Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Relevancia de la variabilidad genética del HIV-1 y del hospedador en el SIDA pediátrico: sistema Vif-APOBEC3

De Maio, Federico Andrés

2011

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
De Maio, Federico Andrés. (2011). Relevancia de la variabilidad genética del HIV-1 y del hospedador en el SIDA pediátrico: sistema Vif-APOBEC3. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
De Maio, Federico Andrés. "Relevancia de la variabilidad genética del HIV-1 y del hospedador en el SIDA pediátrico: sistema Vif-APOBEC3". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

Relevancia de la variabilidad genética del HIV-1 y del hospedador en el SIDA pediátrico: Sistema Vif-APOBEC3

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Biológica

Lic. Federico Andrés De Maio

Director de Tesis: Dra. Luisa Sen

Director Asistente: Dra. Andrea Mangano

Consejero de Estudios: Dra. Laura Alché

Lugar de trabajo: Laboratorio de Biología Celular y Retrovirus, Hospital de Pediatría "Prof. Dr. Juan P. Garrahan"

Buenos Aires, 2011

Resumen

Relevancia de la variabilidad genética del HIV-1 y del hospedador en el SIDA pediátrico: Sistema Vif-APOBEC3

Las proteínas APOBEC3 son citidina deaminasas que pueden determinar cambios G→A en la secuencia codificante de HIV-1, propiedad que les confiere una capacidad antiviral. Esta actividad puede ser contrarrestada por el virus al expresar la proteína Vif, la cual recluta un complejo ubiquitina ligasa basado en Culina5 que desestabiliza a las moléculas APOBEC3. La variabilidad genética tanto del virus como del hospedador puede afectar la eficiencia con la que se desarrollan estos procesos. Una elevada edición G→A puede resultar en la restricción de HIV-1 (fenómeno de mutagénesis letal denominado hipermutación), aunque cambios en niveles subletales podrían favorecer a la diversificación viral.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la variabilidad del sistema Vif-APOBEC3 en niños perinatalmente infectados por HIV-1, determinando su relevancia para el desarrollo de SIDA infantil.

Los polimorfismos *APOBEC3G* H186R, *APOBEC3G* C40693T y *CUL5* SNP6 no parecieron modificar el curso clínicos de la infección. En cambio, mutaciones en Vif (inserción de un aminoácido en posición 61 y las sustituciones V13I, V55T, A62D/N/S, L81M y Q136P) sí se relacionaron con diferencias en los tiempos de progresión a SIDA. Se hallaron además evidencias de que ciertos alelos de *APOBEC3G*/*CUL5* seleccionarían variantes particulares de Vif. Se determinó una baja frecuencia de casos con una población proviral constituida mayoritariamente por formas de HIV-1 hipermutadas. El grado de edición en niveles subletales exhibió diferencias entre variantes de *CUL5* y Vif.

En conclusión, la variabilidad del sistema Vif-APOBEC3 afectaría los tiempos de desarrollo de SIDA pediátrico y también los niveles de edición sufridos por HIV-1.

Palabras clave: HIV-1, Vif, *APOBEC3G*, *CUL5*, SIDA pediátrico

Abstract

Relevance of HIV-1 and host genetic variability to pediatric AIDS: Vif-APOBEC3 system

The APOBEC3 proteins are cytidine deaminases able to determine G→A changes in the HIV-1 coding sequence, a property that confers them antiviral capacity. This activity can be counteracted by the virus through the expression of the Vif protein, which recruits a Cullin5-based ubiquitin ligase complex that destabilizes APOBEC3 molecules. The genetic variability of both virus and host may affect the efficiency of these processes. A high G→A editing can result in the restriction of HIV-1 (phenomenon of lethal mutagenesis called hypermutation), although changes at sublethal levels could favor viral diversification.

The aim of the present work was to study the variability of the Vif-APOBEC3 system in perinatally HIV-1 infected children and to asses its relevance to the pediatric AIDS development.

The *APOBEC3G* H186R, *APOBEC3G* C40693T and *CUL5* SNP6 polymorphisms did not seem to modify the clinical course of infection. In contrast, Vif mutations (a one-amino-acid insertion at position 61 and substitutions V13I, V55T, A62D/N/S, L81M and Q136P) were related to different times of progression to AIDS. Evidences suggesting that certain *APOBEC3G*/*CUL5* alleles could select for particular Vif variants were also found. Cases showing a proviral population mainly composed by hypermutants were observed in a low frequency. The grade of editing at sublethal levels exhibited differences linked to *CUL5* and Vif variants.

In conclusion, the variability of the Vif-APOBEC3 system could affect the time of progression to pediatric AIDS and also the level of editing carried by HIV-1.

Key words: HIV-1, Vif, *APOBEC3G*, *CUL5*, pediatric AIDS

Agradecimientos

A Carolina, mi amada compañera de viaje.

A toda mi familia, con un recuerdo especial para mi papá.

A mis amigos, muchos presentes desde mis inicios en la facultad.

A los integrantes del Lab. de Biología Celular y Retrovirus y también del Servicio de Epidemiología e Infectología del Hospital Garrahan.

Dedico este trabajo de tesis a los pacientes y sus padres.

Parte de los resultados expuestos en la presente Tesis Doctoral han sido publicados en:

De Maio, F.A., Rocco, C.A., Aulicino, P.C., Bologna, R., Mangano, A., Sen, L., **2011**. Effect of HIV-1 Vif variability on progression to pediatric AIDS and its association with *APOBEC3G* and *CUL5* polymorphisms. Infect. Genet. Evol. 11, 1256-1262.

Los siguientes manuscritos se han enviado para publicación:

De Maio, F.A., Rocco, C.A., Aulicino, P.C., Bologna, R., Mangano, A., Sen, L.
Unusual substitutions in HIV-1 Vif from children infected perinatally that showed no progression to AIDS for more than 8 years without therapy. - La versión corregida de acuerdo con sugerencias de los revisores ya fue remitida.

De Maio, F.A., Rocco, C.A., Aulicino, P.C., Bologna, R., Mangano, A., Sen, L.
APOBEC3 mediated editing in HIV-1 from pediatric patients and its association with *APOBEC3G*/*CUL5* polymorphisms and Vif variability. - En proceso de corrección según sugerencias de revisores para próximamente enviar la versión modificada.

