos. Se tomaron como factores protectores el genotipo de bajo riesgo genético CCL3L1^{alto}-CCR5^{del}, la presencia de los alelos HLA B*5701, B*2705, Cw0102, Cw0602 o Cw1203 y la forma mutada de los polimorfismos HCP5 (GT)

y HLA-C5' (CT+CC). Se observaron diferencias importantes en el número de factores protectores entre ambos grupos de pacientes, siendo la mediana significativamente mayor en LTNP que en progresores típicos (2 [2-3.25] vs 1 [0-1] $p < 0.001$, Figura 2.5). Con esto se observó que el tener un mayor número de factores genéticos protectores se relaciona con un retraso de la aparición de los síntomas de sida.

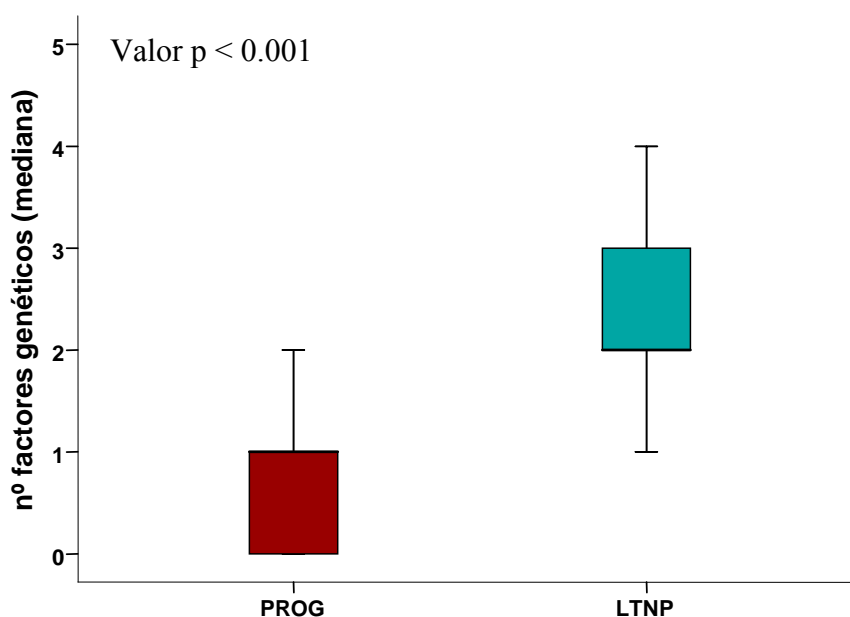


Figura 2.5. Diferencias en el número de factores genéticos protectores presentes entre LTNP y progresores.

Finalmente, se analizó que factores se asociaban con la no progresión de forma independiente al resto. Para ello, se llevó a cabo un análisis multivariante de regresión logística con todos los elementos analizados en el estudio, observando que la presencia de Cw1203 (Tabla 2.5) se asocia de forma independiente con la no progresión. Lo mismo se observó tanto con el polimorfismo en el gen HLA-C5' (TC y TT), como con la presencia del alelo HLA-B*5701, pero la asociación no llega a ser significativa. De este modo, el factor que más contribuyó a explicar el estatus de no progresión en los pacientes estudiados es el tener un HLA Cw1203, aumentando esta variable 12 veces la probabilidad de no

progresar cuando el resto de las variables se mantienen tal y como se presentan. El tener HLA B*2705 en principio entró dentro del modelo, pero el grado de influencia no pudo ser estadísticamente estimado debido a que una de las casillas es cero (en el grupo de pacientes estudiados no existieron progresores que tengan HLA B*2705). En este caso no se pudo dar una solución estadística, aunque según el modelo chi-cuadrado hay gran asociación de este HLA con la no progresión.

Tabla 2.5. Grado de influencia de los diferentes factores genéticos en el fenotipo de progresión de los pacientes del estudio.

Factor	Odds ratio	I.C. 95% de odds ratio	Valor p
<i>HLA B*5701</i>	10,352	0,971 - 110,379	0.053
<i>HLA Cw1203</i>	12,330	1,219 - 124,754	0.033
<i>HLA C5' (CT+TT)</i>	4,122	0,838 - 20,218	0.081

2.4. DISCUSIÓN

La compleja interacción entre el VIH y la célula hospedadora genera grandes variaciones en los patrones de progresión de la infección viral. Así, se han descrito un gran número de factores genéticos humanos con influencia en el retraso de la aparición de los síntomas defintorios de sida. Relacionado con las primeras fases del ciclo viral, se sabe que mutaciones en CCR5 o un mayor número de copias del gen CCL3L1 afecta a la susceptibilidad a la infección, a la menor pérdida de CD4 y enlentecimiento de la progresión por su influencia en el proceso de entrada y replicación viral (Reynes et al., 2001; Shalekoff et al., 2008). Además, según Dolan et al (2007) existen los denominados

genotipos de bajo riesgo (CCR5^{del}CCL3L1^{alto}) los cuales podrían estar jugando un papel en el retraso de la aparición de los síntomas asociados al sida a través de mecanismos independientes de la entrada viral y relacionados con la respuesta inmunológica.

En los resultados presentados no se encuentran grandes diferencias en la delección CCR5Δ32 entre LTNP y progresores, lo que sugiere que no es un factor determinante en esta cohorte de pacientes, quizá por su escasa presencia en la población del sur de Europa (<1%). No se descarta que en los pacientes que lo llevan tenga un efecto en el retraso de la progresión a sida, como se ha observado en otras cohortes ([Morawetz et al., 1997](#); [Eskild et al., 1998](#); [Wilkinson et al., 1998](#); [Schinkel et al., 1999](#)). De forma similar, el número de copias del gen CCL3L1 no parece ser un factor determinante del fenotipo LTNP en el grupo de pacientes analizado, aunque estudios previos lo relacionan con una menor susceptibilidad de la infección ([González et al., 2005](#)). Un trabajo realizado en un grupo de pacientes no progresores apoya los resultados presentados en el presente trabajo, ya que la protección que se ha demostrado para este factor en la susceptibilidad no necesariamente ha de mantenerse en el retraso de la progresión ([Nakajima et al., 2007](#)). Por último, en los pacientes estudiados, la proporción de estos parámetros juntos en lo que se denomina genotipo de bajo riesgo, está ligeramente aumentada en el grupo de no progresores aunque no llega a ser significativa con lo que una vez más parece que estos factores de entrada viral no son determinantes en los fenotipos estudiados. Esto es probablemente debido a que se trata de un efecto débil que queda patente en estudios de grandes cohortes y no cuando se trabaja con un menor número de pacientes.

Otro de los factores a los que se ha atribuido una contribución importante en la patogénesis viral es la presencia de determinados alelos HLA reconocidos como protectores por su influencia en la mejora de la inmunidad celular ([Kaslow et al., 1996](#); [Rosenberg et al., 1997](#); [Migueles et al., 2000](#)). En esta cohorte de pacientes se ha

observado que ciertos alelos protectores están más representados en LTNP, lo que indica que la presencia de estos alelos HLA puede asociarse a una mayor probabilidad de tener progresión más lenta.

El HLA de clase I, y principalmente el HLA B ha sido estudiado extensamente, estando ampliamente relacionados con la no progresión dentro de la población caucásica los alelos HLA B*5701 y HLA B*2703 (Kaslow et al., 1996; Hendel et al., 1999; Migueles et al., 2000; Flores-Villanueva et al., 2003; Trachtenberg et al., 2003; Catano et al., 2008). En los resultados presentados, se encontraron una mayor frecuencia de estos dos alelos en el grupo de pacientes LTNP, no encontrando sin embargo ningún alelo de HLA A asociado con el status LTNP. Esto concuerda con los estudios que sugieren que el HLA B impone una mayor presión de selección sobre el VIH que el HLA A y por tanto ejerce una influencia dominante en el nivel de viremia tras la primoinfección y en consecuencia en el grado de progresión a sida (Kiepiela et al., 2004). Además de confirmar esa asociación de la no progresión con los alelos HLA B, también se encontraron en este estudio alelos HLA C no descritos previamente: Cw0102, Cw0602 y Cw1203. El papel de HLA C ha sido históricamente infravalorado pero los últimos trabajos muestran cómo, de la misma manera que hay polimorfismos en Gag asociados a HLA B que se relacionan fuertemente con una menor viremia (Kiepiela et al., 2007), existe una correlación fuerte entre el número de polimorfismos en Pol seleccionados por alelos HLA C y la carga viral (Matthews et al., 2008). Además, niveles más altos de expresión de HLA C se han relacionado recientemente con el control más eficiente del VIH-1, posiblemente debido a una mejor presentación antigénica a los linfocitos T citotóxicos (Thomas et al., 2009). En ese estudio además se demuestra que hay una asociación entre niveles más altos de expresión de la molécula HLA C en superficie y la forma mutada del polimorfismo HLAC5'. Estos datos

apuntan hacia el HLA C como un nuevo factor en el que profundizar en relación con la no progresión.

En el estudio de desequilibrio de ligamiento, se observó que algunos de estos alelos aparecen juntos con mayor frecuencia en pacientes LTNP. Combinaciones de HLAs dentro del mismo paciente puede impartir, más allá de la simple asociación genética, un efecto antiviral más potente por una mejor respuesta celular frente al virus a través de la presentación de diferentes epítomos virales. De esta manera, según los datos presentados, el tener determinadas combinaciones de alelos como HLA B*5701-Cw0602, HLA B*2705-Cw0102 o HLA B*3801-Cw1203 parece ser un factor fuertemente asociado al status LTNP.

Por otro lado, en el año 2007, Fellay y colaboradores identificaron tres alelos en los genes ZNRD1, HCP5 y HLA-C que explican cerca del 15% de la variación interpaciente de la carga viral tras la primoinfección. Un estudio más reciente ha confirmado esta asociación de los polimorfismos en HCP5 y HLA-C con una menor viremia y progresión más lenta de la enfermedad pero no con ZNRD1 ([van Manen et al., 2009](#)). Aquí se ha analizado la asociación de estos cambios con un fenotipo bien establecido confirmando una mayor frecuencia de ambos en el grupo de LTNP. Simultáneamente, estos cambios se asociaron a determinados alelos HLA, especialmente en HCP5 que se relacionó significativamente con HLA B*5701. Estudios recientes en cohortes de LTNP ratifican la asociación de HCP5 con la progresión y además relacionan HLA Cw06 con este polimorfismo ([Limou et al., 2009](#); [Trachtenberg et al., 2009](#)), de la misma manera que se ha visto en los resultados presentados en este estudio. El alelo silvestre del polimorfismo en HLA C5' se relacionó con HLA no protectores como Cw0701, mientras que el alelo mutado se asoció con HLA protectores como HLA B2705. Esto confirma el papel de estos polimorfismos en la no progresión, bien a partir de un efecto independiente o bien por su

asociación demostrada con determinados HLAs, lo que parece más convincente tras la interrelación demostrada a través del análisis multivariante entre los factores estudiados. Esto viene apoyado por un estudio publicado recientemente que asocia el polimorfismo en HLA C5' con mayor expresión de la molécula HLA C en la superficie celular (Thomas et al., 2009) De cualquier manera para confirmar el mecanismo de acción de los mismos son necesarios estudios más amplios del genoma y con un mayor número de pacientes.

A pesar de que algunos de los factores estudiados tienen una fuerte asociación con el fenotipo de LTNP, ninguno de ellos tiene una influencia decisiva en el retraso de los síntomas de sida. Esto lleva a pensar que es más un efecto aditivo de la carga genética protectora lo que determina el retraso de la aparición de la enfermedad. Por esta razón se comparó, en ambos grupos de pacientes, el número de factores genéticos protectores presentes, siendo significativamente mayor en los LTNP. Un estudio reciente analizando grupos de pacientes con diferente estadio de progresión demuestra cómo hay una correlación entre el número de factores genéticos protectores y la menor carga viral (López-Galíndez, 2009). Además Fellay y col (2009) también observa cómo un conjunto de factores del hospedador parecen actuar juntos en el control de la viremia VIH. Por tanto, la presencia de un mayor número de estos cambios genéticos es un potente predictor de la no progresión. Sin embargo, a la vista de los resultados del presente estudio, algunos de estos factores tienen un efecto independiente más fuerte que otros, como la presencia de HLA Cw1203 o HLA B*5701. Estos alelos protectores refuerzan la teoría de que la inmunidad celular juega un papel importante en el retraso del desarrollo de la enfermedad, posiblemente a través de un mecanismo aún por conocer en detalle en el que el HLA C podría jugar un importante papel.

En conclusión, en este estudio se ha determinado cómo el número de factores genéticos protectores tiene un efecto acumulativo en el retraso de la aparición de los síntomas de sida. Así, un mayor número de estos factores se asoció estrechamente al fenotipo de LTNP. Además, dentro de todos los elementos analizados, la presencia del alelo HLA Cw1203, y en menor medida HLA B*5701, y el polimorfismo HLA C5' presentaron un valor protector independiente, lo que apoya el hecho de que la inmunidad mediada por células tenga un papel predominante en la respuesta efectiva frente al VIH. Como novedad, se abre un nuevo campo de investigación sobre la influencia del HLA C en el control de la infección, aunque son necesarios estudios funcionales más amplios para confirmar estos resultados.

Capítulo 3

Estudio de la expresión diferencial de genes celulares en LTNP y progresores

3.1. INTRODUCCIÓN

Se ha descrito que la infección por VIH-1 tiene efectos dramáticos en la biología de las células T, lo que hace que cambien los patrones celulares de expresión genética (Chan et al., 2007). Por tanto, el estudio e identificación de los genes activados o inhibidos por el virus en relación con la no progresión es de gran utilidad para comprender la patogénesis del VIH.

Las nuevas técnicas de amplio espectro de análisis como los microarrays de ADN permiten manejar gran cantidad de información sobre los diferentes patrones de expresión comparando distintos grupos de muestras. Usando estos métodos, algunos estudios han analizado los perfiles de expresión en diferentes tipos celulares infectados por VIH, bien usando ensayos *in vitro* o *in vivo* (revisado en Giri et al., 2006). Sin embargo, muy pocos han analizado la expresión genética en células T relacionándola con diferentes estadios de progresión (Sankaran et al., 2005; Hycza et al., 2007; Wu et al., 2008). La mayoría de estos estudios han analizado un número muy pequeño de pacientes (5 o menos) y en algunos casos resulta obligado combinar fenotipos similares para observar diferencias. El tamaño de la muestra es importante para detectar de forma fiable tanto los cambios más grandes como las diferencias sutiles en los niveles de expresión. Además, una buena definición de los grupos de pacientes a comparar es primordial para evitar variaciones entre diferentes investigaciones.

Por estas razones, en este estudio se compararon dos grupos de pacientes VIH+ con un fenotipo bien definido, y un número suficientemente grande de individuos en cada uno. En él, se comparó la expresión genética de células T CD3+ de LTNP y progresores en ausencia de tratamiento antirretroviral.

3.2. MATERIAL Y MÉTODOS

3.2.1. Pacientes

Para el estudio de expresión genética mediante microarrays se utilizaron 16 LTNP de la Cohorte del Hospital Carlos III definida previamente. Dentro del grupo de progresores típicos se analizaron 15 individuos VIH+, con menos de 5 años desde la seroconversión, naïve para el tratamiento antirretroviral y con una caída de CD4 mayor de 100 cel/ μ l/por año. La mayor parte de ellos (73%) iniciaron tratamiento tras la recogida de la muestra. Todas las muestras se procesaron en fresco y en paralelo para evitar sesgos por manipulación en la expresión genética. La determinación de los parámetros clínicos se realizó según se describe en el capítulo 1.

3.2.2. Aislamiento de linfocitos T CD3+

Las células T CD3+ fueron extraídas a partir de la sangre de los pacientes en dos pasos. En primer lugar se llevó a cabo una centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll-Histopaque (Sigma Diagnostics, St Louis, MO), para aislar las CMSPs (células mononucleares de sangre periférica). Posteriormente, estas CMSP frescas se incubaron con anticuerpos anti-CD3 unidos a bolitas magnéticas que posteriormente se pasaron a través de columnas imantadas obteniéndose de esta forma la fracción de células T CD3+ (BD IMag™ Anti-Human CD3 Particles DM, BD BIOSCIENCES, USA). La pureza de las células aisladas se midió empleando citometría de flujo, siendo la pureza obtenida mayor del 95% en todos los casos (Figura 3.1)

3.2.3. Procesamiento del ARN

Una vez obtenidos, los linfocitos T se lisaron y se extrajo el ARN usando el RNeasy Total ARN Isolation Kit (Qiagen, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. La viscosidad de los lisados se redujo empleando columnas Qiasreder (Qiagen, Alemania) y las posibles trazas de ADN genómico contaminante se eliminaron mediante tratamiento con ADNasa I (Qiagen, Alemania). La integridad y concentración del ARN total purificado fueron determinadas en un gel desnaturalizante de agarosa al 1.5% y con espectrofometría (Nanodrop, espectrofotómetro ND-1000, Agilent Technologies, USA) respectivamente.

3.2.4. Hibridación y procesamiento de microarrays

Las muestras de ARN se amplificaron y posteriormente hibridaron en una placa comercial de microarrays que posee sondas para todo el genoma humano (Whole Human Genome Microarray 4 x 44K, G4112F, Agilent Technologies, USA) (Figura 3.1). Para ello se utilizó el protocolo de análisis de expresión genética basado en microarrays de un color que provee el fabricante. Brevemente, a partir de 1 µg de ARN total se realizó la transcripción inversa usando los cebadores del promotor T7 y la transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney. Después, el cADN fue convertido a ARN antisentido (ARNa) usando la ARN polimerasa T7 que de forma simultánea amplifica e incorpora cianina 3 unida a citidina trifosfato (Cy3-CTP). Tras el marcaje, 1.65 µg de ARNa se fragmentó e hibridó durante 17 horas a 65°C y 10 rpm en un horno de hibridación (G2545A, Agilent Technologies, USA) con un buffer de hibridación a una concentración final de 1X según las instrucciones del fabricante (Gene expression hybridization kit, Agilent Technologies, USA). Después los arrays se secaron y escanearon a resolución 5µm en Agilent ADN microarray scanner (G2565BA, Agilent Technologies, USA). Las

imágenes obtenidas tras el escaneo se analizaron usando el programa informático de Agilent (Agilent Feature Extraction (AFE) versión 9.5.3.1).

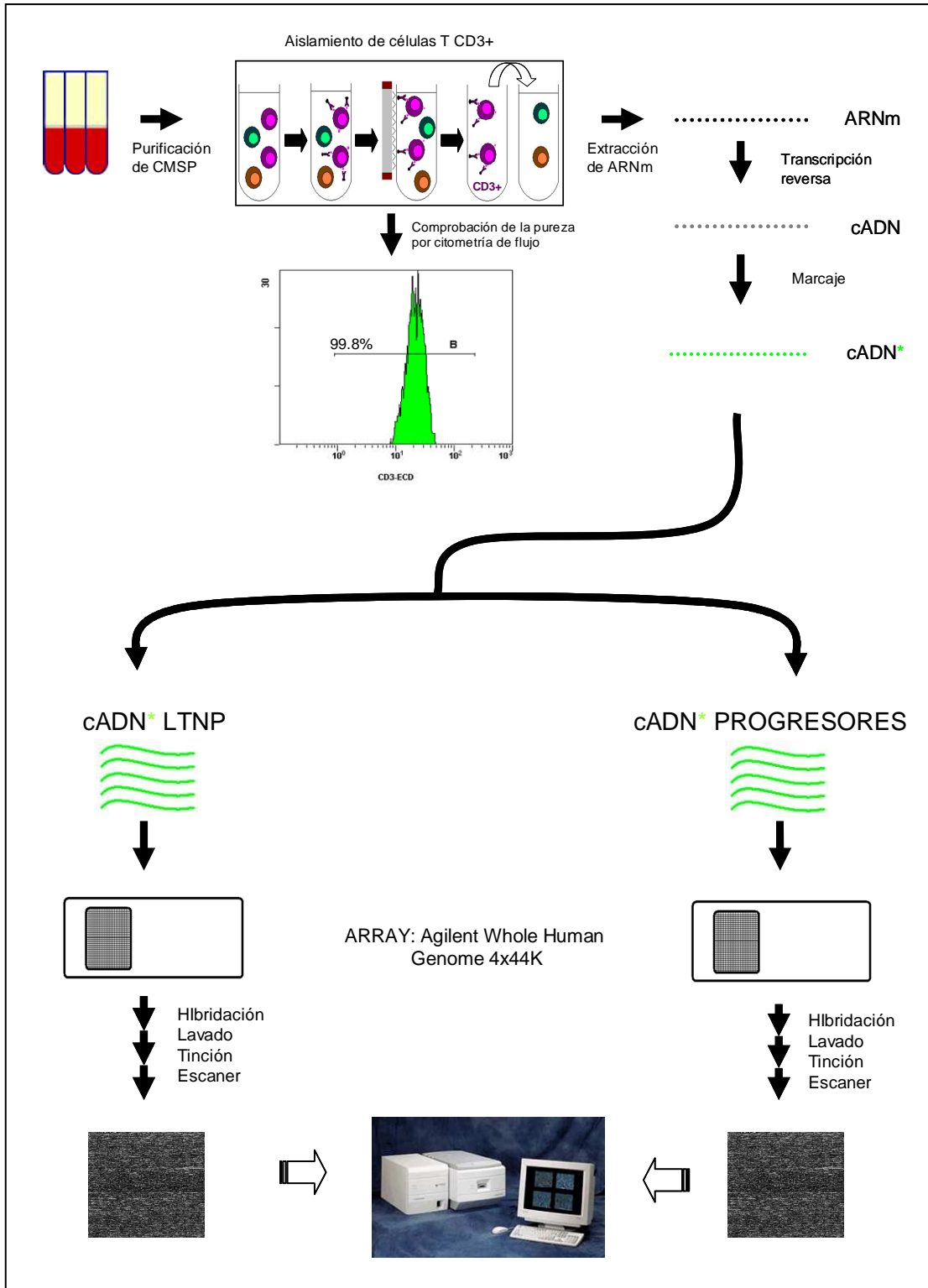


Figura 3.1. Esquema del procedimiento metodológico utilizado en el análisis por microarrays de ADN.

3.2.5 Análisis de datos de arrays: pre-procesamiento y normalización

Los datos fueron leídos, editados y analizados usando R (R Development Core Team, 2006) y los diferentes paquetes específicos de Bioconductor. Para leer los diferentes archivos exportados desde AFE a R se usó la función de limma *read.maimages* (Smyth, 2005). Además se utilizó el paquete de anotación de Bioconductor *hgug4112a.db* para asignar a cada sonda de Agilent un código numérico de acceso genético, un símbolo genético, una descripción genética y su correspondiente término e identificador de la base de datos GeneOntology.

Posteriormente se corrigieron y normalizaron los datos con el fin de compensar las diferencias técnicas sistemáticas entre arrays y así ver más claramente las diferencias biológicas entre los dos grupos de pacientes. Para realizar esto se utilizaron las herramientas del paquete limma (Smyth, 2005) *backgroundCorrect* (usando el método *half*) y *normalizeBetweenArrays* (usando el método *cuantil*, Bolstad, et al, 2001; Bolstad et al., 2003).

4.2.6. Análisis estadístico

Para examinar si los genes están diferencialmente expresados en los dos grupos de pacientes, se usó un modelo lineal del paquete limma Bioconductor. Este paquete permite ajustar un modelo lineal al valor de expresión de cada gen con el fin de hacer un rango del conjunto de los genes según su nivel de significación para la expresión diferencial entre los grupos. Este paquete también usa métodos empíricos de Bayes (Smyth, 2004) que permiten el uso del estadístico t moderado, y también incorpora herramientas estadísticas para ajustar por la multiplicidad del test. Para medir las diferencias entre pacientes progresores y LTNP se aplicó el siguiente modelo lineal a los datos:

$$y_{ij} = \tau_i + e_{ij}$$

dónde y_{ij} es la observación correspondiente al estatus i del individuo j , τ_i es el efecto del estatus i (progresor o LTNP) y e_{ij} el error experimental asumiendo estar normal e independientemente distribuido con una media de cero y una varianza de σ_e^2 .

Los genes diferencialmente expresados debidos a diferencias en el estatus fueron descubiertos por el establecimiento de la hipótesis nula de “no hay diferencias entre el estatus estimado τ_i para cada gen”. El método Benjamini y Hochberg’s (BH) (Benjamini et al., 1995) fue empleado para controlar la tasa de falsos descubrimientos (false discovery rate, FDR) como por ejemplo la proporción de genes no diferencialmente expresados realmente que aparezcan expresados significativamente.

3.2.7. Análisis Funcional

Para el análisis funcional se usó el paquete GEPAS (Al-Shahrour et al., 2005; Al-Shahrour et al., 2006) con el que se pudo estudiar si el conjunto de genes diferencialmente expresados en los dos grupos de pacientes estaban enriquecidos en términos específicos de la base de datos GeneOntology (GO) (localización celular, función molecular y procesos biológicos en los que está implicado cada gen) y KEGG (rutas metabólicas relacionadas). En este análisis se obtienen valores p hipergeométricos para cada término GO o KEGG sobre-representado sobre el correspondiente término GO o KEEG para los genes seleccionados. Básicamente, es una comparación de las funciones más o menos representadas en la lista de genes con diferencias en relación a todos los genes que tienen una función asociada.

Por otro lado se analizaron las interacciones conocidas con el VIH, buscando los genes sobreexpresados en cada grupo en la base de datos de interacciones de proteínas humanas del NCBI (Ptak et al., 2008; Fu et al., 2009; Pinney et al., 2009).

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Características de la población estudiada

Las características de los pacientes en el momento del análisis de la expresión génica se describen en detalle en la Tabla 3.1, donde se puede observar que las principales diferencias entre ambos grupos se deben a la ruta y tiempo de infección, además de las cargas virales. Tres LTNP presentaban carga viral indetectable a lo largo del seguimiento lo que les clasifica dentro de la definición de controladores de élite (Deeks et al., 2007). Los niveles de células T CD4+ no llegan a ser significativamente diferentes, aunque si tienden a ser mayores en el grupo de LTNP. Ninguno de los individuos había recibido terapia antirretroviral antes de la entrada en el estudio pero, como un signo de progresión, 73% de los pacientes clasificados como progresores iniciaron tratamiento antirretroviral en los meses posteriores a la recogida de las muestras.