La presente Tesis Doctoral pudo llevarse a cabo gracias a los siguientes subsidios:

- Fondo Nacional para Ciencia y Tecnología (**FONCYT**), PICT N° 25830
- Consejo Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (**CONICET**), PIP N° 11220090100188

Listado de las principales abreviaturas usadas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

APOBEC3: *Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3*

ARN: Ácido ribonucleico

CMT: Células mononucleares totales (de sangre periférica)

Cul5: Culina5

cPPT: Tracto central de polipurina (*Central polypurine tract*)

HAART: Terapia antirretroviral de alta eficacia (*Highly active antiretroviral therapy*)

HIV-1: Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (*Human immunodeficiency virus type 1*)

INS: Inserción

LANL: *Los Alamos National Laboratory*

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase chain reaction*)

Vif: Factor de infectividad viral (*viral infectivity factor*)

RFLP: Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (*Restriction fragment length polymorphism*)

SIDA: Síndrome de Inmunodeficiencia adquirida

SNP: Polimorfismo de nucleótido simple (*single nucleotide polymorphism*)

1 INTRODUCCIÓN…….…….1

1.1 Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1 (HIV-1) − Generalidades……..2

1.1.1 Mecanismos de transmisión y patogénesis…….……2

1.1.2 Origen y diversidad genética…….…….……4

1.1.3 Ciclo de replicación…….……...5

1.1.4 Estructura genómica……...……7

1.2 Sistema Vif – APOBEC3……...……8

1.2.1 Funciones contrapuestas en la interacción virus-hospedador…….…8

1.2.2 Patrones observados en la edición mediada por APOBEC3……12

1.2.3 Relevancia clínica de la actividad APOBEC3……..15

1.2.4 Variabilidad del sistema Vif-APOBEC3 y progresión de la enfermedad…....17

2 OBJETIVOS……..…….....19

2.1 Objetivo general……..…….20

2.2 Objetivos específicos…….……..…….20

3 MATERIALES Y MÉTODOS…….22

3.1 Población estudiada…….23

3.2 Obtención de células mononucleares totales a partir de sangre periférica……25

3.3 Preparación de lisados de células mononucleares totales……25

3.4 Extracción de ADN genómico a partir de células mononucleares totales……..25

3.5 Cuantificación del ADN……..26

3.6 Genotipificación de *APOBEC3G* y *CUL5*…….……..…26

3.7 Genotipificación de HLA-B……..…. 29

3.8 Amplificación y secuenciación de HIV-1…….…..29

3.9 Números de acceso para las secuencias nucleotídicas……..…31

3.10 Análisis de secuencias……...….31

3.11 Detección de edición mediada por APOBEC3……..……..33

3.12 Determinación de carga viral …….…….35

3.13 Recuentos de células T CD4+……...…....35

3.14 Análisis estadístico…….……35

4 RESULTADOS……..……37

Capítulo 1

4.1 Relevancia de los polimorfismos en los genes *APOBEC3G* / *CUL5* del hospedador y de la variabilidad del gen *vif* de HIV-1 en el SIDA pediátrico……..38

4.1.1 Asociación de los genotipos de *APOBEC3G* y *CUL5* con la transmisión vertical de HIV-1 y la progresión a SIDA pediátrico……...…….38

4.1.2 Variabilidad de Vif y progresión a SIDA pediátrico……...….41

4.1.3 Asociación de los SNPs de *APOBEC3G* y *CUL5* con las variantes de Vif.....46

Capítulo 2

4.2 Detección de provirus de HIV-1 hipermutados en pacientes pediátricos…..…..48

Capítulo 3

4.3 Edición mediada por APOBEC3 en HIV-1 de pacientes pediátricos y su asociación con polimorfismos en *APOBEC3G* / *CUL5* y la variabilidad de *vif*……51

4.3.1 Análisis de la edición mediada por APOBEC3……..….....……..51

4.3.2 Edición mediada por APOBEC3 y polimorfismos de *APOBEC3G* / *CUL5*…53

4.3.3 Edición mediada por APOBEC3 y variabilidad de Vif…….….....56

4.3.4 Edición mediada por APOBEC3 y progresión a SIDA pediátrico……...58

4.3.5 Edición mediada por APOBEC3 y divergencia filogenética viral……...…60

Capítulo 4

4.4 Análisis de *vif* en progresores lentos pediátricos……....….62

4.4.1 Pacientes de interés: Identificación de progresores lentos y sus características.....62

4.4.2 Secuencias nucleotídicas de *vif* en progresores lentos: Filogenia, conservación estructural, heterogeneidad e hipermutación…….....64

4.4.3 Secuencias aminoacídicas de Vif en progresores lentos: Detección de cambios distintivos, su frecuencia en base de datos y regiones afectadas…….…….....65

4.4.4 Evaluación de las sustituciones inusuales en Vif de progresores lentos como variantes de escape……..…….....71

5 DISCUSIÓN……..…..72

5.1 Variabilidad del sistema Vif-APOBEC3 y SIDA pediátrico……..….…73

5.2 Edición mediada por APOBEC3 en HIV-1 de pacientes pediátricos…..…...…81

5.3 Alteraciones en Vif de HIV-1 y progresión lenta de la enfermedad en pacientes pediátricos…..……...…85

6 CONCLUSIONES…….……...88

7 REFERENCIAS……90

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1 (HIV-1) – Generalidades

1.1.1 Mecanismos de transmisión y patogénesis

La transmisión del HIV-1 requiere de la exposición directa a material infectado en presencia de lesiones en la piel o abrasiones en tejido mucoso. En los individuos portadores del virus, éste se halla en la sangre, en el fluido seminal y preeyaculatorio, en las secreciones vaginales y en la leche materna. Actualmente, la transmisión del HIV-1 se produce en la enorme mayoría de los casos por la vía sexual. Sin embargo, también ocurren la transmisión parenteral (vía transfusional o en usuarios de drogas endovenosas) y la transmisión madre-hijo (perinatalmente, es decir, intraútero, al momento del parto o por lactancia) [Bugarín et al., 2007].

Producido el contagio, el HIV-1 infecta y determina la muerte de linfocitos T CD4+ y macrófagos, células clave del sistema inmune. Como consecuencia se da un progresivo deterioro de la respuesta inmunológica que se manifiesta clínicamente con la aparición de diversas infecciones oportunistas y también de patologías oncológicas, eventos que marcan el desarrollo del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) **(Fig. I1)**. El curso natural de la enfermedad varía enormemente entre personas infectadas. En adultos, algunos casos pueden mostrar tan sólo unos 6 meses entre la infección primaria y el diagnóstico de SIDA, pero también se han verificado casos con períodos de hasta unos 25 años sin evidencias de una progresión de la enfermedad [Kuritzkes y Walker, 2007]. En el escenario pediátrico, la infección perinatal conduce usualmente a un desarrollo rápido de la enfermedad, con manifestaciones sintomáticas tempranas que pueden darse en torno a los cuatro meses desde el nacimiento, o más tardíamente, hacia los cinco años de edad [Bologna, 2007]. Afortunadamente, el

desarrollo de diversas drogas antirretrovirales y su administración en forma combinada (terapia HAART, siglas en inglés de *highly active antiretroviral therapy* o terapia antiretroviral de alta eficacia) han mejorado enormemente el pronóstico clínico y la calidad de vida de los pacientes infectados [Berk et al., 2005; Kuritzkes y Walker, 2007].