El análisis genético de los virus determinó que todos los pacientes estaban infectados por VIH-1 subtipo B.

Tabla 3.1. Características de los pacientes del estudio

Características	Pacientes (n=31)		Valor p
	LTNP (n=16)	Progresores (n=15)	
Sexo (nºhombres)	11 (69%)	13 (87%)	0,230
Edad (años)	42 [36-47]	32 [30-38]	0,027
Tiempo seguimiento (años)	19 [14-22]	2 [1-3]	<0,001
Grupo de riesgo			<0,001
ADPV	13 (81,3%)	1 (6,7%)	
HMSX	3 (18,8%)	13 (86,7%)	
HTSX	0	1 (6,7%)	
CD4abs (cels/ul)	601 [426-698]	375 [330-783]	0,066
CD4%	32 [27-38]	22 [21-29]	0,009
LogCV (log copias/ml)	3,34[2,27-3,54]	4,48 [3,81-5,20]	<0,001

NOTA. Los datos se presentan como mediana [rango intercuartílico]

3.3.2. Análisis de la expresión genética diferencial por microarrays

Se utilizó el ARN de las células T CD3⁺ recogidas *ex vivo* para el estudio de expresión genética diferencial en los dos grupos de pacientes. Este ARN se hibridó en un array comercial que tenía inmovilizadas sondas para todo el genoma humano (43377 sondas correspondientes a los aproximadamente 30000 genes que componen el genoma humano). Las diferencias en la expresión génica se midieron con el estadístico t, moderado a lo largo de los genes usando métodos empíricos de Bayes. El análisis reveló un total de 458 genes diferencialmente expresados entre los dos grupos de pacientes, estando 322 de ellos sobreexpresados en el grupo de progresores y 136 sobre expresados en LTNP (Figura 3.2). La lista completa de genes se adjunta en el Anexo II. Así, por el número de genes sobreexpresados en cada grupo se distingue un patrón de expresión diferente dependiendo del fenotipo, indicando una mayor actividad genética cuando la infección es más agresiva.

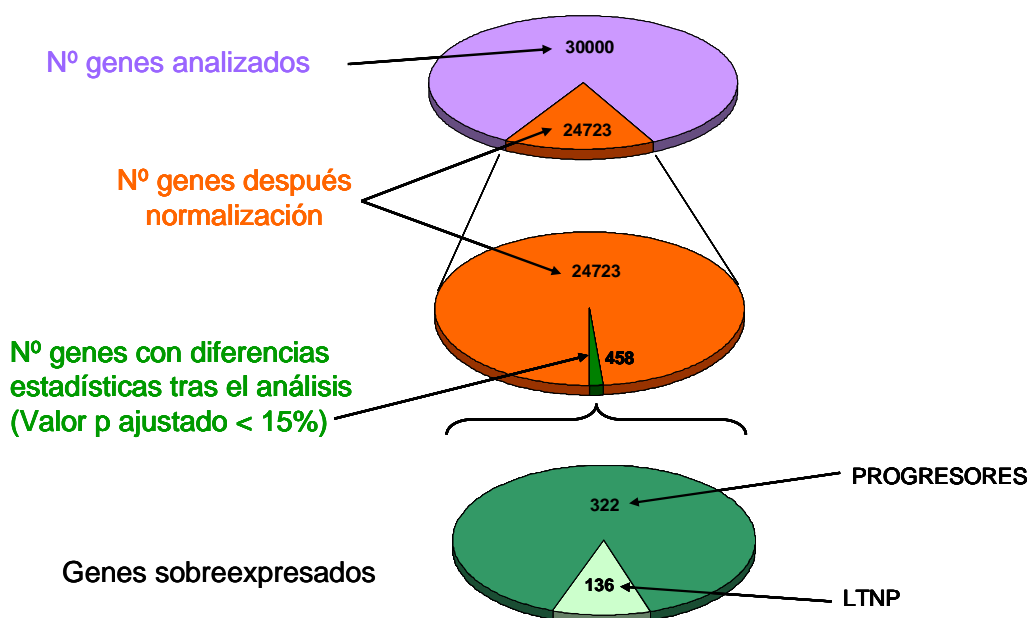


Figura 3.2. Representación gráfica de los genes obtenidos tras el análisis de microarrays.

3.3.3. Análisis Funcional

Los genes operan dentro de una intrincada red de interacciones dentro de la célula y en algunos casos incluso de manera redundante. Para facilitar la comprensión de las implicaciones biológicas de estos 458 genes diferencialmente expresados, se realizó un análisis funcional usando la herramienta FATIGO dentro del paquete GEPAS (Al-Shahrour et al., 2005; Al-Shahrour et al., 2006). Esta herramienta utiliza las bases de datos de GeneOntology y rutas metabólicas de KEEG para dar una asociación entre cada gen y su función. La distribución de las combinaciones de genes y sus términos fue evaluada simultáneamente por el test de Fisher. De este análisis se obtuvieron datos relevantes en cuanto a las diferencias en las localizaciones de los genes, las funciones biológicas, los mecanismos moleculares y las rutas metabólicas en las que participan. Esto se representa en varios niveles que se corresponden con un mayor grado de complejidad del sistema (Figura 3.3). Los genes relacionados con cada función o localización se detallan en el Anexo III.

En cuanto a la localización celular de los diferentes genes, a pesar de distribuirse ampliamente a lo largo de la célula en ambos grupos de pacientes, se observaron diferencias según el fenotipo. Así, los genes sobreexpresados en LTNP estaban mayoritariamente representados en la membrana celular mientras que los genes sobreexpresados en progresores estaban mayoritariamente en el núcleo, asociados a cromosomas y a los distintos orgánulos citoplasmáticos (Figura 3.3a). La localización determina la parte celular activada en cada caso.

En cuanto a los procesos biológicos en los que los genes están implicados, se observaron diferencias en las funciones activadas en cada grupo de pacientes. Así, se observó sobreexpresión de genes relacionados con el ciclo celular en ambos grupos de pacientes, pero la proporción fue significativamente mayor en el grupo de progresores

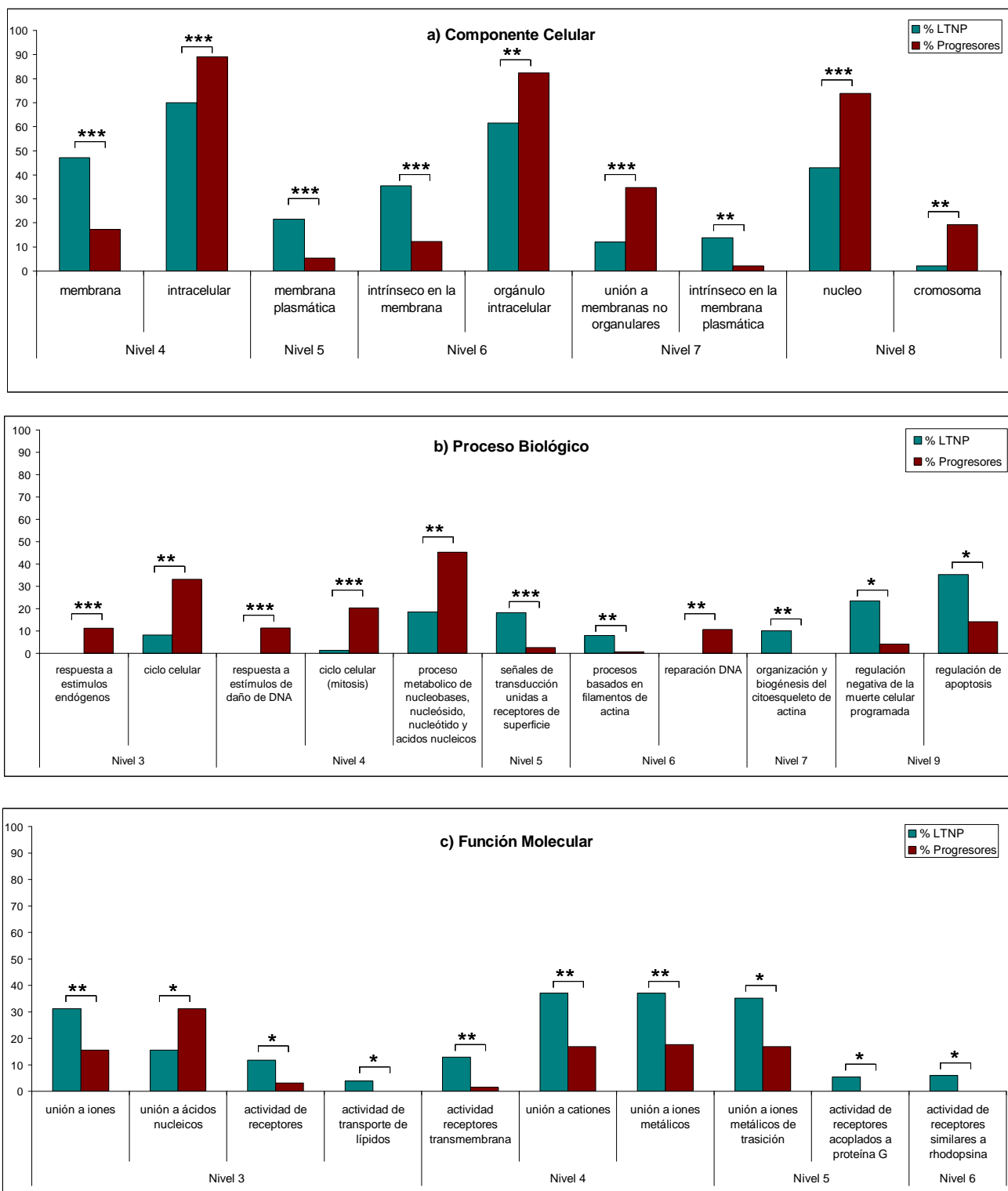


Figura 3.3. Representación gráfica de la distribución de los genes según las funciones más representadas en LTNP y progresores de acuerdo con a) componente celular; b) proceso biológico; y c) función molecular. Las barras muestran el porcentaje de genes que se relacionan con cada función respecto al total de genes sobreexpresados en cada grupo de pacientes. Los asteriscos representan los valores p (*=> valor p <0.05/ ** => valor p <0.005/ *** => valor p <0.001). Los niveles representan el grado de complejidad con el que se corresponde cada función.

(Figura 3.3b), donde el virus tiene una replicación mayor. De hecho, la mayoría de los genes sobreexpresados en progresores estaban relacionados con el ciclo celular, específicamente con la fase de mitosis, procesos metabólicos de los ácidos nucleicos y regulación del ciclo celular.

El resto de los genes sobreexpresados en progresores estaban relacionados con respuesta a estímulos endógenos, más específicamente a estímulos por daño y reparación del ADN. Por otro lado, los genes sobreexpresados en LTNP se asociaron con distintas funciones como procesos de transducción de señal relacionada con receptores de superficie celular, organización y biogénesis del citoesqueleto de actina, así como regulación de la apoptosis, principalmente la regulación negativa de la misma.

En el análisis de las funciones moleculares, la mayoría de estas funciones se relacionaron con genes sobreexpresados en LTNP (Figura 3.3.c). Dichos genes estaban relacionados con la unión a iones, receptores de membrana y la actividad de receptores acoplados a proteína G. En cuanto a los progresores se observó solamente sobre-representada la ruta de unión a ácidos nucleicos. Estos resultados están de acuerdo con las observaciones anteriores, apoyando la idea de que en LTNP hay una activación de las funciones de señalización a través de receptores de membrana mientras que en progresores prevalecen las actividades relacionadas con el ciclo celular, específicamente con la replicación del material genético.

Finalmente, se analizaron las rutas metabólicas usando la base de datos KEGG Pathways (<http://www.genome.jp/kegg/>). En LTNP, los genes activados estaban implicados en las interacciones entre citoquinas y sus receptores, regulación del citoesqueleto de actina y procesos de adhesión focal, mientras que los genes sobreexpresados en progresores estuvieron principalmente relacionados con rutas del ciclo celular (Figura 3.4).

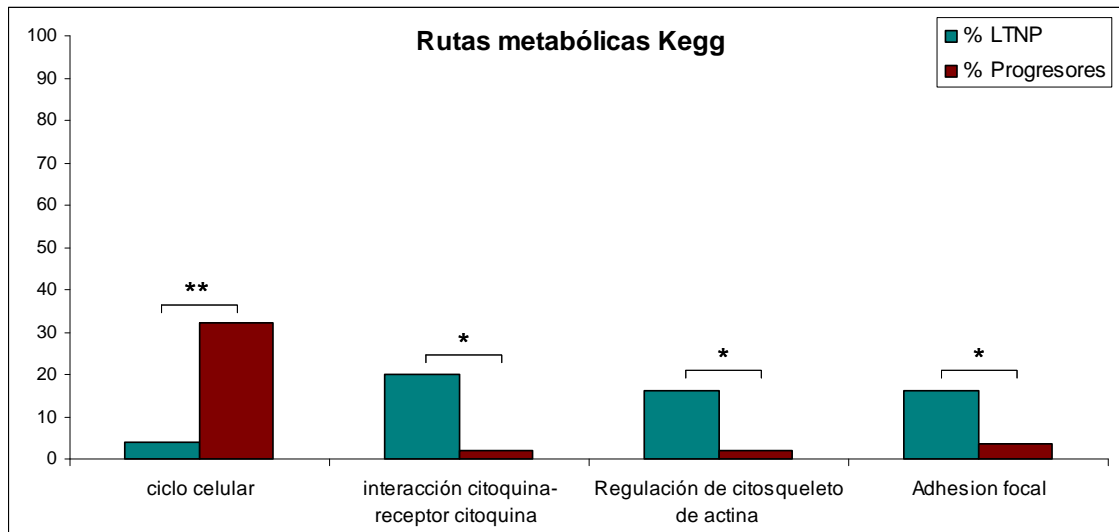


Figura 3.4. Representación gráfica de la distribución de los genes según las rutas metabólicas en las que están implicados tanto en LTNP como progresores (según la base de datos KEEG PATHWAYS). Los asteriscos representan los valores p de cada diferencia (($*$ => valor $p < 0.05$ / $**$ => valor $p < 0.005$).

Por tanto, se aprecian diferentes funciones características de cada grupo. Principalmente la señalización entre células parece ser un patrón característico de LTNP, más específicamente las funciones de interacción entre citoquinas y sus receptores, control negativo de la apoptosis y regulación del citoesqueleto de actina. Por otro lado, en progresores se observó gran actividad del ciclo celular con un importante papel en la replicación y estímulos de daño de ADN.

3.3.4. Interacciones

Con el objetivo de completar los datos de patogénesis obtenidos del análisis funcional se analizaron las interacciones de los genes sobreexpresados en cada grupo con los genes virales usando la base de datos de interacciones de proteínas humanas y VIH-1 (NCBI). Así, los genes con una representación significativa en las funciones sobreexpresadas dentro de los dos grupos se usaron para encontrar alguna interacción conocida. Como se observa en la Tabla 3.3, en el grupo de LTNP los genes

sobreexpresados tienen interacción con *tat* y *env*, mientras que en progresores la interacción de los genes sobreexpresados incluyó un rango mayor de genes virales, incluidos genes accesorios.

Tabla 3.3. Interacciones genéticas entre genes virales y genes del huésped sobreexpresados en LTNP y progresores.

Grupo	Gen sobreexpresado	Gen viral	Efecto principal
LTNP	<i>bmpr2</i>	<i>tat</i>	<i>tat</i> modula a la baja <i>bmpr</i>
	<i>pten</i>	<i>tat</i>	<i>pten</i> aumenta <i>tat</i>
	<i>cull1</i>	<i>tat</i>	<i>cull1</i> está en una ruta compleja de <i>tat</i>
	<i>tnfrsf10B</i>	<i>env</i> (gp120)	gp120 modula a la alta TNFRS10B
	<i>gpr15</i>	<i>env</i> (gp120)	gp120 activa <i>gpr15</i>
Progresores	<i>rad51</i>	<i>tat</i>	Rad51 aumenta Tat
		<i>tat</i>	<i>tat</i> modula a la alta <i>rad51</i>
		<i>vpr</i>	<i>vpr</i> inhibe <i>rad51</i>
		integrasa	Rad51 inhibe <i>rad51</i>
	<i>kif4</i>	<i>gag</i>	Pr55(Gag) se une a KIF4
	<i>cd8b</i>	<i>nef</i>	Nef modula a la baja <i>cd8b</i>
	<i>brca1</i>	<i>vpr</i>	<i>vpr</i> estimula <i>brca1</i>
		<i>tat</i>	<i>tat</i> se asocia con <i>brca1</i>
	<i>cd38</i>	<i>env</i> (gp120)	gp120 interactúa con <i>cd38</i>

3.4. DISCUSIÓN

Estudios recientes han analizado la expresión genética en pacientes LTNP identificando genes activados de respuesta a interferón como un signo de progresión (Hycza et al., 2007), además de la sobreexpresión de genes relacionados con citotoxicidad y rutas metabólicas de MAPK en no progresión (Xu et al., 2008). Aún así, es necesario un estudio que dé una visión más clara del funcionamiento de la maquinaria celular en LTNP. El uso de un grupo de pacientes amplio y bien definido (y en seguimiento por más de 20

años en algunos casos) junto con el estudio de interacciones de genes virales y celulares, permite distinguir patrones de expresión característicos de cada fenotipo analizado.

A lo largo de la infección, el virus utiliza la maquinaria celular para su beneficio usando proteínas del huésped. Además, existen estudios que muestran cómo las proteínas accesorias del virus tienen un papel importante en la evasión de la inmunidad innata y adaptativa (Malim et al., 2008). Por esta razón, el hecho de que exista una mayor variedad de genes virales (incluidos genes accesorios) interactuando con factores celulares en el grupo de progresores típicos, podría ser un reflejo de un estado más avanzado de progresión.

La infección por VIH conlleva defectos en las células T, lo que juega un papel importante en la tasa de progresión a sida (Sodora et al., 2008). Aunque se ha visto que los pacientes no progresores poseen una funcionalidad de las células T más conservada que el resto de pacientes (Betts et al., 2006), la base genética de las interacciones relacionadas con la progresión de la enfermedad no se conoce todavía. En este estudio, se observaron 458 genes diferencialmente expresados en las células T de los pacientes, lo que refleja diferencias funcionales entre los dos grupos analizados. Así, los genes sobreexpresados en progresores están relacionados con replicación de ADN, regulación del ciclo celular y apoptosis, lo que se había definido previamente en el contexto de la replicación del VIH (Chun et al., 2003) y la progresión (Hyrca et al., 2007; Wu et al., 2008). Sin embargo, se observaron otras nuevas rutas relacionadas con cada fenotipo, como las interacciones entre citoquinas y sus receptores y la regulación del citoesqueleto de actina en LTNP y la respuesta a estímulos por daño de ADN en progresores. Todas estas funciones se analizan y discuten en detalle para buscar el significado biológico de las mismas.

3.4.1. Diferencias en la desregulación del ciclo celular entre LTNP y progresores

El VIH induce modificaciones en el ciclo celular con el fin de usarlo en su beneficio para llevar a cabo la proliferación y replicación viral. Estos cambios son generados por la interacción entre el virus y la célula hospedadora ya que, como se ha publicado recientemente, el virus necesita unas 200 proteínas celulares para llevar a cabo la infección (Brass et al., 2008; Konig et al., 2008; Zhou et al., 2008). La importancia de estas proteínas en la progresión de la enfermedad no se conoce aún. En el presente estudio, se observó un grupo de genes sobreexpresados relacionados con el ciclo celular (principalmente en mitosis) en pacientes con una evidente progresión a enfermedad. Resultados similares se han visto en el tejido linfoide asociado al intestino, dónde, tanto LTNP como pacientes virémicos, presentaron una desregulación del ciclo celular en las células de la mucosa (Sankaran et al., 2005). Sin embargo, en el presente estudio la desregulación se observó solamente en pacientes progresores. Esto indica un recambio más rápido de las células T CD4+ y CD8+ en estos pacientes, lo que está de acuerdo con el estudio de Hyrcza y col. (2007). Según estos datos, los estadios más avanzados de infección irían acompañados de una mayor replicación celular lo que podría explicar la progresión de la enfermedad en el grupo de pacientes progresores. Se sabe que un cierto estado replicativo es necesario para que haya una infección por VIH productiva (Zhang et al., 1999). Sin embargo, este recambio persistente observado afectaría a la organización del sistema inmunológico y a la pérdida de las células dianas resultando en un avance de la enfermedad (Grossman et al., 2006). La baja replicación celular observada en LTNP, por el contrario, podría beneficiar a estos pacientes con una menor infectividad y un menor efecto sobre la organización del sistema inmunológico. El VIH es selectivo con su diana (principalmente células de memoria CD4+ CCR5+) y un estado inapropiado de activación podría resultar en una expresión de CCR5 demasiado baja en la superficie celular para

llegar a ser infectada (Grossman et al. 2006), lo que podría contribuir a disminuir la fuente de producción viral.

3.4.2. Diferencias en genes relacionados con respuesta a estímulos asociados con daño al ADN

El VIH-1, como otros virus con distintas estrategias de replicación, activa las rutas de respuesta al daño del ADN. Parece que la activación de la reparación celular de ADN y la recombinación de enzimas es beneficioso para la replicación viral (Sinclair et al., 2006).

En el presente trabajo se encontraron genes sobreexpresados relacionados con la reparación y respuesta a estímulos de ADN en el grupo de progresores, pero no en el grupo de LTNP. Por lo tanto, estas señales se correlacionan con una mayor replicación aunque no se conoce bien el mecanismo por el que esto ocurre.

Recientemente se ha visto, y contrastado con otros estudios a lo largo del genoma (Bushman et al., 2009), que las proteínas reparadoras de ADN son necesarias en los primeros pasos del ciclo viral (Konig et al., 2008); específicamente, la maquinaria celular de reparación de ADN se ha visto implicada en la integración del ADN viral y la finalización de la síntesis de ADN tras la integración (Goff, 2007). Por otro lado, la activación de las rutas de respuesta al daño del ADN también pueden promover la apoptosis (Corbeil et al., 2001; Sinclair et al., 2006). De hecho, dos de los genes obtenidos en el presente análisis (GTSE1 y BRCA1) están asociados con la proteína P53, que es activada en la muerte celular inducida por VIH-1 (Imbeault et al., 2009). Algunos genes relacionados con la activación de la apoptosis se expresan en progresores pero no predominantemente. Por esta razón, la reparación de ADN puede ser aquí un indicador de la integración proviral como reflejo de la replicación activa en pacientes progresores.

3.4.3. Regulación del citoesqueleto de actina activada en pacientes LTNP

El citoesqueleto de microfilamentos de actina de la célula huésped juega un amplio rango de funciones en la infección por VIH-1, entre las que se incluyen la entrada viral, la transcripción inversa, el transporte al núcleo, la integración y finalmente una correcta gemación y salida de la célula (Fackler et al., 2006). Sin embargo, el mecanismo de interacción entre el VIH y el citoesqueleto de actina no está muy claro. La polimerización de actina es requerida para la unión y entrada del virus a la célula, pero inhibe otros pasos posteriores actuando como una barrera física para el virus. Para atravesar esta barrera y continuar con el ciclo viral, una proteína conocida como cofilina es activada por el virus para despolimerizar la actina (Bukrinsky, 2008; Liu et al., 2009).

En el presente estudio se observó una mayor expresión de genes relacionados con la organización y biogénesis del citoesqueleto de actina en el grupo de LTNP, muchos de ellos relacionados con la fosforilación de cofilina, lo que se traduce en la inactivación y prevención de su asociación con actina. En LTNP un exceso de la forma G-actina como resultado de una baja despolimerización podría bloquear el movimiento del virus en el interior de la célula. Normalmente, el virus es capaz de modular y usar la red de microtubulos para su propio beneficio (Fackler et al., 2006; Lu et al., 2008) a través de proteínas virales como Nef, Gag o Tat que interactúan con el citoesqueleto (Campbell et al., 2004; Matarrese et al., 2005; Naghavi et al., 2007). En el grupo de LTNP estudiado la proteína Nef fue caracterizada (como se ve en el Capítulo 1) y, excepto por un paciente con Nef deletado, el resto no presentaban grandes defectos con lo que los genes aparentemente son funcionales. Sin embargo, se pueden descartar diferencias en la modulación de actina relacionadas con Nef respecto a los progresores así como por la proteína Tat o Gag.

Por otro lado, el aumento de la expresión de estos genes en un paso posterior a la infección viral puede estar asociada con eventos transmembrana de unión y entrada viral, así como con otros procesos estructurales relacionados con activación celular y señalización (Vahey et al., 2002). Cuando se estudió la función específica de la mayoría de genes sobreexpresados, se vio que se asociaban adicionalmente con procesos de adhesión, por lo que otra explicación para la no progresión podría ser que en estos pacientes hay una mayor y mejor sinapsis inmunológica entre las células T CD8+ específicas de antígeno y las células T CD4+ debido a los procesos de adhesión y remodelación que tienen lugar en la sinapsis (Shen et al., 2005). Si la sobreexpresión de las proteínas del citoesqueleto en LTNP se relaciona con una mejor respuesta inmunológica o por el contrario está actuando como una barrera física intracelular está aún por determinar.

3.4.4. Sobreexpresión de genes relacionados con la interacción de citoquinas y sus receptores en LTNP

Una buena respuesta inmunológica depende sobre todo de la habilidad de los linfocitos T para activarse en respuesta a una estimulación antigénica. Esta activación desemboca en una cascada de secreción de citoquinas, sobreexpresión de receptores, proliferación celular y desarrollo de funciones efectoras (Smith et al., 1980).