Aunque los motivos para las diferencias en los tiempos de desarrollo de la enfermedad no están del todo claros, más allá de los factores ambientales, las características genéticas tanto del virus como del hospedador jugarían un rol clave [Poropatich y Sullivan, 2011].

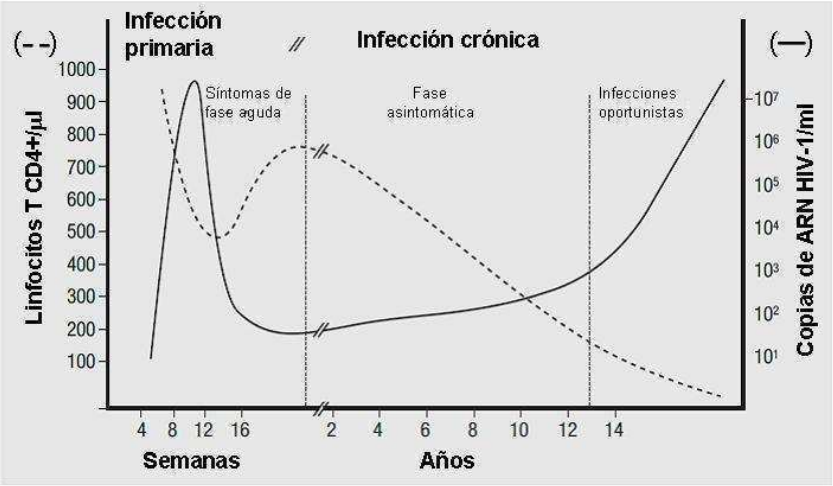

Figura I1. Curso de la enfermedad en la infección por HIV-1. Dentro de las pocas semanas desde la exposición al HIV-1, la mayoría de los individuos infectados presentan una sintomatología inespecífica (fiebre, dolores musculares y articulares, rash, faringitis, pérdida de peso, etc.). Esto se acompaña por una caída en los recuentos de células CD4+ y un elevado pico de viremia. Al establecerse una respuesta inmune específica, los valores de las células CD4+ muestran una recuperación (aunque no se alcanzan los niveles iniciales) y la carga viral exhibe un descenso. Luego suele pasarse a un período clínico asintomático que puede extenderse por años, durante el cual la replicación de HIV-1 persiste mientras se da una disminución progresiva de los niveles de células CD4+. Finalmente, el deterioro del sistema inmune se refleja por la aparición de infecciones oportunistas, que definirían el estadio de SIDA, pero también de patologías neoplásicas. Adaptado de Fanales-Belasio et al. [2010].

1.1.2 Origen y diversidad genética

Luego del aislamiento y caracterización inicial de HIV-1 a principios de la década de 1980, virus relacionados se descubrieron en especies de simios y fueron designados como Virus de Inmunodeficiencia Simiana (SIV). Distintos estudios establecerían la vinculación filogenética entre HIV-1 y el SIV encontrado en chimpancés (SIV_{cpz}) **(Fig. I2)**. Eventos zoonóticos habrían determinado un salto de especie ocurrido en el centro de África que finalmente resultó en la actual pandemia [Freed y Martin, 2007].

Se reconocen para HIV-1 distintos clados o grupos filogenéticos, siendo el llamado grupo M el que abarca a más del 95% de las variantes presentes a nivel global. Este grupo M se divide a su vez en numerosos subtipos diferentes (A1, A2, B, C, D, F1, F2, G, H, J y K), existiendo también múltiples formas recombinantes intersubtipo (http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HelpDocs/subtypes-more.html). Su abundancia presenta importantes variaciones geográficas. En la Argentina, los virus predominantes corresponden al subtipo B o son recombinantes B/F1 (http://www.hiv.lanl.gov/components/sequence/HIV/geo/geo.comp).

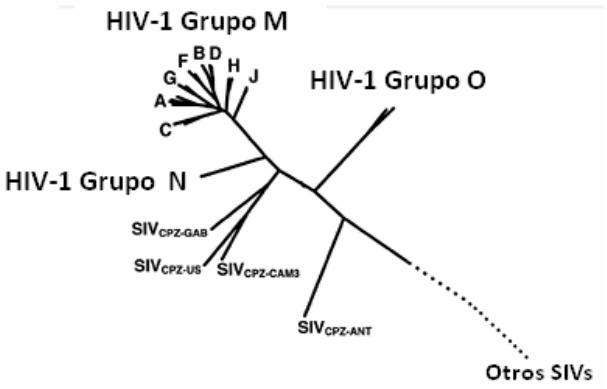

Figura I2. Origen y diversidad genética. Se ilustra la relación filogenética de HIV-1 con SIV de chimpancé, como también los numerosos subtipos de HIV-1 presentes dentro del Grupo M (dominante en la pandemia). Se indican además los mucho menos frecuentes Grupos N y O, a los que se sumaría el recientemente descripto Grupo P. Modificado de Freed y Martin [2007].

1.1.3 Ciclo de replicación

El HIV-1 pertenece a la familia *Retroviridae*. Se trata de una familia de virus envueltos cuyos miembros se caracterizan por presentar un particular ciclo de replicación que los diferencia marcadamente del resto de los virus. Sus partículas virales contienen genomas a ARN simple cadena de polaridad positiva **(Fig. I3)**, moléculas que son retrotranscriptas al ingresar a una célula blanco. Se produce entonces un genoma a ADN doble cadena que se integra luego en un cromosoma del hospedador. La forma integrada del ADN viral, denominada provirus, sirve luego de molde para la síntesis de distintas moléculas de ARN viral que determinarán la formación de nuevos viriones **(Fig. I4)**. Estas dos propiedades (flujo inverso de la información genética e integración) constituyen el sello distintivo de la familia de los retrovirus [Goff, 2007].