En el presente estudio, se observaron activados en LTNP receptores de la superficie celular unidos a señales de transducción. Los genes identificados incluyeron receptores como IL17RA, IL1RAP o TNFRSF1 (Anexo III), los cuales pueden ser parte de una respuesta inmune mayor y más preservada y protectora en este grupo de pacientes. IL17RA controla la actividad de IL17 (citoquina proinflamatoria) que regula la expansión de la población celular CD4+ Th17 (Wright et al., 2008; Smith et al., 2008b). La expresión de estas moléculas se estudia con más detalle en capítulo 4. Por otro lado, IL1-RAP está

relacionado con la respuesta inmune celular innata (Ali et al., 2007), mientras que TNFRSF1 actúa en la regulación de la apoptosis.

Previamente, se ha descrito que la supresión viral en LTNP puede resultar del mantenimiento eficiente de la respuesta de las células T CD4⁺ (conocida como *helper* o colaboradora) y T CD8⁺ específicas de VIH-1 tanto en tejido linfoide asociado a intestino como en linfocitos circulantes (Sankaran et al., 2005). Los pacientes LTNP de este estudio presentaron sobreexpresión de genes relacionados con moléculas de adhesión y receptores de citoquinas que, de acuerdo con estas observaciones, podrían relacionarse respectivamente con una sinapsis inmunológica activa y una respuesta T más eficiente. Por otro lado, alguna de esas moléculas puede jugar otras funciones relacionadas con la patogénesis viral. Un ejemplo es Gpr15 (sobreexpresado en LTNP) que se ha demostrado como un correceptor activo para entrada viral en VIH-2 (Blaak et al., 2005). La sobreexpresión de Gpr15 puede compensar un CCR5 defectivo o ser una vía alternativa de entrada viral, aunque con menor eficacia para el virus.

En cualquier caso son necesarios más estudios para confirmar estas hipótesis sobre la influencia de estas proteínas en la progresión. Lo que parece claro es que globalmente existe una mayor interacción entre células a través de la producción de citoquinas en el grupo de LTNP, lo que se podría relacionarse con una respuesta inmunológica más conservada.

3.4.5. Diferencias en los patrones de expresión de apoptosis

Se sabe que los pacientes LTNP presentan un bajo nivel de apoptosis y como consecuencia una menor pérdida de CD4, probablemente acompañado de una baja carga viral o de la presencia de virus defectivos (Kirchhoff et al., 1995; Franceschi et al., 1997). La apoptosis de las células T es probablemente una de las maneras por las que el VIH-1

evade la respuesta inmune. En el presente estudio, en ambos grupos se han visto genes activados relacionados con apoptosis aunque las diferencias entre ambos grupos no llegan a tener una significación fuerte. Sin embargo, se observa que la mayoría de los genes relacionados con apoptosis en LTNP son los mismos que se relacionan específicamente con la regulación negativa de la misma, lo que no ocurre en progresores (Anexo III). Por el contrario, el grupo de progresores presenta genes sobreexpresados como CD38, característico por tener una gran relación con la activación y muerte celular en células T CD8+ y descrito como un marcador asociado con la progresión de la enfermedad (Liu et al., 1997). En un estudio reciente, los niveles de activación de células T CD8+ y, especialmente la expresión de CD38, se correlaciona inversamente con los niveles de células T CD4+ y positivamente con la carga viral en progresores típicos (Jiao et al., 2008) por lo que es un marcador muy relacionado con la progresión.

En conclusión, los resultados de este estudio ofrecen una nueva visión relacionada con el estado de progresión y permite distinguir patrones de expresión diferencial entre LTNP y progresores. La característica más notable que se ha observado es una regulación del citoesqueleto y señalización celular de citoquinas más preservada y activa en LTNP, mientras que existe una gran desregulación del ciclo celular en progresores. Estos resultados son útiles para comprender la base genética de la progresión de la enfermedad ya que se observan patrones de expresión bien diferenciados que corresponden con diferentes zonas de activación dentro de la célula. Los estudios del genoma completo son importantes para aumentar la lista de factores que interaccionan entre el VIH y el huésped con el fin de encontrar nuevos candidatos para el tratamiento de la infección.

Capítulo 4

Análisis de las diferencias en la respuesta

Th17 y su relación con la progresión

4.1. INTRODUCCIÓN

Desde hace más de dos décadas se estableció lo que se conoce como paradigma de las células Th1-Th2, basado en que las células T CD4⁺ se diferencian funcionalmente en dos formas, la Th1 (del inglés T *helper* o colaboradora), que en respuesta a patógenos intracelulares genera principalmente una respuesta celular; y la Th2 que ante patógenos extracelulares ayuda a producir una respuesta humoral (Mosmann et al., 1986). Mucho más recientemente, en el año 2005, se demostró por primera vez que no sólo existen estas dos formas funcionales de las células T helper, sino que también se encuentran las denominadas Th17, un linaje diferente de Th1 y Th2 (Park et al., 2005; Harrington et al., 2005; Langrish et al., 2005). Este grupo de células se caracteriza por la producción de la interleukina 17, aunque está descrito que pueden secretar otro tipo de proteínas efectoras. Son importantes en la homeostasis intestinal donde participan en el control de infecciones bacterianas y fúngicas, tienen habilidad de reclutar neutrófilos y están relacionadas con la regeneración epitelial (Ye et al., 2001; Cooper, 2007; Maloy et al., 2008; von Vietinghoff et al., 2009; Freitas et al., 2009).

El papel que juega este tipo de células en la infección por VIH no está claro aún pero sí parece que existe una alta susceptibilidad de las células Th17 a la infección con VIH *in vitro*, lo que podría explicar la depleción de esta subpoblación celular tanto en la mucosa intestinal como en la sangre periférica de los pacientes infectados (Brenchley et al., 2008; Khaitan et al., 2009, Prendergast et al., 2010). Alternativamente, en la infección VIH, hay un mayor reclutamiento de células Th1 en aquellos tejidos donde existe mayor replicación viral (como el intestino), con la consiguiente producción de IFN- γ que posee un efecto inhibitor de la diferenciación a Th17 (Harrington et al., 2005). De cualquier

manera, la eliminación de esta subpoblación mediada por el VIH en el tejido linfoide asociado a intestino (en inglés *gut-associated lymphoid tissue, GALT*), afectaría a la barrera gastrointestinal produciendo un efecto deletéreo en el mantenimiento de la barrera mucosa, tanto inmunológico como estructural. Esto genera el paso de microbios intestinales, o productos microbianos como la molécula de lipopolisacárido (LPS) a través de la barrera intestinal, lo que contribuye a la activación sistémica del sistema inmunológico (Brenchley et al., 2006) que está directamente relacionada con la progresión de la enfermedad (Lawn et al., 2001).

En este estudio se ha evaluado el nivel de células Th17 (definidas como linfocitos T CD4+ IFN- IL17+) así como el nivel de expresión del receptor de IL17 en linfocitos de sangre periférica de pacientes LTNP y de pacientes progresores, con el fin de determinar si existen diferencias en este grupo de células que se relacionen con ambos fenotipos.

4.2. PACIENTES Y MÉTODOS

4.2.1. Pacientes

Del total de pacientes estudiados en el capítulo 3, se utilizaron 14 LTNP y 11 progresores típicos en este ensayo. Las muestras se corresponden con las usadas en el estudio de microarrays, donde, previamente al aislamiento de células T CD3+, se congelaron CMSPs. La exclusión de 6 muestras se debió a material insuficiente. En el momento del análisis, las CMSPs se descongelaron en baño de agua a 37°C y se resuspendieron en medio de cultivo completo R10 (RPMI conteniendo 10% de SBF, 2% de L-glutamina, 1% de penicilina/estreptomicina y 0.1% de gentamicina). La viabilidad de las células fue siempre superior al 85%.

4.2.2. Tinción en superficie para evaluar el nivel de expresión de IL17R en linfocitos T

Un millón de células fueron teñidas para la detección de marcadores de superficie incubando con los anticuerpos monoclonales anti-CD8-PECy5 (Immunotools, Alemania), anti-CD4-ECD (Beckmann-Coulter, CA, USA) y anti-IL17R-FITC (R&D Systems, MN, USA) durante 30 minutos a 4°C. Posteriormente las células fueron lavadas con 2 ml de PBS y resuspendidas en 250µl del mismo buffer para la adquisición en el citómetro de flujo de 5 colores Cytomics FC 500 (Beckman Coulter, Fullerton, CA) (Figura 4.1).

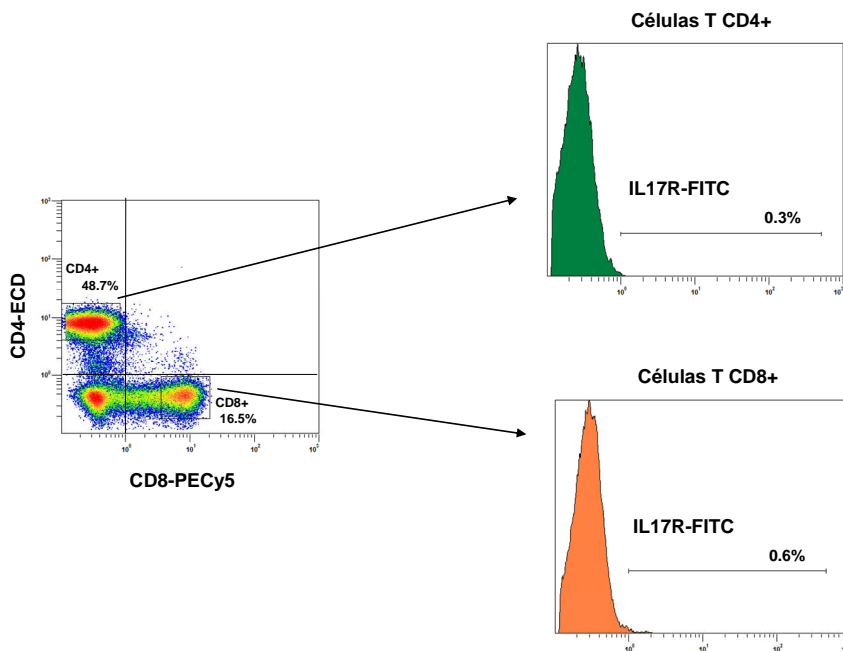


Figura 4.1. Ejemplo de imagen obtenida en la cuantificación de la expresión del receptor IL17R en la superficie de los linfocitos T CD4+ y CD8+.

4.2.3. Ensayo de producción intracelular de citoquinas IL17 e IFN γ

Se midieron dos funciones (producción de IFN γ e IL17) de las células T CD4+ y CD8+ en respuesta a la estimulación policlonal con PMA/ionomicina (Figura 4.2).

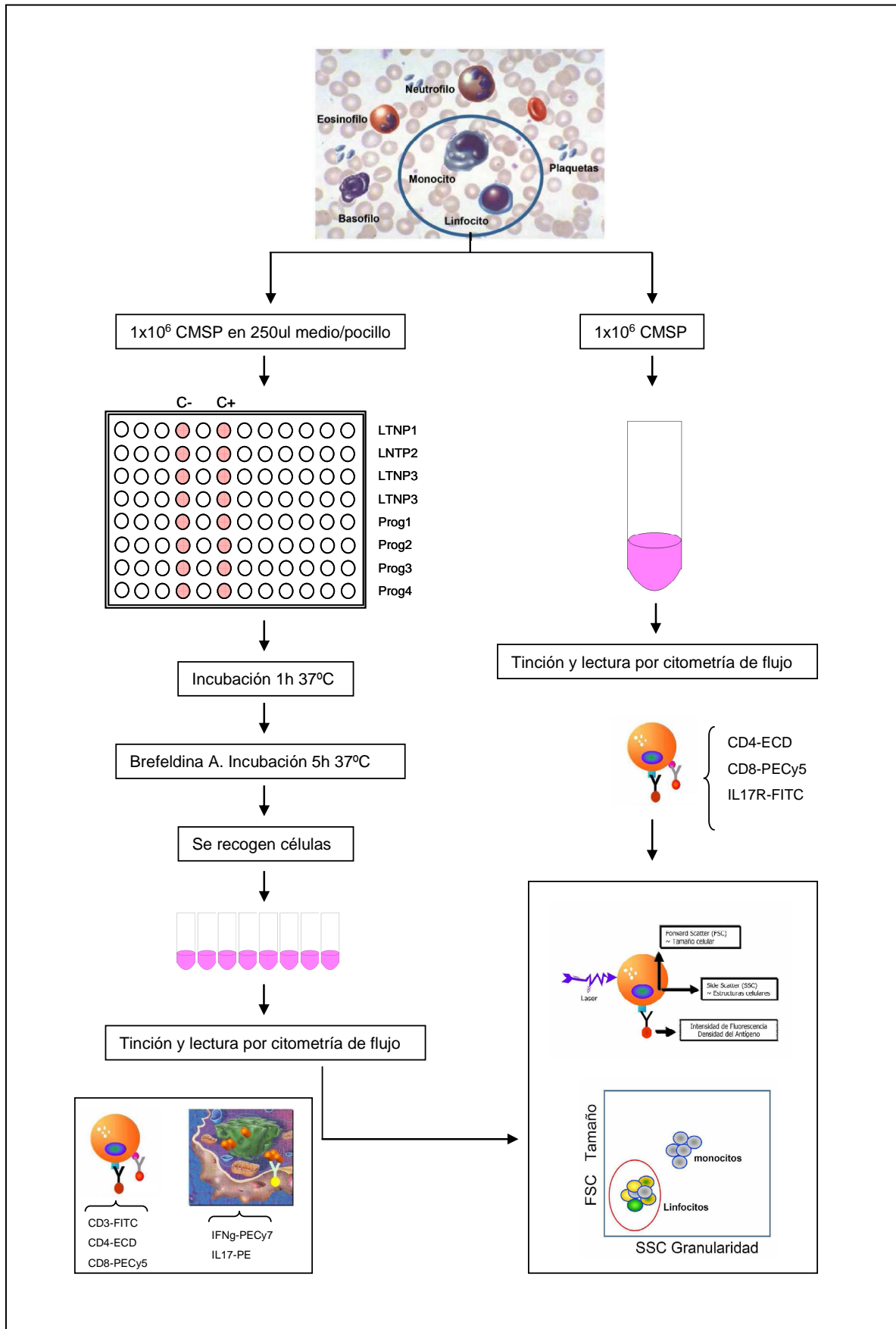


Figura 4.2. Procedimiento metodológico del estudio.

Las CMSPs fueron descongeladas, como se describió previamente, y un millón de ellas fueron incubadas en placas de 96 pocillos durante 6 horas a 37°C en 250 µl de medio de cultivo R10 con una concentración final de 50 ng/ml de PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate; SIGMA, Missouri, USA) y 1µM de ionomicina (SIGMA-ALDRICH, Madrid, España). Durante la segunda hora de incubación se añadió al cultivo Brefeldina A (GolgiPlug, 1µl/ml BD Biosciences, San Diego, CA) que inhibe la liberación de proteínas al medio extracelular. Se incluyeron como control negativo del experimento CMSPs sin ningún tipo de estímulo. Los ensayos se hicieron analizando en paralelo muestras de pacientes LTNP y progresores.

Después de la incubación, las células fueron recogidas y lavadas con 2 ml de PBS. Posteriormente fueron teñidas para la detección de marcadores de superficie incubando con los anticuerpos monoclonales anti-CD8-PECy5 (Immunotools, Alemania), anti-CD4-ECD (Beckmann-Coulter, CA, USA) y anti-CD3-FITC (Beckmann-Coulter, CA, USA) durante 30 minutos a 4°C. Posteriormente las células fueron lavadas con 2 ml de PBS y permeabilizadas con 250 µl de la solución Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences, San Diego, CA) durante 20 minutos a 4°C. Las células permeabilizadas fueron lavadas con 2 ml de la solución tampón Perm/Wash (BD Biosciences, San Diego, CA) y teñidas para la detección de marcadores intracelulares incubando durante 30 minutos a 4°C con los siguientes anticuerpos monoclonales: anti-IFN γ -PECy7 (BD Biosciences, San Diego, CA) y anti-IL17-PE (Cytognos, Salamanca, Spain).

Tras la tinción intracelular, las células fueron nuevamente lavadas con 2 ml de la solución tampón Perm/Wash y resuspendidas en 250 µl de PBS para la adquisición en el citómetro de flujo de 5 colores Cytomics FC 500 (Beckman Coulter, Fullerton, CA) (Figura 4.3).

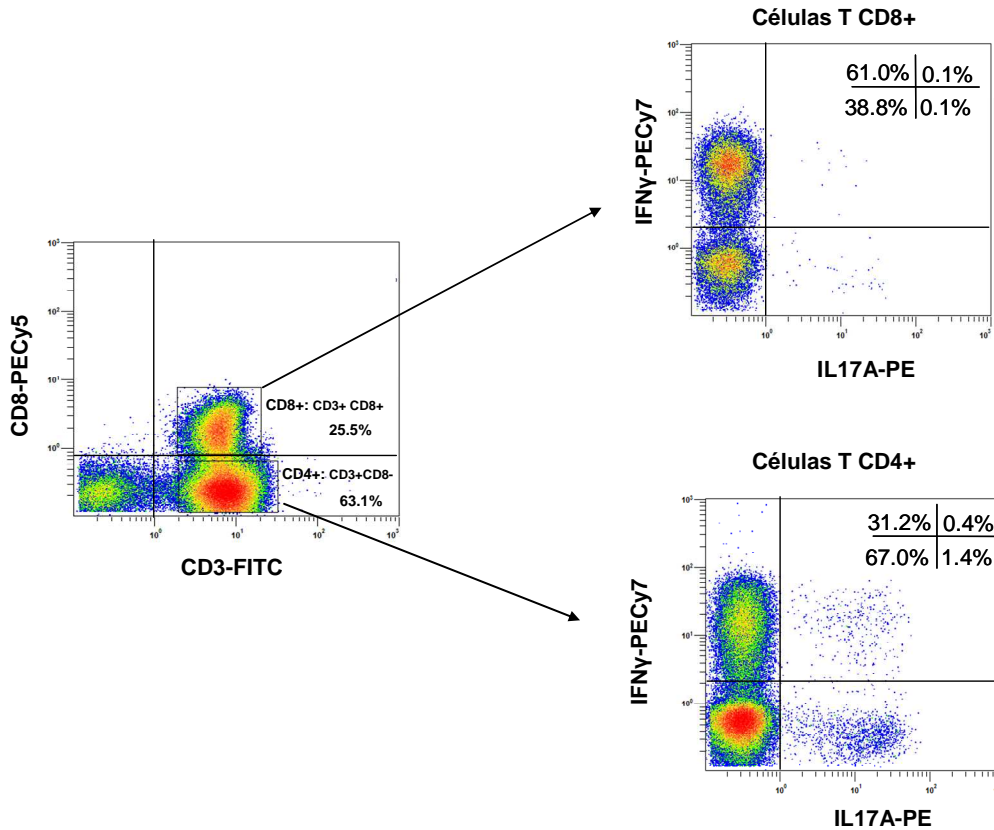


Figura 4.3. Ejemplo de imagen obtenida en la cuantificación de la producción de las moléculas IFN γ e IL17 por parte de los linfocitos T CD4+ y CD8+.

4.2.4. Análisis por citometría de flujo multiparamétrica

Para cada muestra se adquirieron un mínimo de 50.000 células T CD4+ y 50.000 células T CD8+. El análisis de los datos se realizó usando el software CXP (Beckman Coulter, Fullerton, CA). En el análisis del nivel de expresión del receptor de IL17 (IL17R) se seleccionaron las células CD4+ y CD8+ de alto brillo. Para el análisis de la producción intracelular de citoquinas se definieron las células T CD8+ como la subpoblación T CD3+CD8+ y las células T CD4+ como la subpoblación T CD3+CD8- debido a la intensa regulación a la baja de la molécula CD4 inducida por el estímulo con PMA e ionomicina. El porcentaje de células T CD8+ y de células T CD4+ que producían una o varias de las citoquinas estudiadas (IFN γ , IL17) o que expresaban el receptor IL17R fue evaluado. En

base a la producción de las dos citoquinas examinadas, se definieron tres subpoblaciones excluyentes de células T CD4⁺ y tres subpoblaciones excluyentes de células T CD8⁺ (IFN γ +IL17⁺, IFN γ -IL17⁺, IFN γ +IL17⁻). La subpoblación de células Th17 se definió como células T CD3⁺CD4⁺IFN γ -IL17⁺. A cada porcentaje se le restó el valor correspondiente al control negativo para medir la respuesta específica de estímulo. Todas las muestras consideradas presentaron producción de IFN γ en respuesta al estímulo, lo que se tomó como control interno del experimento.

4.2.5. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se realizó empleando el programa estadístico SPSS versión 15 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Dado que las variables estudiadas no seguían una distribución normal, los parámetros descriptivos se presentan como mediana [rango intercuartílico] y se utilizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney para contrastar las medianas.

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Descripción de los pacientes del estudio

Los pacientes de este estudio fueron seleccionados a partir de las cohortes utilizadas en el capítulo 3. En el subgrupo de pacientes empleados para este estudio, se mantienen las características anteriores (Tabla 4.1), existiendo diferentes patrones de infección entre los diferentes grupos, además de que las cargas virales son significativamente mayores en progresores típicos. El tiempo transcurrido desde el diagnóstico fue significativamente mayor en LTNP que en progresores típicos.

Tabla 4.1. Descripción de los pacientes del estudio.

Características	Pacientes (n=25)		Valor p
	LTNP (n=14)	Progresores (n=11)	
Sexo (nºhombres)	10 (71,4%)	10 (91%)	0,227
Edad (años)	42 [38-47]	32 [30-38]	0,002
Tiempo seguimiento (años)	17 [13,5-21]	1 [1-3]	<0,001
Grupo de riesgo			<0,001
ADPV	11 (78,6%)	1 (9,1%)	
HMSX	3 (21,4%)	13 (90,9%)	
HTSX			
CD4abs (cels/ul)	634 [434-731]	375 [294-783]	0,066
CD4%	32 [27-38]	22 [16-29]	0,110
LogCV (log copias/ml)	3,34[2,1-3,53]	4,48 [3,64-4,91]	0,002

NOTA. Los datos se presentan como mediana [rango intercuartílico]

4.3.2. Expresión de IL17R y producción de IL17 por células T CD4+ y CD8+

Se estudió la distribución del receptor IL17R y la producción de la citoquina IL17 en células T CD4+ y T CD8+ (Figura 4.4) en la población conjunta de pacientes. Así, se observó como el receptor IL17R se expresa en una mayor proporción en la superficie de células T CD8+ que en T CD4+ (0.40% [0.27-0.56] vs 0.20% [0.13-0.29] respectivamente, $p < 0.001$). Por el contrario, un porcentaje significativamente mayor de células T CD4+ producía únicamente IL17 en respuesta a estímulo con PMA/ionomicina (0.65% [0.40-0.97] vs 0.09% [0.07-0.13] en células T CD4+ y CD8+ respectivamente, $p < 0.001$).

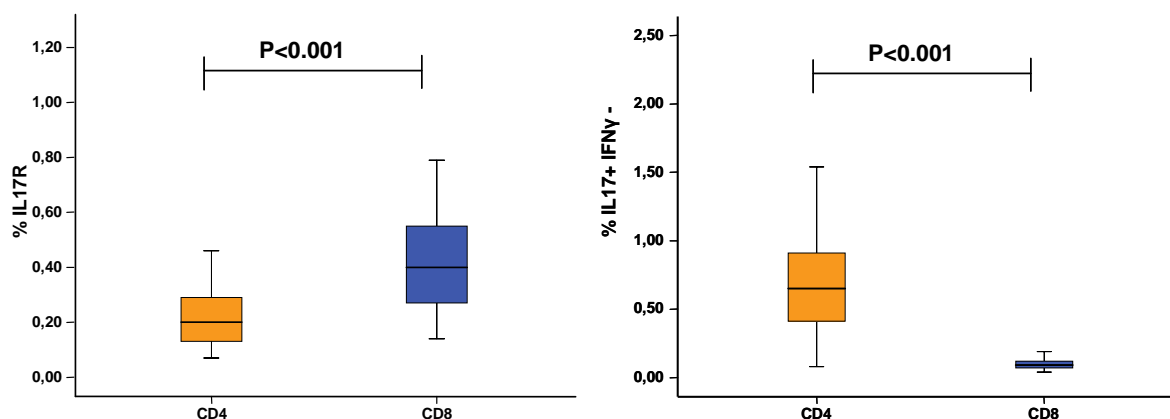


Figura 4.4. Diagramas de cajas representando el porcentaje de expresión de IL17R (gráfica izquierda) y de producción de IL17 (gráfica derecha) por células T CD4+ y CD8+.

4.3.3. Expresión diferencial de IL17R en LTNP y progresores

Se estudiaron las diferencias entre los dos grupos de pacientes en los patrones de expresión de la molécula IL17R en la superficie de los linfocitos T CD4+ y CD8+ (Figura 4.5). Los niveles de expresión de este receptor fueron similares en ambos grupos de pacientes tanto en células T CD4+ (0.22% [0.17-0.28] vs 0.14% [0.11-0.33] en LTNPs y progresores típicos respectivamente, $p=0.647$) como en células T CD8+ (0.39% [0.27-0.48] vs 0.44% [0.23-0.57] en LTNPs y progresores típicos respectivamente, $p=0.809$).

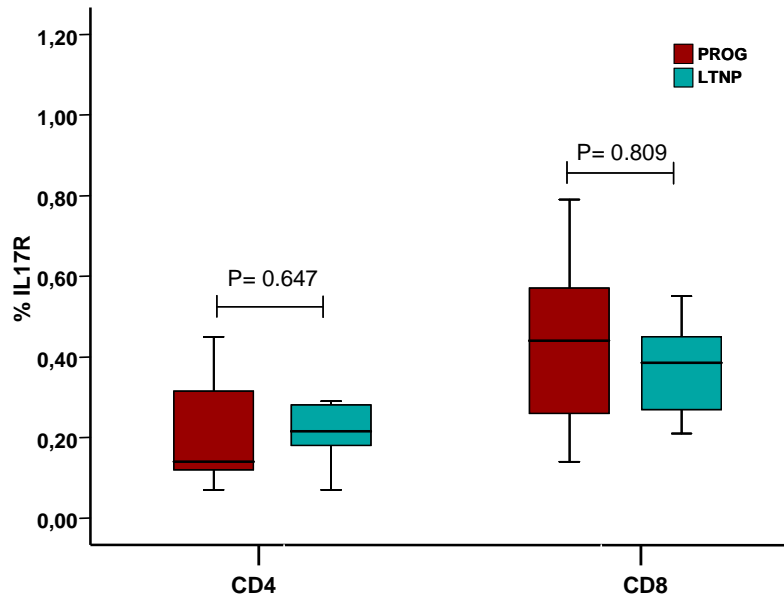


Figura 4.5. Diagramas de cajas representando los niveles de expresión de IL17R en LTNP y progresores típicos para células T CD4+ y CD8+.

4.3.4. Diferencias en la producción de IL17 entre LTNP y progresores

Se estudiaron tres subpoblaciones excluyentes de células T CD4+ y tres subpoblaciones excluyentes de células T CD8+, que incluían células que sintetizan ambas citoquinas en respuesta a estímulo (IFN γ +IL17+), las que producen sólo IL17 (IFN γ -IL17+) y las productoras únicamente de IFN γ (IFN γ +IL17-).

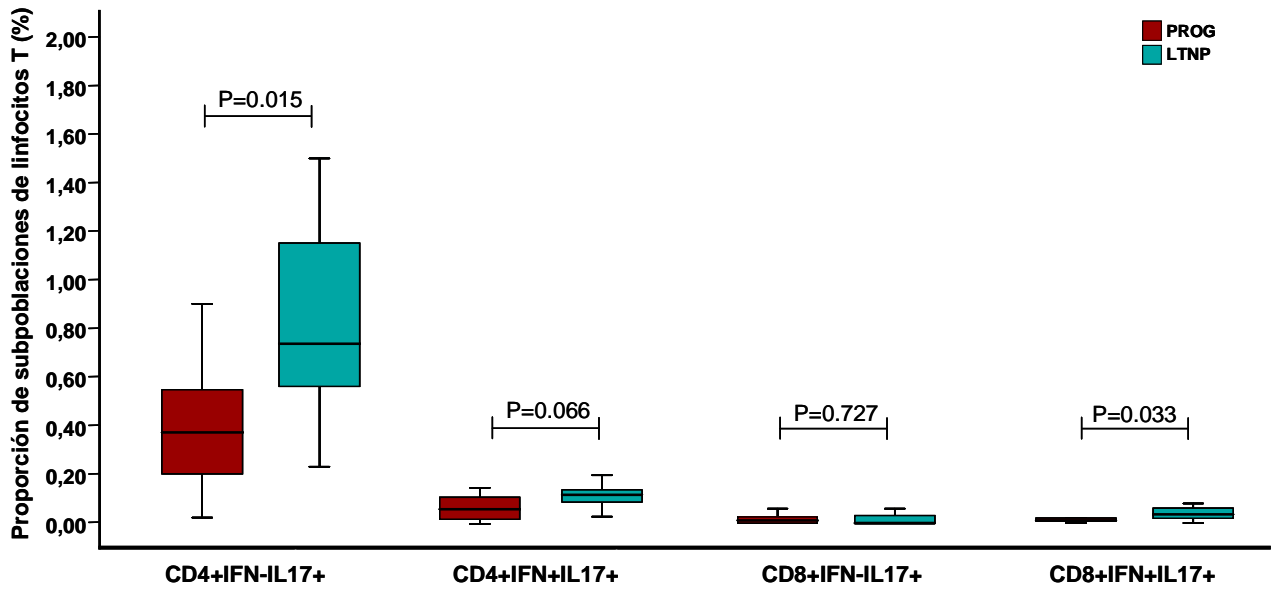


Figura 4.6. Diagramas de cajas representando los niveles en porcentaje de distintas subpoblaciones de células T en función de la producción de IL17 y de IFN- γ en LTNP y progresores típicos.

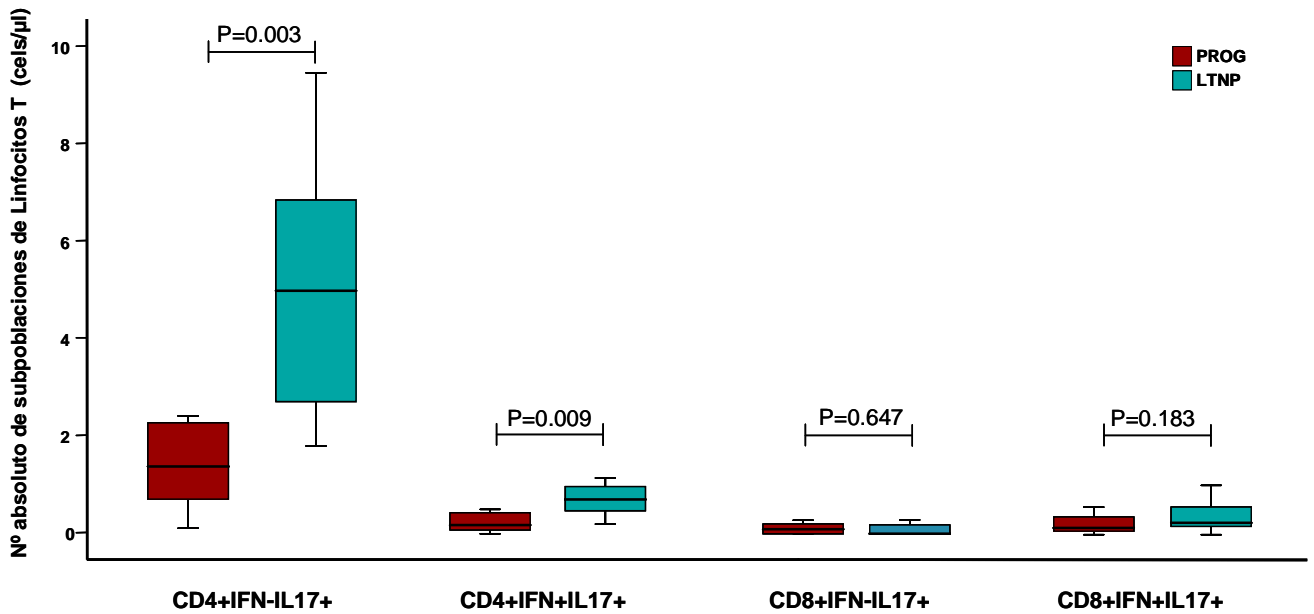


Figura 4.7. Diagramas de cajas representando los niveles en valores absolutos de distintas subpoblaciones de células T en función de la producción de IL17 y de IFN- γ en LTNP y progresores típicos.

Este último grupo de células se tomó como control de una correcta estimulación del experimento, no detectándose diferencias significativas en la subpoblación entre LTNP y progresores aunque sí una tendencia a una mayor producción de IFN γ en LTNP (CD4+: 25.5% [11.19-36.08] vs 11.2% [3.48-31.97] respectivamente, p=0.20; CD8+: 49.38% [24.30-56.51] vs 19.83% [2.57-56.92] respectivamente, p=0.29).

La subpoblación de células Th17 se definió como células T CD3+CD4+IFN γ -IL17+. En este estudio se observó un nivel significativamente mayor de estas células en el grupo de LTNP cuando se comparó con progresores típicos, tanto en el valor porcentual como en los valores absolutos de células (0.74% [0.54-1.20] vs 0.37% [0.20-0.63], respectivamente, p=0.015/ 4,97 cels/ μ l [2,67-7,08] vs 1,35 cels/ μ l [0,66-2,39] respectivamente, p=0.003) (Figura 4.6 y 4.7). Resultados similares se encontraron en la población de células T CD4+ que producían tanto IL17 como IFN γ , aunque esta población fue muy escasa en ambos grupos de pacientes (0.12% [0.09-0.16] vs 0.06% [0.02-0.12], respectivamente, p=0.066/ 0,70 cels/ μ l [0,46-1,02] vs 0,18 cels/ μ l [0,08-0,50] respectivamente, p=0.009). Las poblaciones de células T CD8+ que producen la molécula IL17 fueron minoritarias tanto en LTNPs como en progresores típicos no existiendo grandes diferencias entre ambos grupos de pacientes (Figura 4.6 y 4.7).

4.4. DISCUSIÓN

La infección crónica por VIH se caracteriza por una eliminación sistémica de células T CD4+ que comienza con la disminución masiva de estas células a nivel de mucosa gastrointestinal durante la fase aguda de la infección ([Guadalupe et al., 2003](#); [Brenchley et al., 2004](#)), lo que induce enteropatía y una mayor permeabilidad ([Lane et al., 1983](#); [Fahey, 1998](#)).

Una de las consecuencias de esta lesión es el paso de microorganismos a través de la barrera intestinal, además de productos microbianos con capacidad inmunoestimuladora, que activan directamente el sistema inmunológico *in vivo*, lo que es un predictor significativo de la progresión de la infección (Stein et al., 1997; Brenchley et al., 2006).

De la misma manera, se produce una pérdida de las células Th17 como consecuencia de la replicación viral en el intestino, pudiendo favorecer un estado de permisividad para la entrada masiva de patógenos, lo que resultaría en un posterior incremento de la activación inmunológica local y favorecimiento de la replicación viral en el intestino con lo que se crearía un círculo vicioso (Cecchinato et al., 2008). Además de la activación inmunológica a nivel local, el traspaso de la barrera mucosa conduciría con el tiempo a la activación a nivel sistémico (Brenchley et al., 2006) desembocando en la pérdida progresiva de los CD4 de todos los compartimentos y el desarrollo de sida (Cecchinato et al., 2008; Hofer et al., 2009).

En este estudio se ha caracterizado la producción la citoquina IL17 por células T, observándose que dicha citoquina es producida preferentemente por los linfocitos T CD4+, en concordancia con estudios previos que han empleado esta citoquina para definir la estirpe de células Th17 (Harrington et al., 2005), aunque esta subpoblación puede producir otras citoquinas tales como TNF- α , IL-6, IL-10, IL-21 e IL-22 (Volpe et al., 2008).

También se observó expresión del receptor de IL17 tanto en linfocitos T CD4+ como CD8+, lo que se corresponde con trabajos previos en los que se demuestra una distribución ubicua para esta molécula (Yao et al., 1997). Sin embargo los niveles de expresión fueron muy bajos en ambos tipos celulares, aunque los linfocitos T CD8+ expresaron niveles significativamente más altos que los linfocitos T CD4+. Esto es un hallazgo interesante que sugiere que una subpoblación de linfocitos T CD8+ podría ser diana de IL17. Por otro lado, la expresión de este receptor en células T CD4+ posiblemente

actúe como inhibidor de la producción de IL17 por dichas células mediante retroalimentación negativa, como se ha demostrado recientemente en un modelo murino (Smith et al., 2008a). Aunque en el presente estudio no se analizó la expresión de IL17R específicamente en células CD4⁺ productoras de IL17, los bajos niveles de expresión de IL17R observados en linfocitos T CD4⁺ sugieren que la expresión del receptor podría limitarse a las células Th17.

IL17R media la señalización a través de diferentes rutas, culminando en la activación de mediadores pro-inflamatorios que están normalmente asociados a la inmunidad innata, como el factor nuclear κ B (NF- κ B, revisado en Gaffen, 2009). En los resultados presentados, no se observaron diferencias en la expresión de este receptor en la membrana de los linfocitos T CD4⁺ ni CD8⁺ entre los grupos de LTNPs y progresores, con lo que no parece que la presencia del receptor sea un determinante de la progresión de la infección VIH.

Un estudio reciente (Brenchley et al., 2008) señala cómo las células Th17 están disminuidas preferentemente comparadas con células Th1 en el tracto gastrointestinal de pacientes VIH⁺. Además, estos mismos autores observan que en la infección por SIV no patogénica de monos *sooty mangabeys* (*Cercocebus atys*), se mantienen frecuencias normales de células Th17 tanto en tracto gastrointestinal como en sangre, a pesar de la existencia de una pérdida de células T CD4⁺ similar a la observada en la infección patogénica de los monos macacos rhesus (*Macaca mulatta*). Otro estudio similar, muestra cómo en macacos considerados controladores de elite se ven los mismos niveles de Th17 que en *sooty mangabeys* (*Cercocebus atys*) con infección no patogénica (Cecchinato et al., 2008). Al presentar esta última infección gran replicación pero no progresión clínica ni inmunológica, parece que el mantenimiento de determinados niveles de células Th17 podría ser importante para prevenir la progresión.

En base a estos resultados cabría esperar que los pacientes VIH+ que son capaces de prevenir espontáneamente la progresión de la infección mostrasen mayores niveles de células Th17 que los pacientes que progresan. Los resultados obtenidos en este estudio apoyan esta hipótesis ya que en los pacientes LTNPs se observó un mayor nivel de células Th17 en comparación con progresores típicos. Una mayor proporción de esta subpoblación en LTNPs podría ser un reflejo de una integridad estructural e inmunológica del tracto gastrointestinal más conservada, tal y como esta descrito en la infección no patogénica en monos *sooty mangabeys*. La pérdida sustancial de estas células en el tracto gastrointestinal de pacientes progresores, podría tener un efecto deletéreo en el mantenimiento de la barrera mucosa, tanto inmunológico como estructural, haciendo al paciente particularmente susceptible al fenómeno de entrada masiva de microorganismos a través de la barrera intestinal. Hasta la fecha sólo un artículo compara la producción por CMSPs de IL-17 en LTNP y pacientes progresores, no observando diferencias entre ellos (Yue et al., 2008), lo que contrasta con lo observado en el presente estudio. En el trabajo de Yue et al. emplean un estímulo policlonal diferente al usado en éste, además de no recoger el tiempo de infección de los pacientes, lo que podría dar cuenta de las diferencias. Otro estudio realizado en CMSP de niños VIH+ muestra que los niños con una viremia por debajo de 50 copias/mL tenían niveles de producción de IL17 detectables en contraste con los virémicos que tenían una secreción mínima (Ndhlovu et al., 2008). Estos resultados sugieren un importante papel para la replicación viral descontrolada en la eliminación de esta población celular.

Además, los resultados mostrados en este estudio muestran que la mayoría de células productoras de IL17 no producen IFN γ , tal y como estaba descrito previamente (Tomiyama et al., 2002; Singh et al., 2008). No está muy claro si las células productoras de IL-17 y las doble productoras de IL17 e IFN γ son diferentes grupos de células o si están

relacionadas en su desarrollo. En un estudio previo se observó que ambos grupos de células poseen capacidades funcionales similares tales como capacidad citotóxica, inhibición de esta capacidad por células T reguladoras y habilidad para cooperar con las células B (Annunziato et al., 2007). Se piensa que las células T CD4⁺ productoras de IFN γ y de IL17 podrían tener un linaje compartido con las que sólo producen IL17 ya que la molécula IL-23 parece que tiene un importante papel en la diferenciación de ambas poblaciones (Bettelli et al., 2005). Por tanto, la presencia de una pequeña proporción de la población celular que produce ambas citoquinas, podría ser únicamente el reflejo de un estadio previo de diferenciación en la ruta que conduce a las células Th17 completamente diferenciadas y caracterizadas por la producción de IL17 y la pérdida de IFN γ . Aun así, y a pesar de que el nivel de células productoras de ambas citoquinas es muy bajo, también se observaron diferencias entre LTNP y progresores en este estudio, de manera similar a lo ocurrido con la población Th17 completamente diferenciada.

En conclusión, en el presente estudio se ha caracterizado la producción de la molécula IL17 por parte de los linfocitos T así como la expresión de su receptor IL17R en la superficie de los mismos, observando cómo la IL17 es producida preferentemente por las células T CD4⁺, mientras que el receptor está en mayor proporción en los linfocitos T CD8⁺. Además, se han comparado estas moléculas entre diferentes fenotipos de progresión a sida, no observando diferencias en los patrones de expresión de IL17R entre LTNP y progresores. Por el contrario, existe una mayor cantidad de células Th17 en el grupo de LTNP, que probablemente se relacione con una barrera mucosa intestinal más conservada, y como consecuencia de esto, una atenuación de los mecanismos patogénicos desencadenados por el virus.

Conclusiones

1. No existen grandes anomalías en los genes del VIH codificantes para las proteínas accesorias en los pacientes LTNP que sugieran la presencia de virus defectivos como causa de la no progresión.
2. Los pacientes LTNP y progresores no presentan virus con diferencias relevantes en los genes accesorios *vif*, *vpr* y *vpu*.
3. Los factores genéticos protectores tienen un efecto acumulativo en el retraso de la progresión a sida.
4. La presencia del alelo HLA Cw1203 y en menor medida HLA B*5701 y el polimorfismo HLA C5' tuvieron un valor protector independiente, lo que sugiere que la inmunidad mediada por células, posiblemente a través del reconocimiento de HLA B y C, juega un papel predominante en la respuesta protectora frente al VIH.
5. Existen patrones de expresión genética diferentes en los pacientes LTNP en comparación con los progresores. Se observó una regulación del citoesqueleto y señalización celular de citoquinas más preservada y activa en LTNP, mientras que en progresores hay una mayor desregulación del ciclo celular.
6. La proteína IL17 es producida preferentemente por las células T CD4+, mientras que el receptor de la misma está en mayor proporción en los linfocitos T CD8+.
7. No se observan diferencias en los patrones de expresión de IL17R al comparar LTNP y progresores. Por el contrario, existe una mayor cantidad de células Th17 en el grupo de LTNP, que probablemente se relaciona con una mucosa intestinal más conservada y, como consecuencia, una atenuación de los mecanismos patogénicos desencadenados por el VIH.

Bibliografía

- Aiken, C, Krause, L, Chen, Y L, y Trono, D (1996). **Mutational analysis of HIV-1 Nef: identification of two mutants that are temperature-sensitive for CD4 downregulation.** *Virology*. 217:293-300.
- Al-Shahrour, F, Minguez, P, Vaquerizas, J M, Conde, L, y Dopazo, J (2005). **Babelomics: a suite of web-tools for functional annotation and analysis of group of genes in high-throughput experiments.** *Nucleic Acids Research*. 33:W460-W464.
- Al-Shahrour, F, Minguez, P, Tárraga, J, Montaner, D, Alloza, E et al. (2006). **BABELOMICS: a systems biology perspective in the functional annotation of genome-scale experiments.** *Nucleic Acids Research*. 34:W472-W476.
- Alexander, L, Weiskopf, E, Greenough, T C, Gaddis, N C, Auerbach, M R et al. (2000). **Unusual polymorphisms in human immunodeficiency virus type 1 associated with nonprogressive infection.** *J Virol*. 74:4361-4376.
- Ali, S, Huber, M, Kollwe, C, Bischoff, S C, Falk, W et al. (2007). **IL-1 receptor accessory protein is essential for IL-33-induced activation of T lymphocytes and mast cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:18660-18665.
- An, P, Nelson, G W, Wang, L, Donfield, S, Goedert, J J et al. (2002). **Modulating influence on HIV/AIDS by interacting RANTES gene variants.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:10002-10007.
- Annunziato, F, Cosmi, L, Santarlasci, V, Maggi, L, Liotta, F et al. (2007). **Phenotypic and functional features of human Th17 cells.** *J Exp Med*. 204:1849-1861.
- Bannert, N y Kurth, R (2004). **Retroelements and the human genome: new perspectives on an old relation.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101 Suppl 2:14572-14579.
- Barber, D L, Wherry, E J, Masopust, D, Zhu, B, Allison, J P et al. (2006). **Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection.** *Nature*. 439:682-687.
- Barre-Sinoussi, F, Chermann, J C, Rey, F, Nugeyre, M T, Chamaret, S et al. (1983). **Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS).** *Science*. 220:868-871.
- Benjamini, Y y Hochberg Y. (1995). **Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing.** *J R Statist Soc B*. 57:289-300.
- Bentham, M, Mazaleyrat, S, y Harris, M (2003). **The di-leucine motif in the cytoplasmic tail of CD4 is not required for binding to human immunodeficiency virus type 1 Nef, but is critical for CD4 down-modulation.** *J Gen Virol*. 84:2705-2713.
- Betelli, E y Kuchroo, V K (2005). **IL-12- and IL-23-induced T helper cell subsets: birds of the same feather flock together.** *J Exp Med*. 201:169-171.
- Betts, M R, Nason, M C, West, S M, De Rosa, S C, Migueles, S A et al. (2006). **HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells.** *Blood*. 107:4781-4789.

- Blaak, H, Boers, P H M, Gruters, R A, Schuitemaker, H, van der Ende, M E et al. (2005). **CCR5, GPR15, and CXCR6 are major coreceptors of human immunodeficiency virus type 2 variants isolated from individuals with and without plasma viremia.** *J Virol.* 79:1686-1700.
- Blanpain, C, Lee, B, Tackoen, M, Puffer, B, Boom, A et al. (2000). **Multiple nonfunctional alleles of CCR5 are frequent in various human populations.** *Blood.* 96:1638-1645.
- Bleiber, G, May, M, Martinez, R, Meylan, P, Ott, J et al. (2005). **Use of a combined ex vivo/in vivo population approach for screening of human genes involved in the human immunodeficiency virus type 1 life cycle for variants influencing disease progression.** *J Virol.* 79:12674-12680.
- Bolstad, B M (2001). **Probe level quantile normalization of high density oligonucleotide array data.** *Unpublished Manuscript: <http://bmbolstad.com/stuff/qnorm.pdf>.*
- Bolstad, B M, Irizarry, R A, Astrand, M, y Speed, T P (2003). **A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias.** *Bioinformatics.* 19:185-193.
- Bour, S y Strebel, K (2000). **HIV accessory proteins: multifunctional components of a complex system.** *Adv Pharmacol.* 48:75-7120.
- Brass, A L, Dykxhoorn, D M, Benita, Y, Yan, N, Engelman, A et al. (2008). **Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen.** *Science.* 319:921-926.
- Brenchley, J M, Paiardini, M, Knox, K S, Asher, A I, Cervasi, B et al. (2008). **Differential Th17 CD4 T-cell depletion in pathogenic and nonpathogenic lentiviral infections.** *Blood.* 112:2826-2835.
- Brenchley, J M, Price, D A, Schacker, T W, Asher, T E, Silvestri, G et al. (2006). **Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection.** *Nat Med.* 12:1365-1371.
- Brenchley, J M, Schacker, T W, Ruff, L E, Price, D A, Taylor, J H et al. (2004). **CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract.** *J Exp Med.* 200:749-759.
- Bukrinsky, M (2008). **How to engage Cofilin.** *Retrovirology.* 5:85-85.
- Bushman, F D, Malani, N, Fernandes, J, D'Orso, I, Cagney, G et al. (2009). **Host cell factors in HIV replication: meta-analysis of genome-wide studies.** *PLoS Pathog.* 5
- Caly, L, Saksena, N K, Piller, S C, y Jans, D A (2008). **Impaired nuclear import and viral incorporation of Vpr derived from a HIV long-term non-progressor.** *Retrovirology.* 5:67-67.

- Campbell, E M, Nunez, R, y Hope, T J (2004). **Disruption of the actin cytoskeleton can complement the ability of Nef to enhance human immunodeficiency virus type 1 infectivity.** *J Virol.* 78:5745-5755.
- Catano, G, Kulkarni, H, He, W, Marconi, V C, Agan, B K et al. (2008). **HIV-1 disease-influencing effects associated with ZNRD1, HCP5 and HLA-C alleles are attributable mainly to either HLA-A10 or HLA-B*57 alleles.** *PLoS ONE.* 3
- Cecchinato, V, Trindade, C J, Laurence, A, Heraud, J M, Brenchley, J M et al. (2008). **Altered balance between Th17 and Th1 cells at mucosal sites predicts AIDS progression in simian immunodeficiency virus-infected macaques.** *Mucosal Immunol.* 1:279-288.
- Chan, E Y, Qian, W J, Diamond, D L, Liu, T, Gritsenko, M A et al. (2007). **Quantitative analysis of human immunodeficiency virus type 1-infected CD4+ cell proteome: dysregulated cell cycle progression and nuclear transport coincide with robust virus production.** *J Virol.* 81:7571-7583.
- Cheng-Mayer, C, Iannello, P, Shaw, K, Luciw, P A, y Levy, J A (1989). **Differential effects of nef on HIV replication: implications for viral pathogenesis in the host.** *Science.* 246:1629-1632.
- Chun, T W, Justement, J S, Lempicki, R A, Yang, J, Dennis, G et al. (2003). **Gene expression and viral production in latently infected, resting CD4+ T cells in viremic versus aviremic HIV-infected individuals.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:1908-1913.
- Cohen, G B, Rangan, V S, Chen, B K, Smith, S, y Baltimore, D (2000). **The human thioesterase II protein binds to a site on HIV-1 Nef critical for CD4 down-regulation.** *J Biol Chem.* 275:23097-23105.
- Cooper, A M (2007). **IL-23 and IL-17 have a multi-faceted largely negative role in fungal infection.** *Eur J Immunol.* 37:2680-2682.
- Corbeil, J, Sheeter, D, Genini, D, Rought, S, Leoni, L et al. (2001). **Temporal gene regulation during HIV-1 infection of human CD4+ T cells.** *Genome Res.* 11:1198-1204.
- Dang, Y, Wang, X, Zhou, T, York, I A, y Zheng, Y H (2009). **Identification of a novel WxSLVK motif in the N terminus of human immunodeficiency virus and simian immunodeficiency virus Vif that is critical for APOBEC3G and APOBEC3F neutralization.** *J Virol.* 83:8544-8552.
- Das, S R y Jameel, S (2005). **Biology of the HIV Nef protein.** *Indian J Med Res.* 121:315-332.
- Deeks SG, W BD (2007). **Human immunodeficiency virus controllers: mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy.** *Immunity.* 27:406-16.
- Deeks, S y Walker, B D (2007). **Human immunodeficiency virus controllers: mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy.** *Immunity.* 27:406-16.