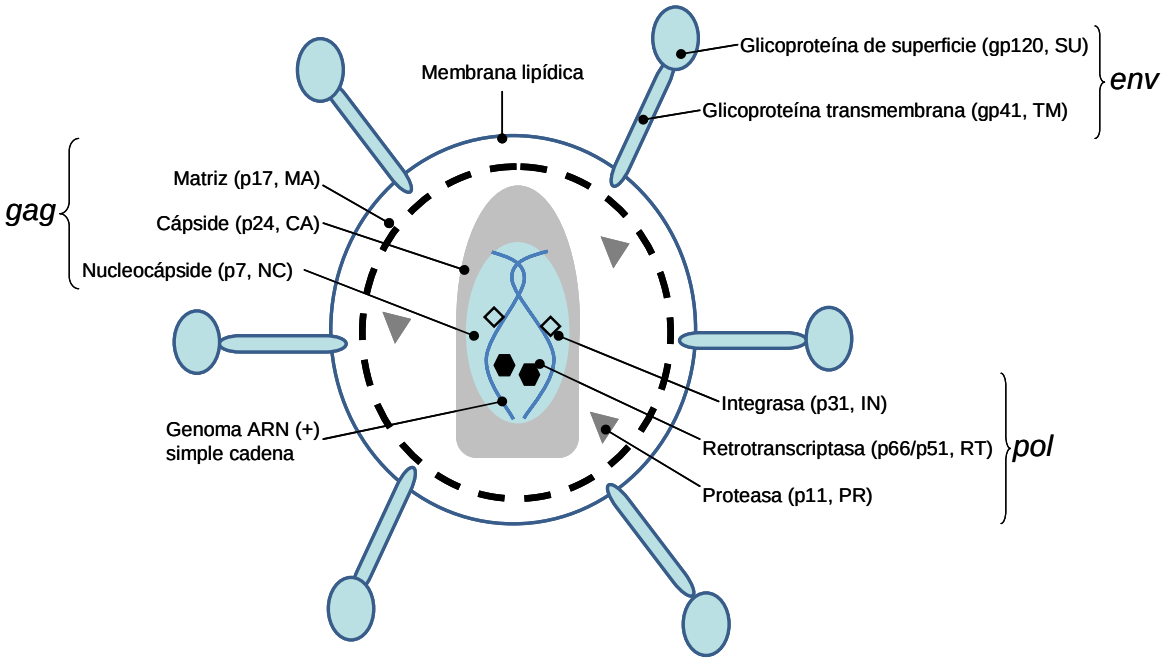

Figura I3. Representación esquemática de una partícula viral madura de HIV-1. Se detallan las principales proteínas constituyentes del virión, indicándose también los genes codificantes para sus precursores (*gag*, *pol*, *env*). Nótese la presencia en la partícula de dos copias del genoma del virus, como ARN (+). Modificado de Freed y Martin [2007].

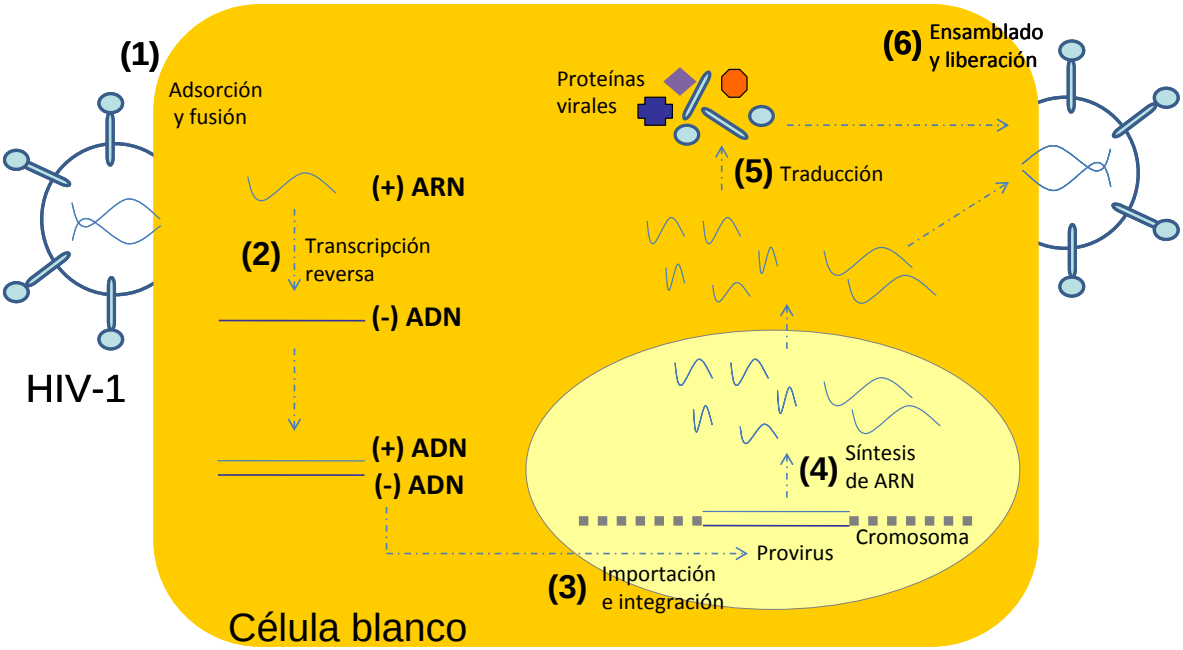

Figura I4. Ciclo de replicación de HIV-1. El proceso inicia cuando las partículas virales se adsorben a través de las proteínas de la envoltura a receptores específicos de la membrana celular, lo cual determina la fusión de membranas y el ingreso del material genético del virus a la célula blanco (1). El proceso de transcripción reversa se desarrolla en el citoplasma celular, sintetizándose a partir del genoma viral a ARN (+) una hebra de ADN (-), que finalmente resulta en un genoma de ADN doble cadena (2). El ADN viral así generado podrá importarse al núcleo para integrarse como provirus en un cromosoma de la célula hospedadora (3). A partir del provirus se sintetizarán ARN genómicos virales y distintos ARN mensajeros (4). La traducción de estos últimos determinará la producción de nuevas proteínas virales (5), el ensamblado de partículas y su final liberación (6). Modificado de Freed y Martin [2007].

1.1.4 Estructura genómica

Los retrovirus pueden dividirse en dos grupos: retrovirus simples y retrovirus complejos. Los retrovirus simples codifican para los factores Gag, Pro, Pol y Env. Se trata de productos génicos con función estructural (Gag y Env) o enzimática (Pro y Pol) indispensables para la replicación de cualquier retrovirus. Los retrovirus complejos cuentan además con una serie de genes accesorios codificantes para pequeñas proteínas que desempeñan funciones diversas durante la infección [Goff, 2007]. Uno de los géneros dentro de los retrovirus complejos es el de los Lentivirus, el cual incluye al HIV-1. Como casi todos los lentivirus, HIV-1 presenta entre sus genes accesorios al denominado gen *vif* (siglas en inglés para factor de infectividad viral) **(Fig. I5)**. Se ha demostrado que su producto, la proteína Vif, jugaría un rol clave para la replicación del virus al limitar la acción antiviral de los factores celulares de restricción APOBEC3 (del inglés *apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3*). Esta interacción entre virus y hospedador a través del sistema Vif-APOBEC3 (descripta hace ya casi una década por Sheehy et al. [2002]) es el objeto de estudio del presente trabajo, por lo que a continuación se tratará en detalle.