- Dolan, M J, Kulkarni, H, Camargo, J F, He, W, Smith, A et al. (2007). **CCL3L1 and CCR5 influence cell-mediated immunity and affect HIV-AIDS pathogenesis via viral entry-independent mechanisms.** *Nat Immunol.* 8:1324-1336.
- Douglas, J L, Viswanathan, K, McCarroll, M N, Gustin, J K, Fruh, K et al. (2009). **Vpu directs the degradation of the human immunodeficiency virus restriction factor BST-2/Tetherin via a β TrCP-dependent mechanism.** *J Virol.* 83:7931-7947.
- Emerman, M y Malim, M H (1998). **HIV-1 regulatory/accessory genes: keys to unraveling viral and host cell biology.** *Science.* 280:1880-1884.
- Eskild, A, Jonassen, T O, Heger, B, Samuelsen, S O, y Grinde, B (1998). **The estimated impact of the CCR-5 delta32 gene deletion on HIV disease progression varies with study design.** Oslo HIV Cohort Study Group. *AIDS.* 12:2271-2274.
- Evrard-Todeschi, N, Gharbi-Benarous, J, Bertho, G, Coadou, G, Megy, S et al. (2006). **NMR studies for identifying phosphopeptide ligands of the HIV-1 protein Vpu binding to the F-box protein β -TrCP.** *Peptides.* 27:194-210.
- Fackler, O T y Krausslich, H G (2006). **Interactions of human retroviruses with the host cell cytoskeleton.** *Curr Opin Microbiol.* 9:409-415.
- Fahey, J L (1998). **Cytokines, plasma immune activation markers, and clinically relevant surrogate markers in human immunodeficiency virus infection.** *Clin Diagn Lab Immunol.* 5:597-603.
- Fellay, J, Shianna, K V, Ge, D, Colombo, S, Ledergerber, B et al. (2007). **A whole-genome association study of major determinants for host control of HIV-1.** *Science.* 317:944-947.
- Flores-Villanueva, P O, Hendel, H, Caillat-Zucman, S, Rappaport, J, Burgos-Tiburcio, A et al. (2003). **Associations of MHC ancestral haplotypes with resistance/susceptibility to AIDS disease development.** *J Immunol.* 170:1925-1929.
- Fortin, J F, Cantin, R, Lamontagne, G, y Tremblay, M (1997). **Host-derived ICAM-1 glycoproteins incorporated on human immunodeficiency virus type 1 are biologically active and enhance viral infectivity.** *J Virol.* 71:3588-3596.
- Franceschi, C, Franceschini, M G, Boschini, A, Trenti, T, Nuzzo, C et al. (1997). **Phenotypic characteristics and tendency to apoptosis of peripheral blood mononuclear cells from HIV+ long term non progressors.** *Cell Death Differ.* 4:815-823.
- Freitas, A, ves-Filho, J C, Victoni, T, Secher, T, Lemos, H P et al. (2009). **IL-17 receptor signaling is required to control polymicrobial sepsis.** *J Immunol.* 182:7846-7854.
- Freund, J, Kellner, R, Konvalinka, J, Wolber, V, Krausslich, H G et al. (1994). **A possible regulation of negative factor (Nef) activity of human immunodeficiency virus type 1 by the viral protease.** *Eur J Biochem.* 223:589-593.

- Fu, W, Sanders-Beer, B E, Katz, K S, Maglott, D R, Pruitt, K D et al. (2009). **Human immunodeficiency virus type 1, human protein interaction database at NCBI.** *Nucleic Acids Res.* 37:417-422.
- Fujita, M, Sakurai, A, Yoshida, A, Miyaura, M, Koyama, A H et al. (2003). **Amino acid residues 88 and 89 in the central hydrophilic region of human immunodeficiency virus type 1 Vif are critical for viral infectivity by enhancing the steady-state expression of Vif.** *J Virol.* 77:1626-1632.
- Gaffen, S L (2009). **Structure and signalling in the IL-17 receptor family.** *Nat Rev Immunol.* 9:556-567.
- Gandhi, S K, Siliciano, J D, Bailey, J R, Siliciano, R F, y Blankson, J N (2008). **Role of APOBEC3G/F-mediated hypermutation in the control of human immunodeficiency virus type 1 in elite suppressors.** *J Virol.* 82:3125-3130.
- Giri, M S, Nebozhyn, M, Showe, L, y Montaner, L J (2006). **Microarray data on gene modulation by HIV-1 in immune cells: 2000-2006.** *J Leukoc Biol.* 80:1031-1043.
- Goff, S P (2007). **Host factors exploited by retroviruses.** *Nat Rev Microbiol.* 5:253-263.
- Gonzalez, E, Kulkarni, H, Bolivar, H, Mangano, A, Sanchez, R et al. (2005). **The influence of CCL3L1 gene-containing segmental duplications on HIV-1/AIDS susceptibility.** *Science.* 307:1434-1440.
- Grossman, Z, Meier-Schellersheim, M, Paul, W E, y Picker, L J (2006). **Pathogenesis of HIV infection: what the virus spares is as important as what it destroys.** *Nat Med.* 12:289-295.
- Guadalupe, M, Reay, E, Sankaran, S, Prindiville, T, Flamm, J et al. (2003). **Severe CD4+ T-cell depletion in gut lymphoid tissue during primary human immunodeficiency virus type 1 infection and substantial delay in restoration following highly active antiretroviral therapy.** *J Virol.* 77:11708-11717.
- Harrington, L E, Hatton, R D, Mangan, P R, Turner, H, Murphy, T L et al. (2005). **Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages.** *Nat Immunol.* 6:1123-1132.
- Harris, M (1995). **The role of myristoylation in the interactions between human immunodeficiency virus type I Nef and cellular proteins.** *Biochem Soc Trans.* 23:557-561.
- Harris, R S y Liddament, M T (2004). **Retroviral restriction by APOBEC proteins.** *Nat Rev Immunol.* 4:868-877.
- He, Z, Zhang, W, Chen, G, Xu, R, y Yu, X F (2008). **Characterization of conserved motifs in HIV-1 Vif required for APOBEC3G and APOBEC3F interaction.** *J Mol Biol.* 381:1000-1011.

Hendel, H, Caillat-Zucman, S, Lebuane, H, Carrington, M, O'Brien, S et al. (1999). **New class I and II HLA alleles strongly associated with opposite patterns of progression to AIDS.** *J Immunol.* 162:6942-6946.

Hofer, U y Speck, R (2009). **Disturbance of the gut-associated lymphoid tissue is associated with disease progression in chronic HIV infection.** *Semin Immunopathol.*

Holmes, R K, Malim, M H, y Bishop, K N (2007). **APOBEC-mediated viral restriction: not simply editing?** *Trends Biochem Sci.* 32:118-128.

Huang, Y, Paxton, W A, Wolinsky, S M, Neumann, A U, Zhang, L et al. (1996). **The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression.** *Nat Med.* 2:1240-1243.

Hycza, M D, Kovacs, C, Loutfy, M, Halpenny, R, Heisler, L et al. (2007). **Distinct transcriptional profiles in ex vivo CD4+ and CD8+ T cells are established early in human immunodeficiency virus type 1 infection and are characterized by a chronic interferon response as well as extensive transcriptional changes in CD8+ T cells.** *J Virol.* 81:3477-3486.

Imbeault, M, Ouellet, M, y Tremblay, M (2009). **Microarray study reveals that HIV-1 induces rapid type-I interferon-dependent p53 mRNA up-regulation in human primary CD4+ T cells.** *Retrovirology.* 6:5-5.

Irving, S G, Zipfel, P F, Balke, J, McBride, O W, Morton, C C et al. (1990). **Two inflammatory mediator cytokine genes are closely linked and variably amplified on chromosome 17q.** *Nucleic Acids Res.* 18:3261-3270.

Jiao, Y, Fu, J, Xing, S, Fu, B, Zhang, Z et al. (2008). **The decrease of regulatory T cells correlates with excessive activation and apoptosis of CD8(+) T cells in HIV-1-infected typical progressors, but not in long-term non-progressors.** *Immunology.*

Jin, X, Wu, H, y Smith, H (2007). **APOBEC3G levels predict rates of progression to AIDS.** *Retrovirology.* 4:20-20.

Kaslow, R A, Carrington, M, Apple, R, Park, L, Munoz, A et al. (1996). **Influence of combinations of human major histocompatibility complex genes on the course of HIV-1 infection.** *Nat Med.* 2:405-411.

Kemal, K S, Beattie, T, Dong, T, Weiser, B, Kaul, R et al. (2008). **Transition from long-term nonprogression to HIV-1 disease associated with escape from cellular immune control.** *J Acquir Immune Defic Syndr.* 48:119-126.

Khaitan, A, Kozhaya, A, Manel, N, Kozhaya, L, Daskalakis, D et al. (2009). **Perturbation of Human Th17 Cells in HIV Infection.** *16th Conference of Retroviruses and Opportunistic Infections.* 8-11 Febrero. Montreal

Kiepiela, P, Leslie, A J, Honeyborne, I, Ramduth, D, Thobakgale, C et al. (2004). **Dominant influence of HLA-B in mediating the potential co-evolution of HIV and HLA.** *Nature.* 432:769-775.

- Kiepiela, P, Ngumbela, K, Thobakgale, C, Ramduth, D, Honeyborne, I et al. (2007). **CD8+ T-cell responses to different HIV proteins have discordant associations with viral load.** *Nat Med.* 13:46-53.
- Kirchhoff, F, Greenough, T C, Brettler, D B, Sullivan, J L, y Desrosiers, R C (1995). **Brief report: absence of intact nef sequences in a long-term survivor with nonprogressive HIV-1 infection.** *N Engl J Med.* 332:228-232.
- Klotman, M E y Chang, T L (2006). **Defensins in innate antiviral immunity.** *Nat Rev Immunol.* 6:447-456.
- Konig, R, Zhou, Y, Elleder, D, Diamond, T L, Bonamy, G M et al. (2008). **Global analysis of host-pathogen interactions that regulate early-stage HIV-1 replication.** *Cell.* 135:49-60.
- Kootstra, N A, Navis, M, Beugeling, C, van Dort, K A, y Schuitemaker, H (2007). **The presence of the Trim5alpha escape mutation H87Q in the capsid of late stage HIV-1 variants is preceded by a prolonged asymptomatic infection phase.** *AIDS.* 21:2015-2023.
- Korber, B T M, Brander, C, Haynes, B F, Koup, R A, Moore, J P et al. (2007). **HIV Molecular Immunology 2006/2007.** *Los Alamos National Laboratory, Theoretical Biology and Biophysics, Los Alamos, New Mexico.*
- Kulkarni, H, Marconi, V C, Agan, B K, McArthur, C, Crawford, G et al. (2008). **Role of CCL3L1-CCR5 genotypes in the epidemic spread of HIV-1 and evaluation of vaccine efficacy.** *PLoS ONE.* 3
- Lama, J y Planelles, V (2007). **Host factors influencing susceptibility to HIV infection and AIDS progression.** *Retrovirology.* 4
- Lambotte, O, Boufassa, F, Madec, Y, Nguyen, A, Goujard, C et al. (2005). **HIV controllers: a homogeneous group of HIV-1-infected patients with spontaneous control of viral replication.** *Clin Infect Dis.* 41:1053-1056.
- Land, A M, Ball, T B, Luo, M, Pilon, R, Sandstrom, P et al. (2008). **Human immunodeficiency virus (HIV) type 1 proviral hypermutation correlates with CD4 count in HIV-infected women from Kenya.** *J Virol.* 82:8172-8182.
- Lane, H C, Masur, H, Edgar, L C, Whalen, G, Rook, A H et al. (1983). **Abnormalities of B-cell activation and immunoregulation in patients with the acquired immunodeficiency syndrome.** *N Engl J Med.* 309:453-458.
- Langrish, C L, Chen, Y, Blumenschein, W M, Mattson, J, Basham, B et al. (2005). **IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation.** *J Exp Med.* 201:233-240.
- Lawn, S D, Butera, S T, y Folks, T M (2001). **Contribution of immune activation to the pathogenesis and transmission of human immunodeficiency virus type 1 infection.** *Clin Microbiol Rev.* 14:753-777.

Le Rouzic, E y Benichou, S (2005). **The Vpr protein from HIV-1: distinct roles along the viral life cycle.** *Retrovirology*. 2:11-11.

Learmont, J, Tindall, B, Evans, L, Cunningham, A, Cunningham, P et al. (1992). **Long-term symptomless HIV-1 infection in recipients of blood products from a single donor.** *Lancet*. 340:863-867.

Levy, J A (1993). **Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection.** *Microbiol Rev*. 57:183-289.

Li, L, Li, H S, Pauza, C D, Bukrinsky, M, y Zhao, R Y (2005). **Roles of HIV-1 auxiliary proteins in viral pathogenesis and host-pathogen interactions.** *Cell Res*. 15:923-934.

Limou, S, Le Clerc, S, Coulonges, C, Carpentier, W, Dina, C et al. (2009). **Genomewide association study of an AIDS-nonprogression cohort emphasizes the role played by HLA genes (ANRS Genomewide Association Study 02).** *J Infect Dis*. 199:419-426.

Liu, L X, Heveker, N, Fackler, O T, Arold, S, Le Gall, S et al. (2000). **Mutation of a conserved residue (D123) required for oligomerization of human immunodeficiency virus type 1 Nef protein abolishes interaction with human thioesterase and results in impairment of Nef biological functions.** *J Virol*. 74:5310-5319.

Liu, Y, Belkina, N V, y Shaw, S (2009). **HIV infection of T cells: actin-in and actin-out.** *Sci Signal*. 2

Liu, Z, Cumberland, W G, Hultin, L E, Prince, H E, Detels, R et al. (1997). **Elevated CD38 antigen expression on CD8+ T cells is a stronger marker for the risk of chronic HIV disease progression to AIDS and death in the Multicenter AIDS Cohort Study than CD4+ cell count, soluble immune activation markers, or combinations of HLA-DR and CD38 expression.** *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirology*. 16:83-92.

Lopez, M, Soriano, V, Lozano, S, Ballesteros, C, Cascajero, A et al. (2008). **No major differences in the functional profile of HIV Gag and Nef-specific CD8+ responses between long-term nonprogressors and typical progressors.** *AIDS Res Hum Retroviruses*. 24:1185-1195.

López-Galíndez, C (2009). **Claves patogénicas en LTNPs.** *Presentado en I Congreso GeSIDA, 21-24 Octubre 2009, Madrid.*

Lu, T C, He, J C, Wang, Z H, Feng, X, Fukumi-Tominaga, T et al. (2008). **HIV-1 Nef disrupts the podocyte actin cytoskeleton by interacting with diaphanous interacting protein.** *J Biol Chem*. 283:8173-8182.

Luban, J (2007). **Cyclophilin A, TRIM5, and resistance to human immunodeficiency virus type 1 infection.** *J Virol*. 81:1054-1061.

Lum, J J, Cohen, O J, Nie, Z, Weaver, J G, Gomez, T S et al. (2003). **Vpr R77Q is associated with long-term nonprogressive HIV infection and impaired induction of apoptosis.** *J Clin Invest*. 111:1547-1554.

- Luo, K, Wang, T, Liu, B, Tian, C, Xiao, Z et al. (2007). **Cytidine deaminases APOBEC3G and APOBEC3F interact with human immunodeficiency virus type 1 integrase and inhibit proviral DNA formation.** *J Virol.* 81:7238-7248.
- Ma, X Y, Sova, P, Chao, W, y Volsky, D J (1994). **Cysteine residues in the Vif protein of human immunodeficiency virus type 1 are essential for viral infectivity.** *J Virol.* 68:1714-1720.
- Macreadie, I G, Castelli, L A, Hewish, D R, Kirkpatrick, A, Ward, A C et al. (1995). **A domain of human immunodeficiency virus type 1 Vpr containing repeated H(S/F)RIG amino acid motifs causes cell growth arrest and structural defects.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:2770-2774.
- Mahalanabis, M, Jayaraman, P, Miura, T, Pereyra, F, Chester, E M et al. (2009). **Continuous viral escape and selection by autologous neutralizing antibodies in drug-naïve human immunodeficiency virus controllers.** *J Virol.* 83:662-672.
- Mahalingam, S, Ayyavoo, V, Patel, M, Kieber-Emmons, T, y Weiner, D B (1997). **Nuclear import, virion incorporation, and cell cycle arrest/differentiation are mediated by distinct functional domains of human immunodeficiency virus type 1 Vpr.** *J Virol.* 71:6339-6347.
- Mahalingam, S, Khan, S A, Jabbar, M A, Monken, C E, Collman, R G et al. (1995). **Identification of residues in the N-terminal acidic domain of HIV-1 Vpr essential for virion incorporation.** *Virology.* 207:297-302.
- Malim, M H y Emerman, M (2008). **HIV-1 accessory proteins--ensuring viral survival in a hostile environment.** *Cell Host Microbe.* 3:388-398.
- Maloy, K J y Kullberg, M C (2008). **IL-23 and Th17 cytokines in intestinal homeostasis.** *Mucosal Immunol.* 1:339-349.
- Mangano, A, Kopka, J, Batalla, M, Bologna, R, y Sen, L (2000). **Protective effect of CCR2-64I and not of CCR5-delta32 and SDF1-3'A in pediatric HIV-1 infection.** *J Acquir Immune Defic Syndr.* 23:52-57.
- Margottin, F, Bour, S P, Durand, H, Selig, L, Benichou, S et al. (1998). **A novel human WD protein, h-beta TrCp, that interacts with HIV-1 Vpu connects CD4 to the ER degradation pathway through an F-box motif.** *Mol Cell.* 1:565-574.
- Marsh, S G E, Parham, P, y Barber, L D (2000). **The HLA FactsBook.**
- Martinez, V, Costagliola, D, Bonduelle, O, N'go, N, Schnuriger, A et al. (2005). **Combination of HIV-1-specific CD4 Th1 cell responses and IgG2 antibodies is the best predictor for persistence of long-term nonprogression.** *J Infect Dis.* 191:2053-2063.
- Masciotra, S, Owen, S M, Rudolph, D, Yang, C, Wang, B et al. (2002). **Temporal relationship between V1V2 variation, macrophage replication, and coreceptor adaptation during HIV-1 disease progression.** *AIDS.* 16:1887-1898.

- Matarrese, P y Malorni, W (2005). **Human immunodeficiency virus (HIV)-1 proteins and cytoskeleton: partners in viral life and host cell death.** *Cell Death Differ.* 12 Suppl 1:932-941.
- Matthews, P C, Prendergast, A, Leslie, A, Crawford, H, Payne, R et al. (2008). **Central role of reverting mutations in HLA associations with human immunodeficiency virus set point.** *J Virol.* 82:8548-8559.
- Michael, N L, Chang, G, d'Arcy, L A, Ehrenberg, P K, Mariani, R et al. (1995). **Defective accessory genes in a human immunodeficiency virus type 1-infected long-term survivor lacking recoverable virus.** *J Virol.* 69:4228-4236.
- Migueles, S A, Sabbaghian, M S, Shupert, W L, Bettinotti, M P, Marincola, F M et al. (2000). **HLA B*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:2709-2714.
- Migueles, S y Connors, M (2002). **The Role of CD4(+) and CD8(+) T Cells in Controlling HIV Infection.** *Curr Infect Dis Rep.* 4:461-467.
- Mitchell, R S, Katsura, C, Skasko, M A, Fitzpatrick, K, Lau, D et al. (2009). **Vpu antagonizes BST-2-mediated restriction of HIV-1 release via beta-TrCP and endolysosomal trafficking.** *PLoS Pathog.* 5
- Miura, T, Brockman, M A, Brumme, C J, Brumme, Z L, Carlson, J M et al. (2008a). **Genetic characterization of human immunodeficiency virus type 1 in elite controllers: lack of gross genetic defects or common amino acid changes.** *J Virol.* 82:8422-8430.
- Miura, T, Brockman, M A, Schneidewind, A, Lobritz, M, Pereyra, F et al. (2008b). **HLA-B57/B*5801 HIV-1 elite controllers select for rare gag variants associated with reduced viral replication capacity and strong CTL recognition.** *J Virol.*
- Mofenson, L M, Brady, M T, Danner, S P, Dominguez, K L, Hazra, R et al. (2009). **Guidelines for the Prevention and Treatment of Opportunistic Infections among HIV-exposed and HIV-infected children: recommendations from CDC, the National Institutes of Health, the HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America, the Pediatric Infectious Diseases Society, and the American Academy of Pediatrics.** *MMWR Recomm Rep.* 58:1-166.
- Mologni, D, Citterio, P, Menzaghi, B, Zanone Poma, B, Riva, C et al. (2006). **Vpr and HIV-1 disease progression: R77Q mutation is associated with long-term control of HIV-1 infection in different groups of patients.** *AIDS.* 20:567-574.
- Morawetz, R A, Rizzardi, G P, Glauser, D, Rutschmann, O, Hirschel, B et al. (1997). **Genetic polymorphism of CCR5 gene and HIV disease: the heterozygous (CCR5/delta ccr5) genotype is neither essential nor sufficient for protection against disease progression. Swiss HIV Cohort.** *Eur J Immunol.* 27:3223-3227.
- Mosmann, T R, Cherwinski, H, Bond, M W, Giedlin, M A, y Coffman, R L (1986). **Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins.** *J Immunol.* 175:5-14.

- Na, Y S, Yoon, K, Nam, J G, Choi, B, Lee, J S et al. (2004). **Nef from a primary isolate of human immunodeficiency virus type 1 lacking the EE(155) region shows decreased ability to down-regulate CD4.** *J Gen Virol.* 85:1451-1461.
- Naghavi, M H y Goff, S P (2007). **Retroviral proteins that interact with the host cell cytoskeleton.** *Curr Opin Immunol.* 19:402-407.
- Nakajima, T, Ohtani, H, Naruse, T, Shibata, H, Mimaya, J I et al. (2007). **Copy number variations of CCL3L1 and long-term prognosis of HIV-1 infection in asymptomatic HIV-infected Japanese with hemophilia.** *Immunogenetics.* 59:793-798.
- Navarro, F y Landau, N R (2004). **Recent insights into HIV-1 Vif.** *Curr Opin Immunol.* 16:477-482.
- Ndhlovu, L C, Chapman, J M, Jha, A R, Snyder-Cappione, J E, Pagan, M et al. (2008). **Suppression of HIV-1 plasma viral load below detection preserves IL-17 producing T cells in HIV-1 infection.** *AIDS.* 22:990-992.
- Neil, S J D, Zang, T, y Bieniasz, P D (2008). **Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu.** *Nature.* 451:425-430.
- Nicholas, K B, cholas, H B J, y erfield, D W (1997). **GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation.** *EMBNEW NEWS* 4:14.
- Pace, C, Keller, J, Nolan, D, James, I, Gaudieri, S et al. (2006). **Population level analysis of human immunodeficiency virus type 1 hypermutation and its relationship with APOBEC3G and vif genetic variation.** *J Virol.* 80:9259-9269.
- Pantaleo, G, Graziosi, C, y Fauci, A S (1993). **New concepts in the immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection.** *N Engl J Med.* 328:327-335.
- Pantaleo, G, Menzo, S, Vaccarezza, M, Graziosi, C, Cohen, O J et al. (1995). **Studies in subjects with long-term nonprogressive human immunodeficiency virus infection.** *N Engl J Med.* 332:209-216.
- Park, H, Li, Z, Yang, X O, Chang, S H, Nurieva, R et al. (2005). **A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17.** *Nat Immunol.* 6:1133-1141.
- Perez-Caballero, D, Zang, T, Ebrahimi, A, McNatt, M W, Gregory, D A et al. (2009). **Tetherin inhibits HIV-1 release by directly tethering virions to cells.** *Cell.* 139:499-511.
- Piantadosi, A, Humes, D, Chohan, B, McClelland, R S, y Overbaugh, J (2009). **Analysis of the percentage of human immunodeficiency virus type 1 sequences that are hypermutated and markers of disease progression in a longitudinal cohort, including one individual with a partially defective Vif.** *J Virol.* 83:7805-7814.
- Piguet, V, Wan, L, Borel, C, Mangasarian, A, Demareux, N et al. (2000). **HIV-1 Nef protein binds to the cellular protein PACS-1 to downregulate class I major histocompatibility complexes.** *Nat Cell Biol.* 2:163-167.

- Pinney, J W, Dickerson, J E, Fu, W, Sanders-Beer, B E, Ptak, R G et al. (2009). **HIV-host interactions: a map of viral perturbation of the host system.** *AIDS*. 23:549-554.
- Plantier, J C, Leoz, M, Dickerson, J E, De Oliveira, F, Cordonnier, F et al. (2009). **A new human immunodeficiency virus derived from gorillas.** *Nat Med*. 15:871-872.
- Prendergast, A, Prado, J G, Kang, Y H, Chen, F, Riddell, L A et al. (2010). **HIV-1 infection is characterized by profound depletion of CD161+ Th17 cells and gradual decline in regulatory T cells.** *AIDS*.
- Ptak, R G, Fu, W, Sanders-Beer, B E, Dickerson, J E, Pinney, J W et al. (2008). **Cataloguing the HIV type 1 human protein interaction network.** *AIDS Res Hum Retroviruses*. 24:1497-1502.
- R Development Core Team (2006). **R: A language and environment for statistical computing.** *R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria ISBN 3-900051-07-0 URL: www R-project com.*
- Ramirez de Arellano, E, Martin, C, Soriano, V, Alcami, J, y Holguin, A (2007). **Genetic analysis of the long terminal repeat (LTR) promoter region in HIV-1-infected individuals with different rates of disease progression.** *Virus Genes*. 34:111-116.
- Rangel, H R, Garzaro, D, Rodriguez, A K, Ramirez, A H, Ameli, G et al. (2009). **Deletion, insertion and stop codon mutations in vif genes of HIV-1 infecting slow progressor patients.** *J Infect Dev Ctries*. 3:531-538.
- Reynes, J, Portales, P, Segondy, M, Baillat, V, Andre, P et al. (2001). **CD4 T cell surface CCR5 density as a host factor in HIV-1 disease progression.** *AIDS*. 15:1627-1634.
- Rodes, B, Toro, C, Paxinos, E, Poveda, E, Martinez-Padial, M et al. (2004). **Differences in disease progression in a cohort of long-term non-progressors after more than 16 years of HIV-1 infection.** *AIDS*. 18:1109-1116.
- Rose, P P y Korber, B T (2000). **Detecting hypermutations in viral sequences with an emphasis on G --> A hypermutation.** *Bioinformatics*. 16:400-401.
- Rosenberg, E S, Billingsley, J M, Caliendo, A M, Boswell, S L, Sax, P E et al. (1997). **Vigorous HIV-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia.** *Science*. 278:1447-1450.
- Saksela, K, Cheng, G, y Baltimore, D (1995). **Proline-rich (PxxP) motifs in HIV-1 Nef bind to SH3 domains of a subset of Src kinases and are required for the enhanced growth of Nef+ viruses but not for down-regulation of CD4.** *EMBO J*. 14:484-491.
- Saksena, N K, Rodes, B, Wang, B, y Soriano, V (2007). **Elite HIV controllers: myth or reality?** *AIDS Rev*. 9:195-207.
- Samson, M, Libert, F, Doranz, B J, Rucker, J, Liesnard, C et al. (1996). **Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene.** *Nature*. 382:722-725.

- Sankaran, S, Reay, E, George, M D, Flamm, J, Prindiville, T et al. (2005). **Gut mucosal T cell responses and gene expression correlate with protection against disease in long-term HIV-1-infected nonprogressors.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:9860-9865.
- Sawai, E T, Baur, A S, Peterlin, B M, Levy, J A, y Cheng-Mayer, C (1995). **A conserved domain and membrane targeting of Nef from HIV and SIV are required for association with a cellular serine kinase activity.** *J Biol Chem.* 270:15307-15314.
- Schinkel, J, Langendam, M W, Coutinho, R A, Krol, A, Brouwer, M et al. (1999). **No evidence for an effect of the CCR5 delta32/+ and CCR2b 64I/+ mutations on human immunodeficiency virus (HIV)-1 disease progression among HIV-1-infected injecting drug users.** *J Infect Dis.* 179:825-831.
- Schmitt, K, Hill, M S, Ruiz, A, Culley, N, Pinson, D M et al. (2009). **Mutations in the highly conserved SLQYLA motif of Vif in a simian-human immunodeficiency virus result in a less pathogenic virus and are associated with G-to-A mutations in the viral genome.** *Virology.* 383:362-372.
- Schmitz, J E, Kuroda, M J, Santra, S, Sasseville, V G, Simon, M A et al. (1999). **Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes.** *Science.* 283:857-860.
- Schrofelbauer, B, Chen, D, y Landau, N R (2004). **A single amino acid of APOBEC3G controls its species-specific interaction with virion infectivity factor (Vif).** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:3927-3932.
- Schwartz, D H, Viscidi, R, Laeyendecker, O, Song, H, Ray, S C et al. (1996). **Predominance of defective proviral sequences in an HIV + long-term non-progressor.** *Immunol Lett.* 51:3-6.
- Seelamgari, A, Maddukuri, A, Berro, R, de la Fuente, C, Kehn, K et al. (2004). **Role of viral regulatory and accessory proteins in HIV-1 replication.** *Front Biosci.* 9:2388-2413.
- Sempere, J M, Soriano, V, y Benito, J M (2007). **T regulatory cells and HIV infection.** *AIDS Rev.* 9:54-60.
- Shalekoff, S, Meddows-Taylor, S, Schramm, D B, Donninger, S L, Gray, G E et al. (2008). **Host CCL3L1 gene copy number in relation to HIV-1-specific CD4+ and CD8+ T-cell responses and viral load in South African women.** *J Acquir Immune Defic Syndr.* 48:245-254.
- Sheehy, A M, Gaddis, N C, Choi, J D, y Malim, M H (2002). **Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein.** *Nature.* 418:646-650.
- Shen, A, Puente, L G, y Ostergaard, H L (2005). **Tyrosine kinase activity and remodelling of the actin cytoskeleton are co-temporally required for degranulation by cytotoxic T lymphocytes.** *Immunology.* 116:276-286.

- Sidney, J, Peters, B, Frahm, N, Brander, C, y Sette, A (2008). **HLA class I supertypes: a revised and updated classification.** *BMC Immunol.* 9:1-1.
- Simon, V, Zennou, V, Murray, D, Huang, Y, Ho, D D et al. (2005). **Natural variation in Vif: differential impact on APOBEC3G/3F and a potential role in HIV-1 diversification.** *PLoS Pathog.* 1
- Sinclair, A, Yarranton, S, y Schelcher, C (2006). **DNA-damage response pathways triggered by viral replication.** *Expert Rev Mol Med.* 8:1-11.
- Singh, S P, Zhang, H H, Foley, J F, Hedrick, M N, y Farber, J M (2008). **Human T cells that are able to produce IL-17 express the chemokine receptor CCR6.** *J Immunol.* 180:214-221.
- Smith, E, Stark, M A, Zarbock, A, Burcin, T L, Bruce, A C et al. (2008b). **IL-17A inhibits the expansion of IL-17A-producing T cells in mice through "short-loop" inhibition via IL-17 receptor.** *J Immunol.* 181:1357-1364.
- Smith, E, Stark, M A, Zarbock, A, Burcin, T L, Bruce, A C et al. (2008a). **IL-17A inhibits the expansion of IL-17A-producing T cells in mice through "short-loop" inhibition via IL-17 receptor.** *J Immunol.* 181:1357-1364.
- Smith, K A, Lachman, L B, Oppenheim, J J, y Favata, M F (1980). **The functional relationship of the interleukins.** *J Exp Med.* 151:1551-1556.
- Smyth, G K (2005). **Limma: linear models for microarray data.** Springer:397-420.
- Smyth, G K (2004). **Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments.** *Stat Appl Genet Mol Biol.* 3:Article 3-
- Sodora, D L y Silvestri, G (2008). **Immune activation and AIDS pathogenesis.** *AIDS.* 22:439-446.
- Soriano, V, Martin, R, del Romero, J, Castilla, J, Bru, F et al. (1996). **[Rapid and slow progression of the infection by the type 1 human immunodeficiency virus in a population of seropositive subjects in Madrid].** *Med Clin (Barc).* 107:761-766.
- Stein, T P, Koerner, B, Schluter, M D, Leskiw, M J, Gaprindachvilli, T et al. (1997). **Weight loss, the gut and the inflammatory response in aids patients.** *Cytokine.* 9:143-147.
- Stephens, H A F (2005). **HIV-1 diversity versus HLA class I polymorphism.** *Trends Immunol.* 26:41-47.
- Stephens, J C, Reich, D E, Goldstein, D B, Shin, H D, Smith, M W et al. (1998). **Dating the origin of the CCR5-Delta32 AIDS-resistance allele by the coalescence of haplotypes.** *Am J Hum Genet.* 62:1507-1515.
- Stewart, G J, Ashton, L J, Biti, R A, Ffrench, R A, Bennetts, B H et al. (1997). **Increased frequency of CCR-5 delta 32 heterozygotes among long-term non-progressors with**

HIV-1 infection. The Australian Long-Term Non-Progressor Study Group. *AIDS*. 11:1833-1838.

Strebel, K, Luban, J, y Jeang, K T (2009). **Human cellular restriction factors that target HIV-1 replication. *BMC Med*. 7:48-48.**

Stremlau, M, Song, B, Javanbakht, H, Perron, M, y Sodroski, J (2006). **Cyclophilin A: an auxiliary but not necessary cofactor for TRIM5alpha restriction of HIV-1. *Virology*. 351:112-120.**

Tamura, K, Dudley, J, Nei, M, y Kumar, S (2007). **MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*. 24:1596-1599.**

Thomas, R, Apps, R, Qi, Y, Gao, X, Male, V et al. (2009). **HLA-C cell surface expression and control of HIV/AIDS correlate with a variant upstream of HLA-C. *Nat Genet*. 41:1290-1294.**

Tian, C, Yu, X, Zhang, W, Wang, T, Xu, R et al. (2006). **Differential requirement for conserved tryptophans in human immunodeficiency virus type 1 Vif for the selective suppression of APOBEC3G and APOBEC3F. *J Virol*. 80:3112-3115.**

Tolstrup, M, Ostergaard, L, Laursen, A L, Pedersen, S F, y Duch, M (2004). **HIV/SIV escape from immune surveillance: focus on Nef. *Curr HIV Res*. 2:141-151.**

Tomiyama, H, Matsuda, T, y Takiguchi, M (2002). **Differentiation of human CD8(+) T cells from a memory to memory/effector phenotype. *J Immunol*. 168:5538-5550.**

Townson, J R, Barcellos, L F, y Nibbs, R J B (2002). **Gene copy number regulates the production of the human chemokine CCL3-L1. *Eur J Immunol*. 32:3016-3026.**

Trachtenberg, E, Bhattacharya, T, Ladner, M, Phair, J, Erlich, H et al. (2009). **The HLA-B/-C haplotype block contains major determinants for host control of HIV. *Genes Immun*.**

Trachtenberg, E, Korber, B, Sollars, C, Kepler, T B, Hraber, P T et al. (2003). **Advantage of rare HLA supertype in HIV disease progression. *Nat Med*. 9:928-935.**

Ulenga, N K, Sarr, A D, Hamel, D, Sankale, J L, Mboup, S et al. (2008). **The level of APOBEC3G (hA3G)-related G-to-A mutations does not correlate with viral load in HIV type 1-infected individuals. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 24:1285-1290.**

UNAIDS (2008). **Report on the Global AIDS epidemic. *www.unaids.com*.**

Vahey, M T, Nau, M E, Jagodzinski, L L, Yalley-Ogunro, J, Taubman, M et al. (2002). **Impact of viral infection on the gene expression profiles of proliferating normal human peripheral blood mononuclear cells infected with HIV type 1 RF. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 18:179-192.**

van Manen, D, Kootstra, N A, Boeser-Nunnink, B, Handulle, M A, van't Wout, A B et al. (2009). **Association of HLA-C and HCP5 gene regions with the clinical course of HIV-1 infection. *AIDS*. 23:19-28.**

- Vasan, A, Renjifo, B, Hertzmark, E, Chaplin, B, Msamanga, G et al. (2006). **Different rates of disease progression of HIV type 1 infection in Tanzania based on infecting subtype.** *Clin Infect Dis.* 42:843-852.
- Volpe, E, Servant, N, Zollinger, R, Bogiatzi, S I, Hupe, P et al. (2008). **A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses.** *Nat Immunol.* 9:650-657.
- von Vietinghoff, S y Ley, K (2009). **IL-17A controls IL-17F production and maintains blood neutrophil counts in mice.** *J Immunol.* 183:865-873.
- Walker, B D (2007). **Elite control of HIV Infection: implications for vaccines and treatment.** *Top HIV Med.* 15:134-136.
- Wang, B, Mikhail, M, Dyer, W B, Zaunders, J J, Kelleher, A D et al. (2003). **First demonstration of a lack of viral sequence evolution in a nonprogressor, defining replication-incompetent HIV-1 infection.** *Virology.* 312:135-150.
- Wei, X, Decker, J M, Wang, S, Hui, H, Kappes, J C et al. (2003). **Antibody neutralization and escape by HIV-1.** *Nature.* 422:307-312.
- Wilkinson, D A, Operskalski, E A, Busch, M P, Mosley, J W, y Koup, R A (1998). **A 32-bp deletion within the CCR5 locus protects against transmission of parenterally acquired human immunodeficiency virus but does not affect progression to AIDS-defining illness.** *J Infect Dis.* 178:1163-1166.
- Winkler, C, Modi, W, Smith, M W, Nelson, G W, Wu, X et al. (1998). **Genetic restriction of AIDS pathogenesis by an SDF-1 chemokine gene variant. ALIVE Study, Hemophilia Growth and Development Study (HGDS), Multicenter AIDS Cohort Study (MACS), Multicenter Hemophilia Cohort Study (MHCS), San Francisco City Cohort (SFCC).** *Science.* 279:389-393.
- Wright, J F, Bennett, F, Li, B, Brooks, J, Luxenberg, D P et al. (2008). **The human IL-17F/IL-17A heterodimeric cytokine signals through the IL-17RA/IL-17RC receptor complex.** *J Immunol.* 181:2799-2805.
- Wu, J Q, Dwyer, D E, Dyer, W B, Yang, Y H, Wang, B et al. (2008). **Transcriptional profiles in CD8+ T cells from HIV+ progressors on HAART are characterized by coordinated up-regulation of oxidative phosphorylation enzymes and interferon responses.** *Virology.* 380:124-135.
- Xu, Y, Zhu, H, Wilcox, C K, Van't Wout, A, Andrus, T et al. (2008). **Blood Monocytes Harbor HIV Type 1 Strains with Diversified Phenotypes Including Macrophage-Specific CCR5 Virus.** *J Infect Dis.* 197:309-318.
- Yamashita, T, Kamada, K, Hatcho, K, Adachi, A, y Nomaguchi, M (2008). **Identification of amino acid residues in HIV-1 Vif critical for binding and exclusion of APOBEC3G/F.** *Microbes Infect.* 10:1142-1149.
- Yao, Z, Spriggs, M K, Derry, J M, Strockbine, L, Park, L S et al. (1997). **Molecular characterization of the human interleukin (IL)-17 receptor.** *Cytokine.* 9:794-800.

Ye, P, Rodriguez, F H, Kanaly, S, Stocking, K L, Schurr, J et al. (2001). **Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense.** *J Exp Med.* 194:519-527.

Yu, X, Yu, Y, Liu, B, Luo, K, Kong, W et al. (2003). **Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex.** *Science.* 302:1056-1060.

Yue, F Y, Merchant, A, Kovacs, C M, Loutfy, M, Persad, D et al. (2008). **Virus-specific interleukin-17-producing CD4+ T cells are detectable in early human immunodeficiency virus type 1 infection.** *J Virol.* 82:6767-6771.

Zhang, L, Huang, Y, Yuan, H, Tuttleton, S, y Ho, D D (1997). **Genetic characterization of vif, vpr, and vpu sequences from long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection.** *Virology.* 228:340-349.

Zhang, Z, Schuler, T, Zupancic, M, Wietgreffe, S, Staskus, K A et al. (1999). **Sexual transmission and propagation of SIV and HIV in resting and activated CD4+ T cells.** *Science.* 286:1353-1357.

Zhou, H, Xu, M, Huang, Q, Gates, A T, Zhang, X D et al. (2008). **Genome-scale RNAi screen for host factors required for HIV replication.** *Cell Host Microbe.* 4:495-504.

Anexo I

Anexo I. Resultados del análisis del grado de hipermutación que presentan las secuencias de: a) Vpr; b) Vif; c) Vpu y d) Nef. En las tablas se expresa el nº de sitios con hipermutación generada por la proteína APOBEC3G con la significación asociada.

b) Vpr

Paciente	Nº sitios con hipermutación	Valor p (Test Fisher)
C1	2	0.971702
C3	0	1
C4	1	0.990195
C6	2	0.740153
C7	4	0.986377
C9	2	0.978594
C11	3	0.906392
C14	1	0.999037
C15	0	1
C18	1	0.997676
C19	1	0.996612
C20	2	0.990407
NP1	1	0.902392
NP2	0	1
NP6	0	1
NP9	22	0.083131
NP12	1	0.89378
NP17	2	0.891913
NP19	1	0.808271
NP20	1	0.996529
NP21	0	1
NP23	0	1
NP24	0	1
NP25	0	1
NP27	1	0.979594
NP28	1	0.956472

a) Vif

Paciente	Nº sitios con hipermutación	Valor p (Test Fisher)
C1	7	0.625275
C3	6	0.325264
C4	5	0.563425
C6	6	0.663493
C8	4	0.795583
C9	6	0.503821
C11	4	0.514895
C14	6	0.094503
C15	3	0.702783
C16	6	0.810479
C18	8	0.424750
C19	4	0.539433
C20	6	0.503821
NP1	4	0.815341
NP2	3	0.68265
NP3	5	0.238676
NP5	1	0.932638
NP6	7	0.0930116
NP7	3	0.469126
NP9	6	0.503821
NP10	3	0.825868
NP11	3	0.48938
NP12	2	0.823577
NP13	6	0.144837
NP14	7	0.192827
NP16	4	0.539433
NP17	4	0.30705
NP19	5	0.203128
NP20	5	0.398979
NP21	3	0.809343
NP23	7	0.192827
NP24	3	0.825868
NP25	4	0.298899
NP29	4	0.318597
NP35	3	0.674388
NP34	3	0.702783

c) Vpu

Paciente	Nº sitios con hipermutación	Valor p (Test Fisher)
C1	1	0.977978
C4	0	1
C6	4	0.537108
C7	3	0.96399
C8	2	0.870721
C9	3	0.679448
C11	1	0.993923
C13	1	0.738095
C15	2	0.922048
C16	2	0.657509
C20	3	0.881941
NP1	1	0.89322
NP2	1	0.931092
NP3	2	0.769072
NP5	2	0.769072
NP6	1	0.836538
NP8	3	0.679448
NP10	7	0.116746
NP12	6	0.324042
NP16	2	0.769072
NP19	2	0.932223
NP20	1	0.862607
NP25	2	0.65546
NP27	2	0.607165
NP35	4	0.609715
NP36	1	0.836538

d) Nef

Paciente	N° sitios con hipermutación	Valor p (Test Fisher)
NP1	5	0.771181
NP2	5	0.804314
NP3	4	0.717508
NP4	3	0.806036
NP6	3	0.942198
NP7	4	0.387047
NP8	5	0.540987
NP9	2	0.896388
NP10	3	0.829948
NP12	4	0.827853
NP13	4	0.905567
NP14	3	0.682701
NP15	2	0.977843
NP16	4	0.963575
NP17	4	0.827853
NP18	5	0.601674
NP19	3	0.867957
NP20	7	0.204278
NP21	3	0.925655
NP22	4	0.973475
NP23	4	0.728768
NP24	4	0.572033
NP27	3	0.863638
NP28	4	0.71091
NP29	2	0.923212
NP31	5	0.601674
NP32	5	0.340065
NP34	7	0.414236
NP36	3	0.883546

Anexo II

Anexo II. Lista de genes sobre-expresados en el grupo de pacientes LTNP y progresores respectivamente.

LTNP		
Identificación sonda Agilent	Símbolo gen según Entrez	Gen
A_23_P9415	ACO1	aconitase 1, soluble
A_24_P122862	AFTPH	aftiphilin
A_24_P72518	AHCYL2	S-adenosylhomocysteine hydrolase-like 2
A_23_P1759	AMICA1	adhesion molecule, interacts with CXADR antigen 1
A_24_P92952	ARID1A	AT rich interactive domain 1A (SWI-like)
A_23_P217872	ARID1A	AT rich interactive domain 1A (SWI-like)
A_23_P166640	ARL6IP5	ADP-ribosylation-like factor 6 interacting protein 5
A_24_P161973	ATP11A	ATPase, class VI, type 11A
A_23_P120048	BAZ2B	bromodomain adjacent to zinc finger domain, 2B
A_23_P147495	BCORL1	BCL6 co-repressor-like 1
A_24_P753161	BMPR2	bone morphogenetic protein receptor, type II (serine/threonine kinase)
A_23_P53763	C13orf18	chromosome 13 open reading frame 18
A_24_P85200	C14orf43	chromosome 14 open reading frame 43
A_24_P184937	C16orf44	chromosome 16 open reading frame 44
A_24_P130363	C18orf1	chromosome 18 open reading frame 1
A_23_P170399	C4orf41	chromosome 4 open reading frame 41
A_23_P79426	CAB39	calcium binding protein 39
A_24_P69379	CASD1	CAS1 domain containing 1
A_24_P942002	CENTB2	centaurin, beta 2
A_23_P111452	CENTG3	centaurin, gamma 3
A_24_P56240	CPNE8	copine VIII
A_24_P140171	CRTAP	cartilage associated protein
A_23_P59657	CUL1	cullin 1
A_24_P303589	CUL1	cullin 1
A_24_P220454	CUX1	cut-like homeobox 1
A_23_P22660	CYSLTR1	cysteinyl leukotriene receptor 1
A_24_P942250	CHD9	chromodomain helicase DNA binding protein 9
A_23_P259438	DCK	deoxycytidine kinase
A_24_P89080	DCK	deoxycytidine kinase
A_23_P71526	DDEF1	development and differentiation enhancing factor 1
A_24_P49411	DEF8	differentially expressed in FDCP 8 homolog (mouse)
A_24_P261417	DKK3	dickkopf homolog 3 (Xenopus laevis)
A_23_P162047	DKK3	dickkopf homolog 3 (Xenopus laevis)
A_23_P135548	DPYD	dihydropyrimidine dehydrogenase
A_23_P43988	DPYD	dihydropyrimidine dehydrogenase
A_23_P360379	EGLN3	egl nine homolog 3 (C. elegans)
A_23_P78092	EVI2A	ecotropic viral integration site 2A
A_23_P66694	EVI2B	ecotropic viral integration site 2B
A_32_P35303	EVI5	ecotropic viral integration site 5
A_24_P941505	FAM120A	family with sequence similarity 120A
A_23_P213247	FBXL5	F-box and leucine-rich repeat protein 5
A_23_P117527	FBXO34	F-box protein 34
A_32_P115535	FBXO9	F-box protein 9
A_23_P92349	FGFRL1	fibroblast growth factor receptor-like 1
A_23_P61531	GLB1	galactosidase, beta 1
A_23_P6943	GPR15	G protein-coupled receptor 15

LTNP (Continuación)		
Identificación sonda Agilent	Símbolo gen según Entrez	Gen
A_24_P364066	HIPK3	homeodomain interacting protein kinase 3
A_32_P49211	HOOK3	hook homolog 3 (Drosophila)
A_23_P92954	HSD17B4	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 4
A_23_P17706	IL17RA	interleukin 17 receptor A
A_23_P170857	IL1RAP	interleukin 1 receptor accessory protein
A_24_P497186	IRF2BP2	interferon regulatory factor 2 binding protein 2
A_23_P436266	KIAA0515	KIAA0515
A_23_P107552	KIAA1012	KIAA1012
A_24_P49447	KIAA1432	KIAA1432
A_23_P121527	KLHL5	kelch-like 5 (Drosophila)
A_23_P324994	KLHL7	kelch-like 7 (Drosophila)
A_23_P81660	LMBRD1	LMBR1 domain containing 1
A_23_P388670	LTA4H	leukotriene A4 hydrolase
A_23_P327022	MDFIC	MyoD family inhibitor domain containing
A_23_P206347	METTL9	methyltransferase like 9
A_24_P255516	MIA3	melanoma inhibitory activity family, member 3
A_23_P476	MPZL1	myelin protein zero-like 1
A_23_P62128	MTM1	myotubularin 1
A_23_P62133	MTM1	myotubularin 1
A_24_P364072	NA	NA
A_23_P117546	NA	NA
A_23_P23705	NA	NA
A_24_P722068	NA	NA
A_24_P630875	NA	NA
A_24_P564396	NA	NA
A_32_P128661	NA	NA
A_32_P185682	NA	NA
A_23_P402751	NA	NA
A_24_P938465	NA	NA
A_32_P129894	NA	NA
A_32_P184417	NA	NA
A_32_P134556	NA	NA
A_24_P256692	NA	NA
A_23_P32593	NA	NA
A_24_P310756	NA	NA
A_24_P232763	NA	NA
A_32_P92751	NA	NA
A_23_P91076	NA	NA
A_23_P113317	NA	NA
A_24_P479510	NA	NA
A_32_P161455	NA	NA
A_24_P283221	NAIP	NLR family, apoptosis inhibitory protein
A_23_P84836	NPEPPS	aminopeptidase puromycin sensitive
A_24_P153511	OSBPL8	oxysterol binding protein-like 8
A_23_P2705	P2RY5	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 5
A_32_P61684	PAG1	phosphoprotein associated with glycosphingolipid microdomains 1
A_24_P339944	PDGFB	platelet-derived growth factor beta polypeptide (simian sarcoma viral (v-sis) oncogene homolog)

LTNP (Continuación)		
Identificación sonda Agilent	Símbolo gen según Entrez	Gen
A_23_P66219	PDPK1	3-phosphoinositide dependent protein kinase-1
A_24_P943957	PIP5K3	phosphatidylinositol-3-phosphate/phosphatidylinositol 5-kinase, type III
A_24_P772103	PITPNC1	phosphatidylinositol transfer protein, cytoplasmic 1
A_23_P133470	PJA2	praja 2, RING-H2 motif containing
A_23_P217339	PRKX	protein kinase, X-linked
A_24_P252785	PTEN	phosphatase and tensin homolog (mutated in multiple advanced cancers 1)
A_23_P5550	PUM2	pumilio homolog 2 (Drosophila)
A_23_P257144	PXDN	peroxidasin homolog (Drosophila)
A_23_P216984	RAB14	RAB14, member RAS oncogene family
A_23_P377267	RABGAP1L	RAB GTPase activating protein 1-like
A_23_P14105	RCBTB2	regulator of chromosome condensation (RCC1) and BTB (POZ) domain containing protein 2
A_24_P330366	RCOR1	REST corepressor 1
A_23_P203023	RDX	radixin
A_23_P396194	RFWD2	ring finger and WD repeat domain 2
A_24_P333019	RNF24	ring finger protein 24
A_24_P538403	ROCK1	Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1
A_23_P140170	SEC23A	Sec23 homolog A (S. cerevisiae)
A_24_P46953	SGK3	serum/glucocorticoid regulated kinase family, member 3
A_24_P139094	SH3GL1	SH3-domain GRB2-like 1
A_23_P202565	SHOC2	soc-2 suppressor of clear homolog (C. elegans)
A_23_P406330	SMAP2	stromal membrane-associated GTPase-activating protein 2
A_23_P43326	SPTLC1	serine palmitoyltransferase, long chain base subunit 1
A_23_P33791	SSBP2	single-stranded DNA binding protein 2
A_32_P128588	SSR1	signal sequence receptor, alpha (translocon-associated protein alpha)
A_23_P93881	SYPL1	synaptophysin-like 1
A_24_P98249	TACC1	transforming, acidic coiled-coil containing protein 1
A_23_P212728	TBC1D23	TBC1 domain family, member 23
A_32_P458096	TBC1D24	TBC1 domain family, member 24
A_23_P83094	TLE4	transducin-like enhancer of split 4 (E(sp1) homolog, Drosophila)
A_23_P6688	TMEM16K	transmembrane protein 16K
A_32_P40288	TMEM200A	transmembrane protein 200A
A_23_P391906	TMEM200A	transmembrane protein 200A
A_23_P18739	TMEM34	transmembrane protein 34
A_23_P422083	TMEM55A	transmembrane protein 55A
A_23_P382705	TMTC2	transmembrane and tetratricopeptide repeat containing 2
A_24_P218265	TNFRSF10B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b
A_23_P204609	VEZT	vezatin, adherens junctions transmembrane protein
A_23_P171359	WDR44	WD repeat domain 44
A_24_P787897	XYLT1	xylosyltransferase I
A_32_P352697	YTHDC1	YTH domain containing 1
A_23_P71752	ZFAND5	zinc finger, AN1-type domain 5
A_23_P3856	ZFP1	zinc finger protein 1 homolog (mouse)
A_23_P332374	ZNF175	zinc finger protein 175