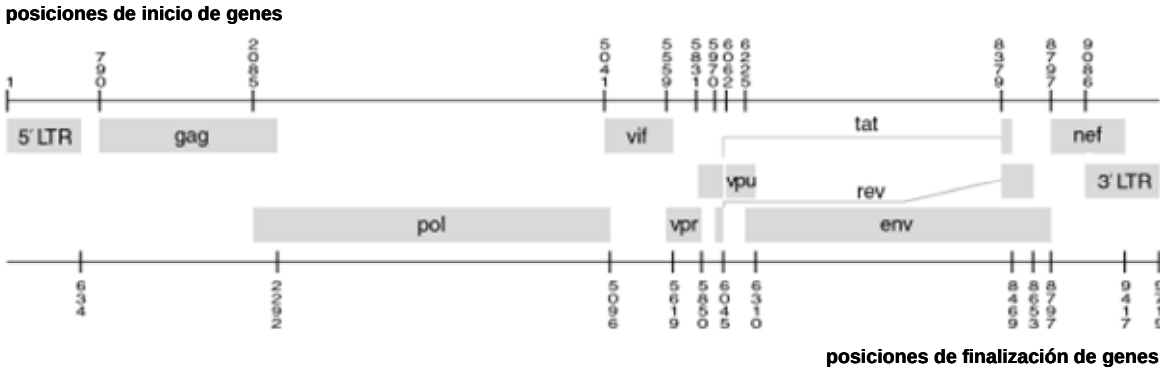

Figura I5. Genoma de HIV-1. Los genes *gag* y *env* codifican para componentes estructurales del virión. El gen *pol* codifica para factores enzimáticos, como la proteasa viral, la retrotranscriptasa y la integrasa. Se observan los genes accesorios *tat, rev, vif, vpr, vpu* y *nef*. La secuencia LTR contiene elementos que regulan la expresión del provirus. Posiciones indicadas según cepa de referencia HXB2 (K03455). Modificado de http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/MAP/landmark.html.

1.2 Sistema Vif – APOBEC3

1.2.1 Funciones contrapuestas en la interacción virus-hospedador

La familia APOBEC3 de citidina deaminasas es considerada parte del sistema de defensa innato del hospedador e incluye siete proteínas (producto de igual número de genes en cromosoma 22) con la capacidad de editar ADN simple cadena introduciendo cambios C→U **(Fig. I6)** [Albin y Harris, 2010]. Sus miembros APOBEC3G y APOBEC3F (y más recientemente APOBEC3H) han sido intensamente estudiados respecto de su habilidad para restringir la replicación de HIV-1. Estas proteínas pueden ser incorporadas en los viriones y actuar editando la hebra negativa del ADN viral durante etapas previas a la integración. El resultado de este proceso se manifiesta como transiciones G→A en la secuencia codificante del virus **(Fig. I7a)**. El grado de edición sufrido por un genoma puede no superar el nivel subletal, sin que el potencial replicativo del HIV-1 se vea limitado, pero se alcanza también el extremo en que la carga de cambios G→A origina una forma inviable [Pillai et al., 2008; Sadler et al., 2010]. Este último caso de edición severa se denomina "hipermutación", fenómeno con claro efecto antiviral que propicia la acumulación de provirus dañados por una mutagénesis letal. Así, los genomas de HIV-1 hipermutados quedarán archivados como formas integradas y muy difícilmente podrán ser detectados como virus libres [Russell et al., 2009]. Por otra parte, las proteínas APOBEC3 podrían también interferir con la replicación de HIV-1 mediante mecanismos que no requieren de la deaminación, como lo sería la inhibición de la transcripción reversa **(Fig. I7a)**. Por tanto, la capacidad antiviral de estos factores podría tener dos distintos componentes, uno dependiente y otro independiente de su actividad enzimática [Henriet et al., 2009].

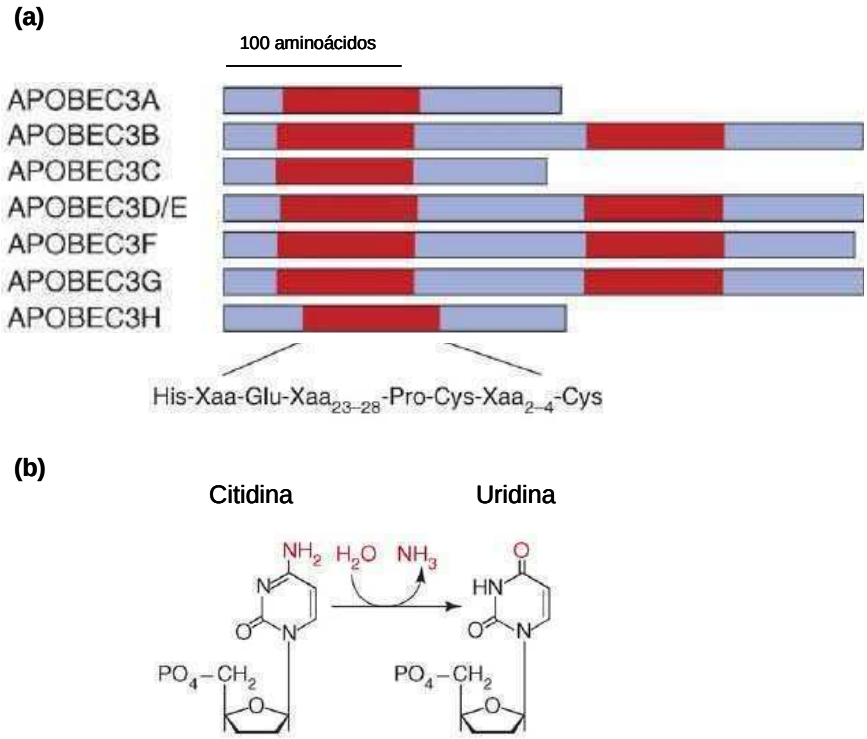

Figura I6. Miembros de la familia APOBEC3. Se esquematizan las siete proteínas con detalle del motivo citidina deaminasa consenso. Obsérvese la presencia de dos de estos motivos en algunos de las moléculas APOBEC3 **(a)**. Se ilustra la reacción C→U catalizada en los eventos de edición de ADN simple cadena **(b)**. Modificado de Holmes et al. [2007].

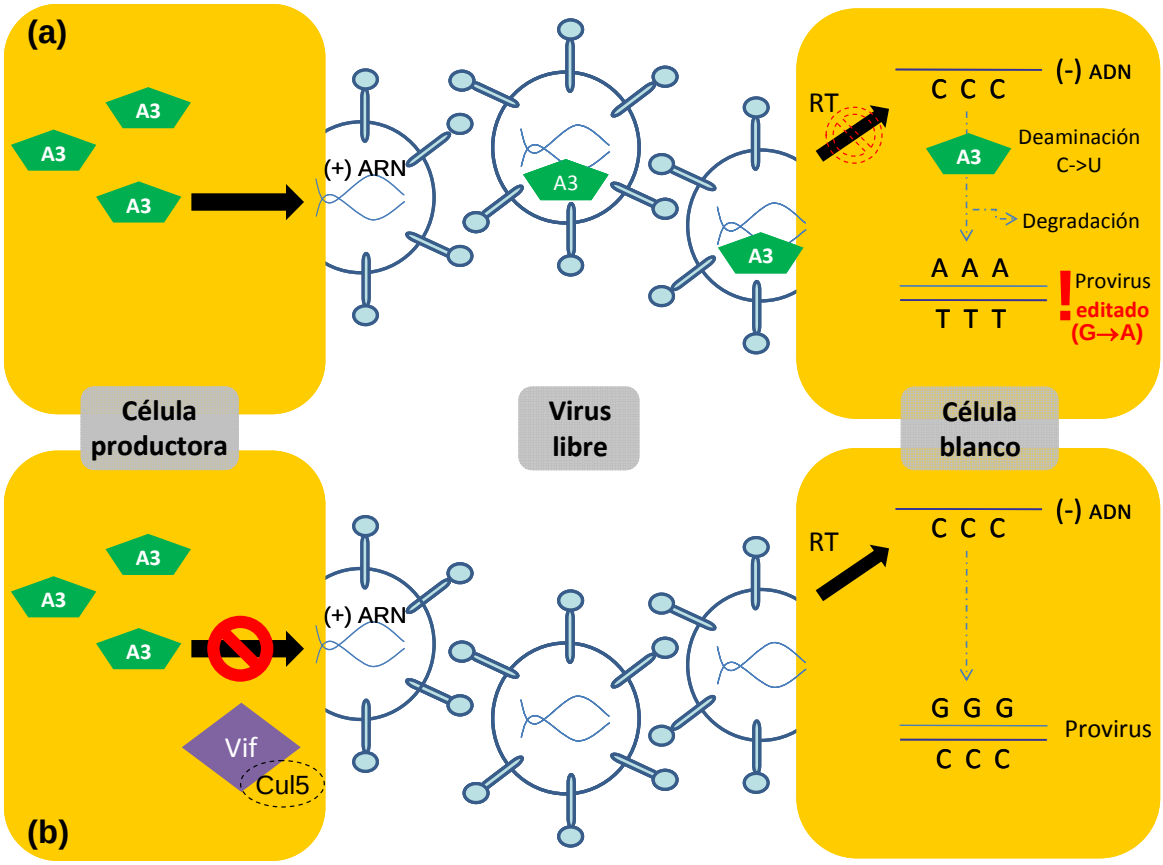

Figura I7. Mecanismo antiviral de los factores APOBEC3 y actividad de Vif. En células infectadas las proteínas APOBEC3 pueden incorporarse en las partículas virales en formación, lo cual resulta en virus libres cargando con estas moléculas en su interior. Los factores APOBEC3 actuarán en nuevas células blanco inhibiendo el proceso de retrotranscripción y/o editando genomas virales (algunos de los cuales se degradarían) antes de su integración como provirus **(a)**. La actividad de Vif, al reclutar un complejo ubiquitin ligasa basado en Cul5, determina un descenso en los niveles de APOBEC3 que dificultaría su ingreso a los viriones. De esta manera, HIV-1 completaría su ciclo de replicación evadiendo la acción de los factores de restricción **(b)**.

El gen *vif* de HIV-1 desempeña un rol contraofensivo ante la acción APOBEC3. Su producto, la proteína Vif, recluta un complejo E3 ubiquitina (Ub) ligasa conformado por Culina5 (Cul5), ElonguinaB (EloB), ElonguinaC (EloC) y Rbx2, reconociendo al mismo tiempo a las moléculas APOBEC3 para determinar su degradación por la vía proteasómica **(Fig. I8)** [Henriet et al., 2009]. La consecuente reducción del nivel intracelular de las proteínas APOBEC3 evitaría su entrada en los viriones **(Fig. I7b)**. Sin embargo, aunque la protección por parte de Vif de los genomas de HIV-1 es clave para la infectividad del virus, ésta puede exhibir importantes variaciones en su eficiencia. Dependiendo de cuán intensa sea la actividad APOBEC3 impuesta por el hospedador, la barrera defensiva erigida por Vif puede presentar brechas.

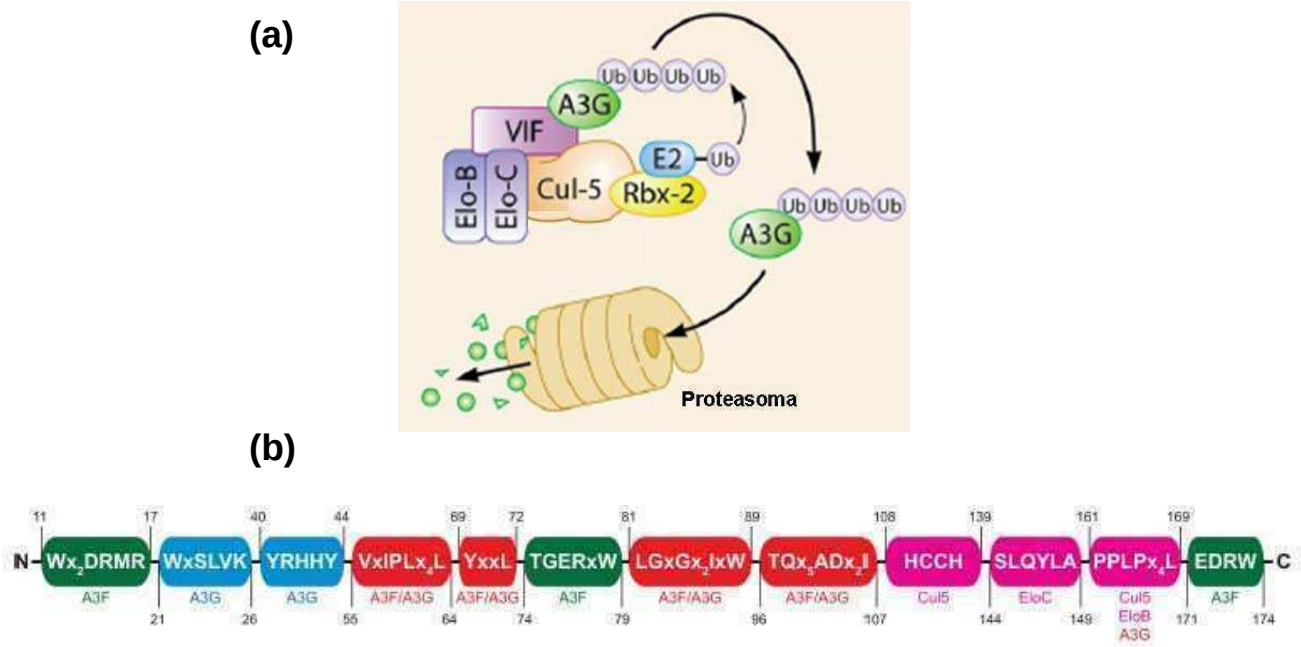

Figura I8. Múltiples interacciones establecidas por Vif. Se aprecia el complejo ubiquitina ligasa basado en Cul5 que es reclutado para determinar la degradación en proteasoma de las proteínas APOBEC3. Modificado de Henriet et al. [2009] **(a)**. Mapa de Vif donde se indican los motivos relevantes para las interacciones con APOBEC3G y/o APOBEC3F (consideradas las deaminasas de mayor potencia antiviral), además de las regiones implicadas en la unión con la maquinaria de ubiquitinación. Tomado de Dang et al. [2010b] **(b)**. Cul5: Culina5, EloB: ElonguinaB, EloC: ElonguinaC, Ub: Ubiquitina, A3G: APOBEC3G, A3F: APOBEC3F.