PROGRESORES

Identificación sonda Agilent	Símbolo gen según Entrez	Gen
A_23_P370097	ALS2CR4	amyotrophic lateral sclerosis 2 (juvenile) chromosome region, candidate 4
A_23_P160934	ANP32E	acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member E
A_23_P254601	ARF5	ADP-ribosylation factor 5
A_24_P356218	ARL6IP1	ADP-ribosylation factor-like 6 interacting protein 1
A_23_P165360	ASB1	ankyrin repeat and SOCS box-containing 1
A_24_P118231	ATP5S	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit s (factor B)
A_23_P37296	ATP5S	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit s (factor B)
A_32_P162760	ATXN10	ataxin 10
A_23_P145357	BAK1	BCL2-antagonist/killer 1
A_32_P188921	BIRC5	baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)
A_23_P118815	BIRC5	baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)
A_23_P207400	BRCA1	breast cancer 1, early onset
A_23_P31602	BUD31	BUD31 homolog (S. cerevisiae)
A_23_P87769	C12orf48	chromosome 12 open reading frame 48
A_23_P152284	C16orf33	chromosome 16 open reading frame 33
A_23_P100326	C16orf35	chromosome 16 open reading frame 35
A_23_P26557	C16orf59	chromosome 16 open reading frame 59
A_23_P152858	C17orf79	chromosome 17 open reading frame 79
A_23_P125423	C1R	complement component 1, r subcomponent
A_23_P29655	C3orf14	chromosome 3 open reading frame 14
A_24_P462899	C6orf173	chromosome 6 open reading frame 173
A_32_P143245	C6orf173	chromosome 6 open reading frame 173
A_23_P42695	C7orf24	chromosome 7 open reading frame 24
A_24_P170887	C8orf33	chromosome 8 open reading frame 33
A_23_P123732	C9orf103	chromosome 9 open reading frame 103
A_24_P219785	CALM3	calmodulin 3 (phosphorylase kinase, delta)
A_23_P38085	CARHSP1	calcium regulated heat stable protein 1, 24kDa
A_23_P100127	CASC5	cancer susceptibility candidate 5
A_23_P2355	CBX5	chromobox homolog 5 (HP1 alpha homolog, Drosophila)
A_23_P62764	CCDC28B	coiled-coil domain containing 28B
A_23_P402176	CCDC42	coiled-coil domain containing 42
A_23_P58321	CCNA2	cyclin A2
A_23_P65757	CCNB2	cyclin B2
A_23_P167328	CD38	CD38 molecule
A_23_P159335	CD8B	CD8b molecule
A_23_P57379	CDC45L	CDC45 cell division cycle 45-like (S. cerevisiae)
A_23_P49972	CDC6	cell division cycle 6 homolog (S. cerevisiae)
A_23_P385861	CDCA2	cell division cycle associated 2
A_23_P251421	CDCA7	cell division cycle associated 7
A_23_P375	CDCA8	cell division cycle associated 8

PROGRESORES (Continuación)

Identificación sonda Agilent	Símbolo gen según Entrez	Gen
A_23_P48669	CDKN3	cyclin-dependent kinase inhibitor 3 (CDK2-associated dual specificity phosphatase)
A_24_P176374	CDT1	chromatin licensing and DNA replication factor 1
A_23_P37704	CDT1	chromatin licensing and DNA replication factor 1
A_23_P401	CENPF	centromere protein F, 350/400ka (mitosin)
A_24_P399888	CENPM	centromere protein M
A_23_P88740	CENPN	centromere protein N
A_24_P392109	CENPN	centromere protein N
A_23_P115872	CEP55	centrosomal protein 55kDa
A_23_P92025	CIDEC	cell death-inducing DFFA-like effector c
A_32_P165713	CIP29	cytokine induced protein 29 kDa
A_24_P719579	CISD3	CDGSH iron sulfur domain 3
A_23_P420551	CIT	citron (rho-interacting, serine/threonine kinase 21)
A_32_P206698	CKS1B	CDC28 protein kinase regulatory subunit 1B
A_32_P192430	CKS1B	CDC28 protein kinase regulatory subunit 1B
A_23_P45917	CKS1B	CDC28 protein kinase regulatory subunit 1B
A_23_P405088	CLDN11	claudin 11 (oligodendrocyte transmembrane protein)
A_24_P246926	CORT	cortistatin
A_32_P143057	COX7C	cytochrome c oxidase subunit VIIc
A_23_P125837	CXorf26	chromosome X open reading frame 26
A_24_P912751	CYP4V2	cytochrome P450, family 4, subfamily V, polypeptide 2
A_23_P57306	CHAF1B	chromatin assembly factor 1, subunit B (p60)
A_23_P116123	CHEK1	CHK1 checkpoint homolog (S. pombe)
A_23_P12082	CHI3L2	chitinase 3-like 2
A_23_P165247	DAZAP1	DAZ associated protein 1
A_23_P16573	DDX49	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 49
A_23_P200310	DEPDC1	DEP domain containing 1
A_23_P361419	DEPDC1B	DEP domain containing 1B
A_24_P942328	DHFR	dihydrofolate reductase
A_32_P211045	DHFR	dihydrofolate reductase
A_23_P88331	DLG7	discs, large homolog 7 (Drosophila)
A_23_P112241	DNAJB5	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 5
A_23_P104372	DNAJC9	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 9
A_23_P125408	DOHH	deoxyhypusine hydroxylase/monooxygenase
A_23_P10385	DTL	denticleless homolog (Drosophila)
A_24_P143440	DYNLRB1	dynein, light chain, roadblock-type 1
A_23_P80032	E2F1	E2F transcription factor 1
A_32_P210202	E2F7	E2F transcription factor 7
A_23_P200901	ENSA	endosulfine alpha
A_32_P107746	ENSA	endosulfine alpha
A_23_P32707	ESPL1	extra spindle pole bodies homolog 1 (S. cerevisiae)
A_24_P384573	EWSR1	Ewing sarcoma breakpoint region 1
A_23_P23303	EXO1	exonuclease 1
A_23_P259641	EZH2	enhancer of zeste homolog 2 (Drosophila)
A_24_P673063	FABP5	fatty acid binding protein 5 (psoriasis-associated)
A_24_P7642	FABP5	fatty acid binding protein 5 (psoriasis-associated)
A_23_P59877	FABP5	fatty acid binding protein 5 (psoriasis-associated)
A_24_P261929	FAM14B	family with sequence similarity 14, member B
A_23_P53976	FAM14B	family with sequence similarity 14, member B

PROGRESORES (Continuación)

Identificación sonda Agilent	Símbolo gen según Entrez	Gen
A_24_P119002	FAM98A	family with sequence similarity 98, member A
A_23_P375104	FANCI	Fanconi anemia, complementation group I
A_32_P95729	FANCI	Fanconi anemia, complementation group I
A_23_P58815	FBXO4	F-box protein 4
A_23_P38154	FDXR	ferredoxin reductase
A_24_P73158	FEN1	flap structure-specific endonuclease 1
A_24_P84898	FEN1	flap structure-specific endonuclease 1
A_23_P108751	FHL2	four and a half LIM domains 2
A_23_P3922	FLJ11710	hypothetical protein FLJ11710
A_23_P151150	FOXM1	forkhead box M1
A_32_P43050	FRG1	FSHD region gene 1
A_23_P121773	FRG1	FSHD region gene 1
A_23_P118246	GINS2	GINS complex subunit 2 (Psf2 homolog)
A_23_P136787	GINS4	GINS complex subunit 4 (Sld5 homolog)
A_23_P65370	GLRX5	glutaredoxin 5
A_23_P19712	GMNN	geminin, DNA replication inhibitor
A_23_P158662	GPS1	G protein pathway suppressor 1
A_24_P76521	GSG2	germ cell associated 2 (haspin)
A_23_P106204	GSTZ1	glutathione transferase zeta 1 (maleylacetoacetate isomerase)
A_23_P20732	GTF3C4	general transcription factor IIIC, polypeptide 4, 90kDa
A_23_P57588	GTSE1	G-2 and S-phase expressed 1
A_24_P41570	H2AFZ	H2A histone family, member Z
A_23_P122796	HDDC2	HD domain containing 2
A_23_P395374	HIST1H4D	histone cluster 1, H4d
A_24_P524452	HIST3H2BB	histone cluster 3, H2bb
A_24_P169148	HMG1L1	high-mobility group (nonhistone chromosomal) protein 1-like 1
A_24_P801264	HMGB1	high-mobility group box 1
A_32_P71768	HMGB1	high-mobility group box 1
A_32_P134580	HMGB1	high-mobility group box 1
A_32_P41487	HMGN2	high-mobility group nucleosomal binding domain 2
A_32_P15799	HMGN2	high-mobility group nucleosomal binding domain 2
A_32_P222383	HMGN2	high-mobility group nucleosomal binding domain 2
A_32_P29507	HMGN2	high-mobility group nucleosomal binding domain 2
A_32_P1381	HMGN2	high-mobility group nucleosomal binding domain 2
A_24_P187407	HMGN2P4	high-mobility group nucleosomal binding domain 2 pseudogene 4
A_23_P70007	HMMR	hyaluronan-mediated motility receptor (RHAMM)
A_32_P159347	HNRPA3	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3
A_23_P10685	HSPBP1	hsp70-interacting protein
A_23_P129209	IDH2	isocitrate dehydrogenase 2 (NADP+), mitochondrial
A_23_P399156	IL12RB1	interleukin 12 receptor, beta 1
A_23_P302094	IMP4	IMP4, U3 small nucleolar ribonucleoprotein, homolog (yeast)
A_32_P99533	ISG15	ISG15 ubiquitin-like modifier
A_23_P154507	ITGB1BP1	integrin beta 1 binding protein 1
A_24_P280762	KHDC1	KH homology domain containing 1
A_24_P20814	KHDC1	KH homology domain containing 1
A_23_P16157	KHSRP	KH-type splicing regulatory protein
A_23_P117852	KIAA0101	KIAA0101

PROGRESORES (Continuación)

Identificación sonda Agilent	Símbolo gen según Entrez	Gen
A_24_P38446	KIAA1967	KIAA1967
A_23_P80902	KIF15	kinesin family member 15
A_23_P34788	KIF2C	kinesin family member 2C
A_23_P148475	KIF4A	kinesin family member 4A
A_23_P133956	KIFC1	kinesin family member C1
A_23_P315451	KIRREL2	kin of IRRE like 2 (Drosophila)
A_32_P175321	LAMA5	laminin, alpha 5
A_32_P73222	LOC342994	similar to ribosomal protein L34
A_24_P186986	LOC390424	similar to hCG1639781
A_24_P195400	LOC391247	similar to hCG38061
A_24_P340771	LOC442157	hypothetical LOC442157
A_24_P33595	LOC442210	similar to tubulin, beta 5
A_24_P59099	LOC643668	similar to P26s4
A_24_P67408	LOC644214	similar to mCG8461
A_24_P878419	LOC645360	similar to high-mobility group box 3
A_24_P169976	LOC646577	similar to mCG125662
A_32_P208978	LOC728723	hypothetical protein LOC728723
A_24_P109962	LOC729858	similar to mCG50622
A_23_P51278	LRRC42	leucine rich repeat containing 42
A_23_P92441	MAD2L1	MAD2 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast)
A_23_P148273	MAGT1	magnesium transporter 1
A_24_P105164	MAGT1	magnesium transporter 1
A_23_P145376	MAPK13	mitogen-activated protein kinase 13
A_24_P406132	MAPK13	mitogen-activated protein kinase 13
A_24_P412088	MCM10	minichromosome maintenance complex component 10
A_32_P103633	MCM2	minichromosome maintenance complex component 2
A_23_P370989	MCM4	minichromosome maintenance complex component 4
A_23_P132277	MCM5	minichromosome maintenance complex component 5
A_23_P116235	MDK	midkine (neurite growth-promoting factor 2)
A_23_P387471	MICB	MHC class I polypeptide-related sequence B
A_24_P230916	MIER1	mesoderm induction early response 1 homolog (Xenopus laevis)
A_23_P254733	MLF1IP	MLF1 interacting protein
A_24_P364381	MMAB	methylmalonic aciduria (cobalamin deficiency) cblB type
A_23_P133123	MND1	meiotic nuclear divisions 1 homolog (S. cerevisiae)
A_23_P35099	MRTO4	mRNA turnover 4 homolog (S. cerevisiae)
A_23_P105592	MVK	mevalonate kinase
A_23_P143190	MYBL2	v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)-like 2
A_23_P2223	MYL6B	myosin, light chain 6B, alkali, smooth muscle and non-muscle
A_23_P170657	NA	NA
A_24_P707543	NA	NA
A_24_P75688	NA	NA
A_23_P132863	NA	NA
A_24_P349606	NA	NA
A_24_P928250	NA	NA
A_32_P182135	NA	NA
A_24_P75700	NA	NA
A_32_P50417	NA	NA

PROGRESORES (Continuación)		
Identificación sonda Agilent	Símbolo gen según Entrez	Gen
A_32_P6541	NA	NA
A_24_P152278	NA	NA
A_32_P213306	NA	NA
A_24_P932328	NA	NA
A_23_P1014	NA	NA
A_23_P117943	NA	NA
A_23_P85936	NA	NA
A_32_P197060	NA	NA
A_24_P367397	NA	NA
A_24_P212764	NA	NA
A_24_P521544	NA	NA
A_24_P256093	NA	NA
A_32_P1516	NA	NA
A_24_P67681	NA	NA
A_32_P29408	NA	NA
A_32_P49035	NA	NA
A_32_P226869	NA	NA
A_24_P930551	NA	NA
A_24_P922101	NA	NA
A_24_P480464	NA	NA
A_23_P99731	NA	NA
A_32_P109532	NA	NA
A_32_P32195	NA	NA
A_24_P627678	NA	NA
A_24_P400981	NA	NA
A_32_P147747	NA	NA
A_24_P614940	NA	NA
A_32_P222335	NA	NA
A_32_P205006	NA	NA
A_24_P203984	NA	NA
A_24_P316767	NA	NA
A_24_P67063	NA	NA
A_32_P54475	NA	NA
A_32_P201677	NA	NA
A_32_P120818	NA	NA
A_32_P76842	NA	NA
A_24_P647682	NA	NA
A_24_P884915	NA	NA
A_23_P63789	NA	NA
A_32_P209325	NA	NA
A_24_P366495	NA	NA
A_24_P793483	NA	NA
A_24_P299007	NA	NA
A_24_P349869	NA	NA
A_32_P54260	NA	NA
A_24_P178663	NA	NA
A_32_P76441	NA	NA
A_23_P414771	NA	NA
A_24_P401150	NA	NA
A_23_P155815	NCAPG	non-SMC condensin I complex, subunit G

PROGRESORES (Continuación)		
Identificación sonda Agilent	Símbolo gen según Entrez	Gen
A_23_P415443	NCAPH	non-SMC condensin I complex, subunit H
A_23_P369960	NCAPH2	non-SMC condensin II complex, subunit H2
A_23_P330895	NFKBIB	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, beta
A_23_P54834	NIP7	nuclear import 7 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)
A_23_P58280	NOLA1	nucleolar protein family A, member 1 (H/ACA small nucleolar RNPs)
A_23_P337746	NRL	neural retina leucine zipper
A_23_P66439	NT5C	5', 3'-nucleotidase, cytosolic
A_24_P374652	NUCKS1	nuclear casein kinase and cyclin-dependent kinase substrate 1
A_23_P74653	NUDC	nuclear distribution gene C homolog (<i>A. nidulans</i>)
A_23_P134295	NUDT1	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 1
A_23_P129614	NUDT21	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 21
A_23_P74349	NUF2	NUF2, NDC80 kinetochore complex component, homolog (<i>S. cerevisiae</i>)
A_24_P416079	NUSAP1	nucleolar and spindle associated protein 1
A_32_P32391	OR7E156P	olfactory receptor, family 7, subfamily E, member 156 pseudogene
A_23_P45799	ORC1L	origin recognition complex, subunit 1-like (yeast)
A_23_P100344	ORC6L	origin recognition complex, subunit 6 like (yeast)
A_32_P62997	PBK	PDZ binding kinase
A_23_P85783	PHGDH	phosphoglycerate dehydrogenase
A_23_P398515	PKMYT1	protein kinase, membrane associated tyrosine/threonine 1
A_24_P105102	PKMYT1	protein kinase, membrane associated tyrosine/threonine 1
A_24_P313504	PLK1	polo-like kinase 1 (<i>Drosophila</i>)
A_23_P200940	PPIH	peptidylprolyl isomerase H (cyclophilin H)
A_23_P323227	PPP1CA	protein phosphatase 1, catalytic subunit, alpha isoform
A_23_P80382	PRR5	proline rich 5 (renal)
A_23_P104607	PSMC3	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 3
A_32_P99100	PTPRK	protein tyrosine phosphatase, receptor type, K
A_23_P7636	PTTG1	pituitary tumor-transforming 1
A_23_P130194	PYCR1	pyrroline-5-carboxylate reductase 1
A_32_P142013	RABEP1	rabaptin, RAB GTPase binding effector protein 1
A_23_P31584	RABL5	RAB, member RAS oncogene family-like 5
A_23_P88731	RAD51	RAD51 homolog (RecA homolog, <i>E. coli</i>) (<i>S. cerevisiae</i>)
A_23_P99292	RAD51AP1	RAD51 associated protein 1
A_23_P74115	RAD54L	RAD54-like (<i>S. cerevisiae</i>)
A_23_P91590	RANBP1	RAN binding protein 1
A_23_P141447	RDM1	RAD52 motif 1
A_23_P71558	RECQL4	RecQ protein-like 4
A_24_P295452	ROD1	ROD1 regulator of differentiation 1 (<i>S. pombe</i>)
A_23_P87351	RRM1	ribonucleotide reductase M1
A_24_P234196	RRM2	ribonucleotide reductase M2 polypeptide
A_24_P225616	RRM2	ribonucleotide reductase M2 polypeptide
A_23_P6344	SDF2L1	stromal cell-derived factor 2-like 1
A_23_P150092	SEPHS1	selenophosphate synthetase 1
A_32_P105773	SERBP1	SERPINE1 mRNA binding protein 1
A_23_P217015	SET	SET translocation (myeloid leukemia-associated)

PROGRESORES (Continuación)		
Identificación sonda Agilent	Símbolo gen según Entrez	Gen
A_32_P64263	SKP1	S-phase kinase-associated protein 1
A_32_P28685	SNRPA1	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide A'
A_32_P148672	SNRPD1	small nuclear ribonucleoprotein D1 polypeptide 16kDa
A_23_P107644	SNRPD1	small nuclear ribonucleoprotein D1 polypeptide 16kDa
A_24_P928639	SOLH	small optic lobes homolog (Drosophila)
A_24_P314571	SPC24	SPC24, NDC80 kinetochore complex component, homolog (S. cerevisiae)
A_23_P51085	SPC25	SPC25, NDC80 kinetochore complex component, homolog (S. cerevisiae)
A_24_P375453	SSBP3	single stranded DNA binding protein 3
A_23_P500333	SSBP3	single stranded DNA binding protein 3
A_23_P200866	STMN1	stathmin 1/oncoprotein 18
A_24_P338145	STOML2	stomatolysin 2 (EPB72)-like 2
A_24_P319354	SUMO1	SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 1 (S. cerevisiae)
A_32_P223189	SUMO1P3	SUMO1 pseudogene 3
A_23_P202392	SUV39H2	suppressor of variegation 3-9 homolog 2 (Drosophila)
A_23_P259580	TAPBP	TAP binding protein (tapasin)
A_23_P21162	TCTEX1D2	Tctex1 domain containing 2
A_32_P199301	TFDP1	transcription factor Dp-1
A_24_P387158	THOC4	THO complex 4
A_23_P152984	THOC4	THO complex 4
A_24_P417474	TIA1	TIA1 cytotoxic granule-associated RNA binding protein
A_23_P53276	TIMELESS	timeless homolog (Drosophila)
A_23_P56316	TIMM13	translocase of inner mitochondrial membrane 13 homolog (yeast)
A_23_P99930	TIPIN	TIMELESS interacting protein
A_23_P107421	TK1	thymidine kinase 1, soluble
A_24_P239364	TMEFF2	transmembrane protein with EGF-like and two follistatin-like domains 2
A_32_P201521	TMEM97	transmembrane protein 97
A_24_P151920	TMEM97	transmembrane protein 97
A_24_P82880	TPM4	tropomyosin 4
A_23_P68610	TPX2	TPX2, microtubule-associated, homolog (Xenopus laevis)
A_23_P170491	TRAIP	TRAF interacting protein
A_23_P150935	TROAP	trophinin associated protein (tastin)
A_23_P128147	TUBA1B	tubulin, alpha 1b
A_23_P81912	TUBB	tubulin, beta
A_32_P78528	TUBB	tubulin, beta
A_23_P50096	TYMS	thymidylate synthetase
A_24_P297539	UBE2C	ubiquitin-conjugating enzyme E2C
A_32_P11499	UBE2N	ubiquitin-conjugating enzyme E2N (UBC13 homolog, yeast)
A_23_P350234	UBE2NL	ubiquitin-conjugating enzyme E2N-like
A_23_P208880	UHRF1	ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains, 1
A_23_P20823	WDR34	WD repeat domain 34
A_23_P211302	WDR4	WD repeat domain 4
A_32_P72968	YWHAQ	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, theta polypeptide
A_24_P933492	ZDHHC21	zinc finger, DHHC-type containing 21
A_24_P122891	ZFAND2B	zinc finger, AN1-type domain 2B
A_23_P112673	ZWILCH	Zwilch, kinetochore associated, homolog (Drosophila)

Anexo III

Anexo III. Genes asociados a cada uno de los términos de la base de datos GeneOntology que aparecen sobreexpresados en cada grupo analizado. Las funciones se dividen por: a) componente celular o localización de los genes reseñados dentro de la célula; b) Proceso biológico, o función biológica en la que participan los genes; y c) Función Molecular en la que participan los genes. Los niveles representan el nivel de complejidad de la función yendo de menor a mayor según aumenta el número. La tabla d) representa las rutas metabólicas de la base de datos Kegg que presentan diferencias entre ambos grupos.