En tanto está claramente establecido que el mecanismo previamente descripto constituye la principal función de Vif, otros roles han sido reportados para esta proteína accesoria de HIV-1. Se ha demostrado que Vif se une con el precursor Gag, la proteasa viral y también el ARN genómico del virus [Henriet et al., 2009]. Mediante una compleja interacción con todos estos factores, Vif es reclutado en la partícula viral y tendría la capacidad de modular su maduración. La participación de Vif en el ensamblado del virión podría ser importante para interferir con el empaquetamiento de las proteínas APOBEC3. Interesantemente, Vif podría también inhibir la traducción de APOBEC3G uniéndose a su ARN mensajero [Mercenne et al., 2010]. Además, Vif sería un componente integral del complejo de transcripción reversa, en el que podría estimular la actividad polimerasa al trabajar como un cofactor de la retrotranscriptasa [Kataropoulou et al., 2009]. Asimismo, se ha reportado que Vif podría alterar el ciclo celular e inducir citopaticidad en las células infectadas [Sakai et al., 2006; DeHart et al., 2008], reorganizar el citoesqueleto [Henriet et al., 2009] y también interferir con la respuesta antiviral por dirigir al factor regulatorio de interferón 3 (siglas en inglés IRF3) a su degradación [Okumura et al., 2008]. De esta manera, la eficiencia de Vif en múltiples actividades sería importante para la capacidad de HIV-1 de replicar en pacientes infectados.

1.2.2 Patrones observados en la edición mediada por APOBEC3

La actividad mutagénica APOBEC3 se da sobre contextos nucleotídicos específicos, dejando por tanto un sello distintivo sobre los genomas de HIV-1 editados. La proteína APOBEC3G deamina preferentemente la segunda C en un dinucleótido C<u>C</u> (se subraya base afectada), lo cual se manifiesta como un cambio <u>G</u>G→<u>A</u>G sobre la

hebra positiva del virus. Por otra parte, APOBEC3F (y también APOBEC3H) actúa editando el dinucleótido TC, apreciándose entonces una mutación GA→AA en la secuencia codificante de HIV-1 [Albin y Harris, 2010].

Al mismo tiempo, la susceptibilidad a la edición mediada por APOBEC3 no es regular a lo largo de todo el genoma de HIV-1, sino que presenta importantes variaciones. Se ha descripto una probabilidad de mutación G→A que cambia en función de la distancia entre el sitio pasible de ser editado y los denominados tractos de polipurina (siglas en inglés PPT) [Armitage et al., 2008; Suspène et al., 2006]. Los tractos de polipurina son secuencias cortas, compuestas por A+G, cuya presencia en el ARN genómico de los retrovirus es necesaria para completar la formación del ADN doble cadena a integrarse como provirus. Dos de estos elementos de unos 16 pb están presentes en HIV-1. Uno de ellos está ubicado en la parte central del genoma, específicamente en la zona codificante para la integrasa (IN) dentro del gen *pol*, denominándoselo tracto central de polipurina (cPPT). El segundo tracto se ubica hacia el extremo 3´ del genoma, sobre el gen *nef* (3´PPT). Luego de que la hebra negativa de ADN ha sido generada por retrotranscripción, se produce la degradación del ARN genómico viral. Sin embargo, segmentos correspondientes a ambos PPT persisten como remanentes y actúan de *primers* para la síntesis de la hebra positiva de ADN. Hasta tanto este proceso no se haya completado, habrá extensiones de la hebra negativa de ADN que permanecerán en estado de simple cadena y estarán expuestas a la actividad citidina deaminasa (C→U) de los factores APOBEC3. Las huellas de esta acción se verán finalmente como cambios G→A en la secuencia complementaria. Por lo tanto, dada la cinética de síntesis de la hebra de ADN positiva a partir de los PPT, las regiones adyacentes a estos elementos hacia 5´ son máximos para la probabilidad de edición por permanecer mayor cantidad de tiempo como simple cadena.

Contrariamente, las regiones contiguas a los PPT hacia 3´ constituirán mínimos para la probabilidad de edición por ser las que más tempranamente se tornan ADN doble cadena **(Fig. I9)** [Hu et al., 2010; Suspène et al., 2006; Wurtzer et al., 2006].