a) Componente Celular

Nivel GO	Location	Genes LTNP	Nº genes	% LTNP	Genes Progresores	Nº genes	% Progresores	Valor p
Nivel 4	membrana	ATP11A PDPK1 VEZT SYPL1 DDEF1 TNFRSF10B EVI2A SSR1 RAB14 SEC23A GPR15 PIP5K3 XYLT1 CYSLTR1 AMICA1 ARL6IP5 IL17RA SPTLC1 FGFRL1 P2RY5 RDX PAG1 MPZL1 HOOK3 DPYD IL1RAP TMEM55A BMPR2 AFTPH TMTC2 PDGFB C18orf1 EVI2B	33	47,14	BAK1 ITGB1BP1 LAMA5 CBX5 ALS2CR4 CYP4V2 ZDHHC21 CALM3 PKMYT1 IL12RB1 TMEFF2 MICB ARF5 FAM14B KIRREL2 ARL6IP1 STOML2 TIMM13 FDXR COX7C TAPBP TMEM97 CD38 CLDN11 CD8B IDH2 PTPRK	27	17,31	6,96E-06
	intracelular	C14orf43 FBXO9 SSBP2 EVI5 PDPK1 VEZT SYPL1 CHD9 CENTG3 NPEPPS TACC1 SSR1 DCK PITPNC1 RAB14 SEC23A BAZ2B ARID1A TLE4 ZNF175 SHOC2 HSD17B4 ZFP1 ROCK1 PIP5K3 XYLT1 RCOR1 KIAA1012 ARL6IP5 YTHDC1 SPTLC1 ACO1 RFWD2 RDX MDFIC KLHL5 HOOK3 DPYD AFTPH SH3GL1 TMTC2 KLHL7 GLB1 SGK3 PTEN FBXL5 HIPK3 EGLN3 CUL1	49	70	EXO1 SOLH CIT FBXO4 RABEP1 CENPN MVK MMAB SUV39H2 SSBP3 GTSE1 FHL2 HIST3H2BB CBX5 EZH2 CYP4V2 CIDEA CDCA7 ISG15 THOC4 RANBP1 KIAA1967 TPX2 GLRX5 GTF3C4 RRM2 PPIH CHEK1 CDC45L FEN1 ROD1 FABP5 CHAF1B RAD51AP1 GPS1 FOXM1 MYBL2 ANP32E PSMC3 ATP5S NFKBIB CASC5 MAD2L1 KIAA0101 CALM3 HMG2N2 CORT GINS2 PRR5 CCNB2 DEPDC1 TIA1 DEPDC1B ORC1L GSTZ1 GINS4 KIFC1 EWSR1 PKMYT1 PPP1CA E2F7 TIPIN TPM4 C16orf33 BRCA1 GMNN C6orf173 Cxor26 ORC6L ATXN10 ARF5 NUF2 KIF15 TK1 CDC6 DLG7 BUD31 KIF2C KHSRP TROAP NUCKS1 STMN1 H2AFZ TFDP1 HMG81 ARL6IP1 MIER1 RAD54L RAD51 MYL6B NRL DAZAP1 ASB1 STOML2 TIMM13 GSG2 SNRPA1 HNRPA3 FDXR RECQL4 KIF4A MCM5 FRG1 NOLA1 CCNA2 CDC48 BIRC5 NUDT21 COX7C TAPBP CDT1 TUBB HIST1H4D DNAJC9 NUSAP1 NCAPG TIMELESS SUMO1 ZWILCH DYNLRB1 RRM1 HMG1L1 MLF1IP UBE2N NCAPH CENPM UHRF1 PTTG1 E2F1 NUDC NT5C PLK1 SERBP1 SET SPC24 IDH2 ESPL1 NIP7 MCM4	139	89,1	8,45E-04
Nivel 5	membrana plasmática	PDPK1 VEZT SYPL1 RAB14 GPR15 PIP5K3 CYSLTR1 IL17RA FGFRL1 RDX MPZL1 IL1RAP BMPR2 EVI2B	14	21,54	CALM3 IL12RB1 MICB ARF5 CD38 CLDN11 CD8B PTPRK	8	5,41	9,24E-04
Nivel 6	intrínseco en la membrana	ATP11A VEZT SYPL1 TNFRSF10B EVI2A SSR1 GPR15 XYLT1 CYSLTR1 AMICA1 ARL6IP5 IL17RA SPTLC1 FGFRL1 P2RY5 PAG1 MPZL1 IL1RAP TMEM55A BMPR2 TMTC2 C18orf1 EVI2B	23	35,38	BAK1 LAMA5 ALS2CR4 CYP4V2 ZDHHC21 IL12RB1 TMEFF2 MICB FAM14B KIRREL2 ARL6IP1 COX7C TAPBP TMEM97 CD38 CLDN11 CD8B PTPRK	18	12,16	2,38E-04
	órgano intracelular	C14orf43 SSBP2 EVI5 PDPK1 VEZT SYPL1 CHD9 CENTG3 NPEPPS TACC1 SSR1 DCK RAB14 SEC23A BAZ2B ARID1A TLE4 ZNF175 HSD17B4 ZFP1 ROCK1 PIP5K3 XYLT1 RCOR1 KIAA1012 ARL6IP5 YTHDC1 SPTLC1 RFWD2 RDX MDFIC KLHL5 HOOK3 AFTPH TMTC2 KLHL7 GLB1 SGK3 HIPK3 EGLN3	40	61,54	EXO1 CIT RABEP1 CENPN MVK MMAB SUV39H2 SSBP3 GTSE1 FHL2 HIST3H2BB CBX5 EZH2 CYP4V2 CDCA7 THOC4 RANBP1 KIAA1967 TPX2 GLRX5 GTF3C4 PPIH CHEK1 CDC45L FEN1 ROD1 CHAF1B RAD51AP1 GPS1 FOXM1 MYBL2 ANP32E PSMC3 ATP5S NFKBIB CASC5 MAD2L1 KIAA0101 HMG2N2 CORT GINS2 CCNB2 TIA1 ORC1L GSTZ1 GINS4 KIFC1 EWSR1 PKMYT1 PPP1CA E2F7 TIPIN TPM4 C16orf33 BRCA1 GMNN C6orf173 ORC6L NUF2 KIF15 CDC6 DLG7 BUD31 KIF2C KHSRP NUCKS1 STMN1 H2AFZ TFDP1 HMG81 ARL6IP1 MIER1 RAD54L RAD51 MYL6B NRL DAZAP1 STOML2 TIMM13 GSG2 SNRPA1 HNRPA3 FDXR RECQL4 KIF4A MCM5 FRG1 NOLA1 CCNA2 CDC48 BIRC5 NUDT21 COX7C TAPBP CDT1 TUBB HIST1H4D DNAJC9 NUSAP1 NCAPG TIMELESS SUMO1 ZWILCH DYNLRB1 HMG1L1 MLF1IP UBE2N NCAPH CENPM UHRF1 PTTG1 E2F1 NUDC NT5C PLK1 SERBP1 SET SPC24 IDH2 ESPL1 NIP7 MCM4	122	82,43	1,58E-03
Nivel 7	unión a membranas no organulares	CHD9 ROCK1 RDX MDFIC KLHL5 HOOK3 KLHL7	7	12,07	CIT CENPN SUV39H2 GTSE1 HIST3H2BB CBX5 RANBP1 TPX2 CHEK1 MYBL2 MAD2L1 HMG2N2 CORT CCNB2 KIFC1 TPM4 BRCA1 ORC6L NUF2 KIF15 CDC6 DLG7 KIF2C STMN1 H2AFZ HMG81 RAD51 MYL6B STOML2 KIF4A NOLA1 CDC48 BIRC5 NUDT21 CDT1 TUBB HIST1H4D DNAJC9 NUSAP1 ZWILCH DYNLRB1 HMG1L1 MLF1IP CENPM NUDC PLK1 SPC24 ESPL1	48	34,78	9,42E-04
	intrínseco en la membrana plasmática	SYPL1 GPR15 CYSLTR1 IL17RA MPZL1 IL1RAP BMPR2 EVI2B	8	13,79	IL12RB1 CD8B PTPRK	3	2,17	3,01E-03
Nivel 8	nucleo	C14orf43 SSBP2 EVI5 VEZT CHD9 CENTG3 NPEPPS TACC1 DCK BAZ2B ARID1A TLE4 ZNF175 ZFP1 RCOR1 YTHDC1 RFWD2 MDFIC KLHL7 HIPK3 EGLN3	21	42,86	EXO1 CENPN SUV39H2 SSBP3 FHL2 HIST3H2BB CBX5 EZH2 CDCA7 THOC4 RANBP1 KIAA1967 TPX2 GTF3C4 PPIH CHEK1 CDC45L FEN1 ROD1 CHAF1B RAD51AP1 GPS1 FOXM1 MYBL2 ANP32E PSMC3 NFKBIB CASC5 MAD2L1 KIAA0101 HMG2N2 CORT GINS2 CCNB2 TIA1 ORC1L GINS4 EWSR1 PPP1CA E2F7 TIPIN C16orf33 BRCA1 GMNN C6orf173 ORC6L NUF2 CDC6 DLG7 BUD31 KIF2C KHSRP NUCKS1 H2AFZ TFDP1 HMG81 MIER1 RAD54L RAD51 NRL DAZAP1 STOML2 TIMM13 GSG2 SNRPA1 HNRPA3 RECQL4 KIF4A MCM5 FRG1 NOLA1 CCNA2 CDC48 BIRC5 NUDT21 CDT1 HIST1H4D NUSAP1 NCAPG TIMELESS SUMO1 HMG1L1 MLF1IP UBE2N NCAPH CENPM UHRF1 PTTG1 E2F1 NUDC NT5C PLK1 SERBP1 SET SPC24 ESPL1 NIP7 MCM4	96	73,85	1,80E-04
	cromosoma	CHD9	1	2,04	CENPN SUV39H2 HIST3H2BB CBX5 CHEK1 MYBL2 MAD2L1 HMG2N2 CORT BRCA1 ORC6L NUF2 KIF2C H2AFZ HMG81 RAD51 CDC48 BIRC5 CDT1 HIST1H4D ZWILCH HMG1L1 MLF1IP CENPM SPC24	25	19,23	1,89E-03

b) Proceso Biológico

Nivel GO	Proceso	Genes LTNP	Nº genes	%LTNP	Genes Progresores	Nº genes	% Progresores	Valor p
Nivel 3	ciclo celular	EVI5 TACC1 BMPR2 PTEN PDGFB CUL1	6	8.22	EXO1 MDK CIT CKS1B SUV39H2 GTSE1 RANBP1 TPX2 CHEK1 CEP55 CDC45L YWHAQ CHAF1B GPS1 MYBL2 MAD2L1 CCNB2 KIFC1 PKMYT1 PPP1CA E2F7 BRCA1 GMNN NUF2 KIF15 CDC6 DLG7 KIF2C MAPK13 STMN1 TFDP1 UBE2C RAD51 RAD54L GSG2 MCM5 CCNA2 CDCA8 BIRC5 CDT1 PBK TUBB NUSAP1 NCAPG NCAPH UHRF1 CDKN3 PTTG1 E2F1 NUDC PLK1 SPC24 ESPL1	53	33.12	3,00E-05
	respuesta a estímulos endógenos	No genes	0	0	EXO1 GTSE1 CHEK1 FEN1 CHAF1B RAD51AP1 BRCA1 HMGB1 RAD51 RAD54L NUDT1 C16orf35 TYMS RECQL4 CCNA2 UBE2N UHRF1 PTTG1	18	11.25	1,09E-03
Nivel 4	ciclo celular (mitosis)	CUL1	1	1.43	CIT GTSE1 TPX2 CHEK1 CEP55 MAD2L1 CCNB2 KIFC1 PKMYT1 NUF2 KIF15 CDC6 DLG7 KIF2C STMN1 UBE2C CCNA2 CDCA8 BIRC5 CDT1 PBK TUBB NUSAP1 NCAPG NCAPH CDKN3 PTTG1 E2F1 NUDC PLK1 SPC24 ESPL1	32	20.38	5,67E-05
	proceso metabólico de nucleobases, nucleósido, nucleótido y ácidos nucleicos	C14orf43 SSBP2 CHD9 DCK BAZ2B ARID1A TLE4 ZNF175 ZFP1 RCOR1 YTHDC1 DPYD HIPK3	13	18.57	EXO1 SUV39H2 SSBP3 FHL2 HIST3H2BB CBX5 EZH2 CDCA7 THOC4 GTF3C4 RRM2 PPIH CHEK1 CDC45L FEN1 ROD1 CHAF1B RAD51AP1 FOXM1 MYBL2 CARHSP1 NFKB1B HMG2 GINS2 ORC1L EWSR1 E2F7 C16orf33 BRCA1 GMNN ORC6L TK1 CDC6 BUD31 KHSRP WDR4 DHFR H2AFZ TFDP1 HMGB1 MIER1 RAD54L RAD51 NRL NUDT1 GSG2 C16orf35 SNRPA1 TYMS HNRPA3 RECQL4 MCM5 FRG1 NOLA1 CCNA2 NUDT21 CDT1 HIST1H4D TIMELESS SUMO1 RRM1 HMG1L1 MLF1IP UBE2N UHRF1 PTTG1 E2F1 NT5C SERBP1 SET MCM4	71	45.22	1,02E-04
	respuesta a estímulos de daño de DNA	No genes	0	0	EXO1 GTSE1 CHEK1 FEN1 CHAF1B RAD51AP1 BRCA1 HMGB1 RAD54L RAD51 NUDT1 C16orf35 TYMS RECQL4 CCNA2 UBE2N UHRF1 PTTG1	18	11.46	1,15E-03
Nivel 5	señales de transducción unidas a receptores de superficie	PDPK1 TNFRSF10B TLE4 SHOC2 GPR15 CYSLTR1 IL17RA P2RY5 MPZL1 IL1RAP BMPR2 DKK3	12	18.18	CALM3 CORT IL12RB1 CD8B	4	2.61	1,58E-04
Nivel 6	reparación DNA	No genes	0	0	EXO1 CHEK1 FEN1 CHAF1B RAD51AP1 BRCA1 HMGB1 RAD54L RAD51 NUDT1 C16orf35 TYMS RECQL4 UBE2N UHRF1 PTTG1	16	10.74	3,79E-03
	procesos basados en filamentos de actina	PDPK1 ROCK1 RDX KLHL5 PDGFB	5	8.06	MYL6B	1	0.67	8,99E-03
Nivel 7	organización y biogénesis del citoesqueleto de actina	PDPK1 ROCK1 RDX KLHL5 PDGFB	5	10.20	No genes	0	0	1,21E-03
Nivel 9	regulación negativa de la muerte celular programada	ROCK1 SGK3 PTEN HIPK3	4	23.53	MYBL2 HMGB1 BIRC5	3	4.29	2,50E-02
	regulación de apoptosis	TNFRSF10B ROCK1 SGK3 PTEN HIPK3 CUL1	6	35.29	BAK1 CIDEC TRAIIP MYBL2 TIA1 BRCA1 HMGB1 BIRC5 TUBB CD38	10	14.29	7,53E-02

c) Función Molecular

Nivel GO	Función	Genes LTNP	Nº genes	% LTNP	Progresores Genes	Nº genes	% Progresores	Valor p
Nivel 3	unión a iones	ATP11A PXDN DDEF1 CENTG3 NPEPPS SSR1 IRF2BP2 SEC23A BAZ2B ZNF175 LTA4H RNF24 ZFP1 ROCK1 PIP5K3 PJA2 CENTB2 ACO1 RFWD2 DPYD BMPR2 GLB1 EGLN3 SMAP2	24	31,17	SOLH CIT SUV39H2 CHI3L2 FHL2 CYP4V2 ZDHHC21 KIAA1967 RRM2 FEN1 TRAIIP CALM3 EWSR1 PPP1CA DOHH BRCA1 ZFAND2B BUD31 MYL6B TIMM13 GSG2 RECQL4 BIRC5 UHRF1 NT5C	25	15,53	9,54E-03
	unión a ácidos nucleicos	C14orf43 SSBP2 CHD9 BAZ2B ARID1A TLE4 PUM2 ZNF175 ZFP1 RCOR1 ACO1 WDR44	12	15,58	EXO1 SOLH SSBP3 RDM1 HIST3H2BB EZH2 DDX49 THOC4 GTF3C4 FEN1 ROD1 RAD51AP1 FOXM1 MYBL2 CARHSP1 HMG2 TIA1 ORC1L EWSR1 E2F7 BRCA1 ORC6L KIF15 BUD31 KIF2C KHSRP H2AFZ TFDP1 HMGB1 MIER1 RAD54L RAD51 NRL DAZAP1 SNRPA1 HNRPA3 RECQL4 KIF4A MCM5 NOLA1 NUDT21 CDT1 HIST1H4D HMG1L1 UHRF1 PTTG1 E2F1 SERBP1 NIP7 MCM4	50	31,06	1,16E-02
	actividad de receptores actividad de transporte de lípidos	TNFRSF10B EVI2A GPR15 CYSLTR1 IL17RA FGFR1 P2RY5 IL1RAP BMPR2 ATP11A PITPNC1 HSD17B4	9 3	11,69 3,9	IL12RB1 KIF15 CD38 CD8B PTPRK No genes	5 0	3,11 0	1,53E-02 3,30E-02
Nivel 4	actividad receptores transmembrana	EVI2A GPR15 CYSLTR1 IL17RA FGFR1 P2RY5 IL1RAP BMPR2	8	12,9	IL12RB1 PTPRK	2	1,47	1,67E-03
	unión a cationes	PXDN DDEF1 CENTG3 NPEPPS SSR1 IRF2BP2 SEC23A BAZ2B ZNF175 LTA4H RNF24 ZFP1 ROCK1 PIP5K3 PJA2 CENTB2 ACO1 RFWD2 DPYD BMPR2 GLB1 EGLN3 SMAP2	23	37,1	SOLH CIT SUV39H2 CHI3L2 FHL2 CYP4V2 ZDHHC21 KIAA1967 RRM2 FEN1 TRAIIP CALM3 EWSR1 PPP1CA DOHH BRCA1 ZFAND2B BUD31 MYL6B TIMM13 RECQL4 BIRC5 UHRF1	23	16,91	3,32E-03
	unión a iones metálicos	ATP11A PXDN DDEF1 CENTG3 NPEPPS SSR1 IRF2BP2 SEC23A BAZ2B ZNF175 LTA4H RNF24 ZFP1 ROCK1 PIP5K3 PJA2 CENTB2 ACO1 RFWD2 DPYD BMPR2 EGLN3 SMAP2	23	37,1	SOLH CIT SUV39H2 FHL2 CYP4V2 ZDHHC21 KIAA1967 RRM2 FEN1 TRAIIP CALM3 EWSR1 PPP1CA DOHH BRCA1 ZFAND2B BUD31 MYL6B TIMM13 GSG2 RECQL4 BIRC5 UHRF1 NT5C	24	17,65	3,93E-03
Nivel 5	unión a iones metálicos de tración	PXDN DDEF1 CENTG3 NPEPPS IRF2BP2 SEC23A BAZ2B ZNF175 LTA4H RNF24 ZFP1 ROCK1 PIP5K3 PJA2 CENTB2 ACO1 RFWD2 DPYD BMPR2 EGLN3	20	35,09	SOLH CIT SUV39H2 FHL2 CYP4V2 ZDHHC21 RRM2 FEN1 TRAIIP EWSR1 PPP1CA DOHH BRCA1 ZFAND2B BUD31 TIMM13 RECQL4 BIRC5 UHRF1	19	16,96	1,17E-02
	actividad de receptores acoplados a proteína G	GPR15 CYSLTR1 P2RY5	3	5,26	No genes	0	0	3,70E-02
Nivel 6	actividad de receptores similares a rodopsina	GPR15 CYSLTR1 P2RY5	3	6	No genes	0	0	4,57E-02

Rutas Metabólicas (KEGG)							
Ruta	Genes LTNP	Nº genes	% LTNP	Progresores Genes	Nº genes	% Progresores	Valor p
ciclo celular	CUL1	1	4	SKP1 CHEK1 CDC45L YWHAQ MAD2L1 CCNB2 ORC1L PKMYT1 ORC6L CDC6 TFDP1 MCM5 CCNA2 PTTG1 E2F1 PLK1 ESPL1 MCM4	18	32,14	4,71E-03
interacción citoquina-receptor citoquina	TNFRSF10B IL17RA IL1RAP BMP2 PDGFB	5	20	IL12RB1	1	1,79	9,71E-03
Regulación de citosqueleto de actina	ROCK1 PIP5K3 RDX PDGFB	4	16	PPP1CA	1	1,79	2,97E-02
Adhesion focal	PDPK1 ROCK1 PTEN PDGFB	4	16	LAMA5 PPP1CA	2	3,57	6,97E-02

Publicaciones surgidas durante esta tesis

ARTÍCULOS

- Amor, A., Simón, A., Salgado, M., Rodés, B., Soriano, V., Toro, C. "**Lack of Significant Cross-Reactivity for HIV-2 Immunoblots in HIV-1 Infected Patients**". Journal of AIDS. 2009 Mar 1;50(3):339-40

- Salgado, M. "**The Role of the Host in Controlling HIV Progression**". AIDS Reviews. 2009 Apr;11:110-1

- Salgado, M., Toro, C., Simon, A., Garrido, C., Blanco F., Soriano, V., Rodés, B. "**Mutation N155H in HIV-2 integrase confers high phenotypic resistance to raltegravir and impairs replication capacity**". Journal of Clinical Virology 2009; 46(2):173-5

- Salgado, M., López-Romero, P., Callejas, S., López, M., Labarga, P., Dopazo, A., Soriano, V., Rodés, B. "**Characterization of host genetic expression patterns in HIV-infected individuals with divergent disease progression**". (Enviado)

- Salgado, M. "**HLA C: A New Factor in Controlling HIV Progression**". AIDS Reviews. 2010, Pendiente de publicar

- Salgado, M., Simón, A., Sanz-Minguela, B., Rallón, N., López, M., Vicario, J.L., Benito, J.M., Soriano, V. y Rodés, B. "**An added effect of the host genetic background correlates with HIV-non progression status**". (Enviado)

COMUNICACIONES A CONGRESOS INTERNACIONALES

- Presentación Oral: Mariola López, **María Salgado**, Jose Miguel Benito, Carlos Toro, Ainhoa Simón, Almudena Cascajero, Jose Luis Vicario, Vincent Soriano, Berta Rodés. *Evolution of nef-specific CTL epitopes in a cohort of long-term non-progressors HIV-1 infected patients*. 14th International Workshop on HIV Dynamics and Evolution. Segovia, España. 17-20 Abril 2007
- Póster: **María Salgado**, Ainhoa Simón, Vincent Soriano, Berta Rodés. *Association between non-progression and single mutations in trafficking NEF domains in a cohort of LTNP*. 4th International AIDS Society Conference. Sydney, Australia. 22-25 Julio 2007
- Póster: **María Salgado**, Pedro López-Romero, Sergio Callejas, Mariola López, Pablo Labarga, Ana Dopazo, Vincent Soriano and Berta Rodés. *Differential Host Gene Expression in HIV+ Long-Term Non-Progressors (LTNP) and Progressors*. 15th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Boston, EEUU. 3-6 Febrero 2008
- Presentación Oral: **María Salgado**, Pedro López-Romero, Sergio Callejas, Mariola López, Pablo Labarga, Ana Dopazo, Vincent Soriano and Berta Rodés. *Characterization of host genetic expression patterns in HIV-infected individuals with divergent disease progression*. XVII International AIDS Conference. Mexico City. 3-8 August 2008
- Presentación Oral: Mariola Lopez, Norma Rallón, Alejandra Peris, **María Salgado**, Berta Rodés, Vincent Soriano, Juan González-Lahoz, Jose Miguel Benito. *Evolution of the functional profile of HIV-specific CD8+ T cells in a cohort of long term nonprogressors*. XVII International AIDS Conference. Mexico City. 3-8 August 2008
- Póster: Alejandra Peris-Pertusa, Mariola López, Norma Rallón, Clara Restrepo, **María Salgado**, Berta Rodés, Juan González-Lahoz, Vincent Soriano, and Jose Miguel Benito. *Different Evolution of the Functional Profile of HIV-specific CD8+ T Cells in Long-term Non-progressors and Patients with Progressive Immunodeficiency*. 16th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Montreal, Canada. 8-11 Febrero 2009.
- Póster: Mariola Lopez, Vincent Soriano, Sara Lozano, Alejandra Peris, Norma Rallón, Clara Restrepo, **María Salgado**, Berta Rodés, Juan Gonzalez-Lahoz, and Jose Miguel Benito. *Elite Controllers Show Higher Activation Levels of Different Subsets of CD8+ T Cells than Patients Successfully Treated with HAART*. 16th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Montreal, Canada. 8-11 Febrero 2009.
- Póster: **María Salgado**, Carlos Toro, Ainhoa Simón, Carolina Garrido, Francisco Blanco, Vincent Soriano and Berta Rodés. *Mutation N155H in HIV-2 integrase confers high phenotypic resistance to raltegravir*. 7th European HIV Drug Resistance Workshop. Stockholm, Sweden. 25 – 27 March, 2009.
- Póster: **María Salgado**, Ainhoa Simón, José Luis Vicario, Sonia Rodríguez-Novoa, Mariola López, Vincent Soriano, Berta Rodés. *Impact of HLA and related polymorphisms in the control of HIV infection in long-term-non-progressors and Elite controllers*. ECCMID 2009. Helsinki, Finland. 16-19 May, 2009.

Abreviaturas

- ADN:** Ácido Desoxirribonucleico
- ADPV:** Adictos a drogas por vía parenteral
- APOBEC3G:** *Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme-catalytic*, enzima citidin deaminasa
- ARN:** Ácido Ribonucleico
- ARNm:** Ácido Ribonucleico mensajero
- ARNt:** Ácido Ribonucleico de transferencia
- BSA:** *Bovine Serum Albumin*, albúmina sérica bovina
- CMSPs:** Células Mononucleares de Sangre Periférica
- CV:** Carga viral del VIH (nº copias RNA/ml)
- DC:** *Dendritic Cell*, célula dendrítica
- DMSO:** *Dimetil-Sulfoxide*, dimetil sulfóxido
- EDTA:** *Etilen-Diamine-Tetraacetic Acid*, Ácido etilendiaminotetraacético
- Fas:** Factor asociado a apoptosis
- FasL:** Ligando del factor asociado a apoptosis
- FITC:** *Fluorescein Isotiocyanate*, Isotiocianato de fluoresceína
- GALT:** *Gut-associated lymphoid tissue*. Tejido linfoide asociado a intestino.
- GRG:** Grupo de riesgo genético
- GWAS:** *Genome-wide association studies*, estudios de asociación a lo largo del genoma
- HLA:** *Human Leukocyte Associated Antigen*, antígeno leucocitario humano
- IFN:** Interferón
- IL:** Interleuquina
- KIR2DL3:** *Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor, two domains, long cytoplasmic tail, 3*, receptor 3 de las células NK de tipo inmunoglobulina con dos dominios
- LTNP:** “Long term non progressor”, pacientes progresores lentos
- LTR:** “Long Terminal Repeat”, secuencias terminales largas repetidas
- MHC:** *Major Histocompatibility Complex*, complejo mayor de histocompatibilidad
- MIP:** *Macrophage Inflammatory Protein*, proteína inflamatoria de macrófagos
- NCBI:** “National Center for Biotechnology Information”, Centro Nacional de Información Biotecnológica.
- NEF:** “*negative factor*”, factor negativo, proteína accesoria del VIH
- NK:** *Natural Killer Cell*, células asesinas naturales
- ORF:** *Open Reading Frame*, marco de lectura abierto
- PBS:** *Phosphate Buffered Saline*, tampón fosfato salino

- PCR:** *Polymerase Chain Reaction*, Reacción en cadena de la polimerasa
- PE:** *Phycoerythrin*, ficoeritrina
- PECY5:** *Phycoerythrin-Cyanine 5*, ficoeritrina-cianina 5
- PECY7:** *Phycoerythrin-Cyanine 7*, ficoeritrina-cianina 7
- PMA:** *Phorbol 12-Myristato 13-Acetato*
- R10:** Medio de cultivo RPMI suplementado con 10% de SBF, 2% de L-glutamina, 1% de penicilina/estreptomicina y 0.1% de gentamicina
- RANTES:** *Regulated on Activation Normal T-Cells Expressed and Secreted*
- RE:** Retículo Endoplásmico
- RT-PCR:** *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*, Reacción en cadena de la polimerasa en transcripción reversa.
- SIDA:** Síndrome de inmunodeficiencia adquirida.
- SBF:** Suero Bovino Fetal
- SNP:** *Single nucleotide polymorphisms*, polimorfismos de un solo nucleótido
- TARGA:** Terapia Antirretroviral de Gran Actividad
- TCR:** *T Cell Receptor*, receptor de la célula T
- TNF:** *Tumoral Necrosis Factor*, factor de necrosis tumoral
- Tc:** Linfocitos T citotóxicos
- TGF:** *Transforming Growth Factor*, factor transformador del crecimiento
- Th:** Linfocitos T helper o cooperadores
- Treg:** Células T reguladoras
- TSG101:** *Tumor susceptibility gene 101*.
- VIF:** *Viral infectivity factor*, Factor de infectividad viral, proteína accesoria del VIH.
- VIH:** Virus de la inmunodeficiencia Humana
- VPR:** *Viral protein R*, Proteína viral R, proteína accesoria del VIH
- VPU:** *Viral protein U*, Proteína viral U, proteína accesoria del VIH