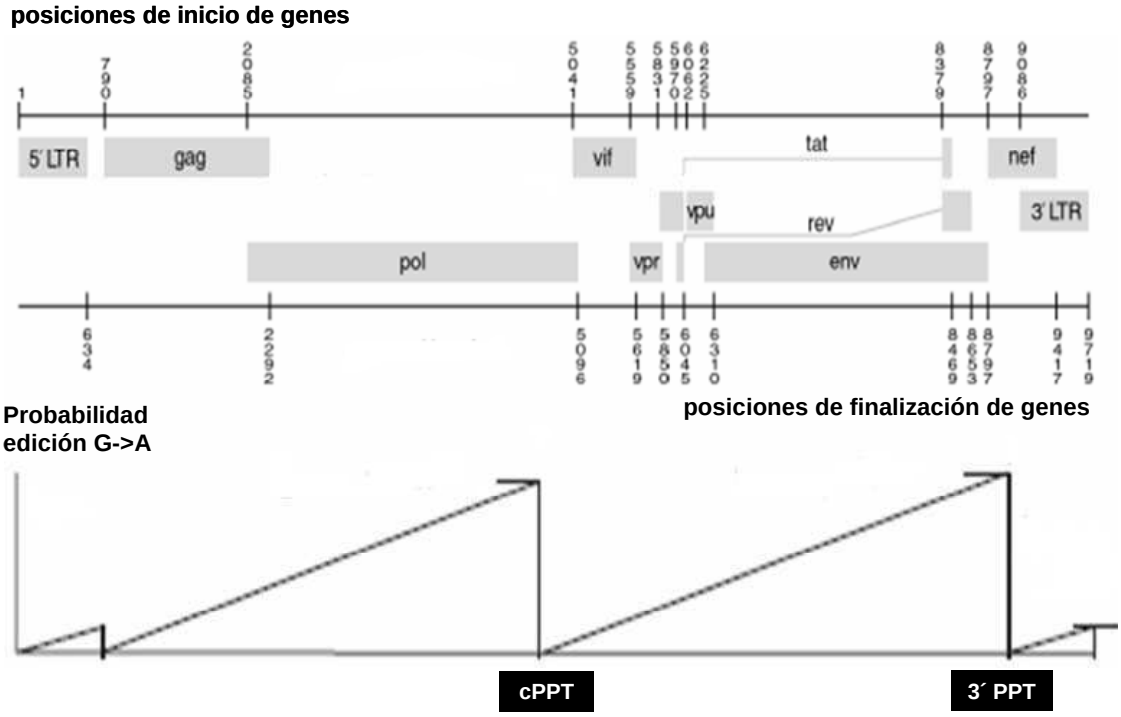

Figura I9. Susceptibilidad a la actividad APOBEC3 en distintas regiones genómicas de HIV-1. Se observan dos gradientes para la probabilidad de edición, alcanzándose los máximos justo hacia 5´ de los PPT (elementos de 16 pb). Modificado de Suspène et al. [2006].

1.2.3 Relevancia clínica de la actividad APOBEC3

La presencia de formas hipermutadas en una fracción importante de la población proviral (tal que la detección del fenómeno se hace posible mediante secuenciación poblacional o directa) parece vincularse con una progresión más lenta de la enfermedad. Así fue sugerido por diferentes estudios en los que se destacó la importancia clínica de la hipermutación, habiéndose verificado que en individuos infectados por HIV-1 una abundancia de provirus hipermutados correlaciona negativamente con la carga viral [Pace et al., 2006; Vázquez-Pérez et al., 2009] y positivamente con el recuento de células T CD4+ [Land et al., 2008]. En cambio, no está claro cuál sería la relevancia de fracciones minoritarias de genomas hipermutados, más aún teniendo en cuenta que virus hipermutados podrían ser rescatados de casi todos los individuos infectados [Janini et al, 2001; Kieffer et al., 2005].

Por otra parte, recordemos que los niveles de edición pueden cubrir un amplio rango antes de que el genoma afectado pueda considerarse como hipermutado y resulte inviable. Estos niveles subletales de edición pueden constituir una fuente de variabilidad adicional, influyendo sobre la evolución de HIV-1 por contribuir a su diversificación y propiciar así el surgimiento de variantes de escape al sistema inmune o drogas antirretrovirales **(Fig. I10)** [Fourati et al., 2010; Kim et al., 2010; Mulder et al., 2008; Wood et al., 2009]. Este último aspecto de la edición mediada por APOBEC3 hace que sea considerada como una espada de doble filo.

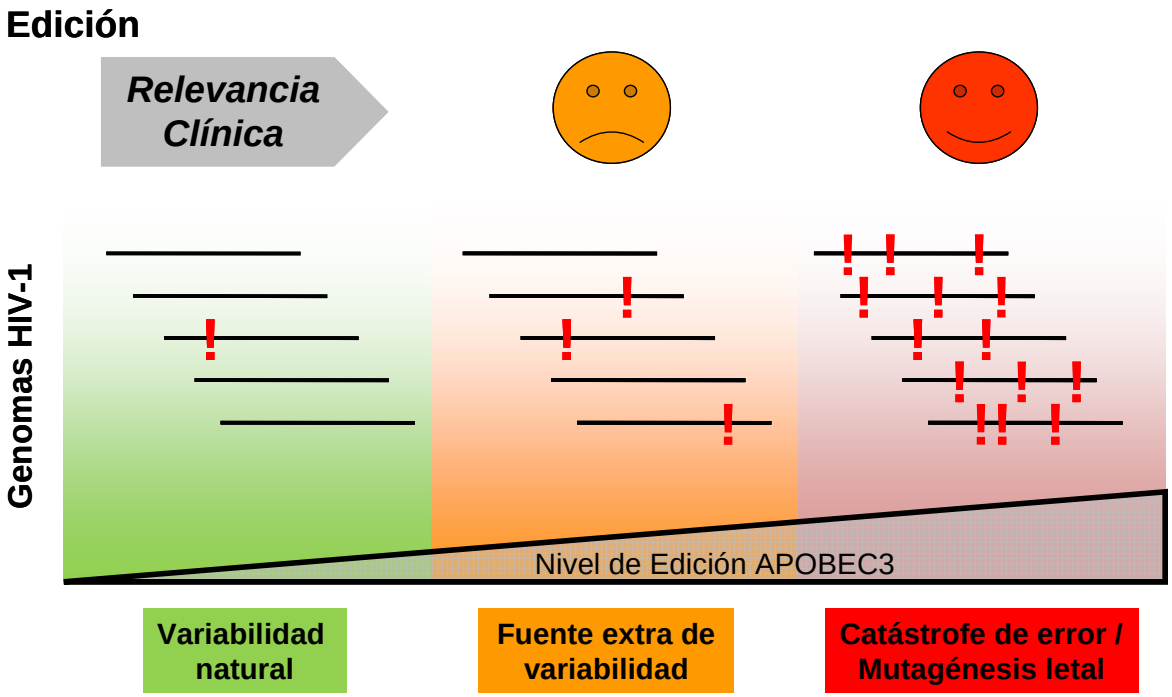

Figura I10. Edición del genoma de HIV-1 mediada por APOBEC3 y su relevancia clínica. Niveles de edición mínimos (cambios G→A indicados con **!**) no apartarían al virus de su zona de variabilidad natural. Un ligero incremento podría proveer a la población viral de una fuente extra de variabilidad que facilitaría su escape al sistema inmune y a las drogas antirretrovirales, impactando negativamente en la condición clínica del individuo infectado. Un alto nivel de edición determinaría la hipermutación de HIV-1, empujándolo hacia una zona de catástrofe de error en la que se inhibe la replicación viral con un consecuente beneficio para el hospedador. Modificado de Pillai et al. [2008].

1.2.4 Variabilidad del sistema Vif-APOBEC3 y progresión de la enfermedad

En años recientes, los componentes del sistema Vif-APOBEC3 han sido objeto de intensa investigación en lo referente a su variabilidad genética, en un intento por determinar su posible influencia sobre el curso de la enfermedad [Albin y Harris, 2010]. En tal sentido, se ha reportado que la variabilidad del gen *APOBEC3G* afectaría la susceptibilidad a la infección por HIV-1 y la tasa de progresión a SIDA. El polimorfismo de nucleótido simple (siglas en inglés SNP) *APOBEC3G* H186R (un cambio A→G en el exón 4, rs8177832) ha sido asociado con una progresión acelerada de la enfermedad en adultos infectados de ascendencia africana pero no en aquellos de ascendencia europea [An et al., 2004; Do et al., 2005; Reddy et al., 2010]. Sin embargo, no se halló evidencia de un efecto de esta variante alélica sobre la transmisión viral [An et al., 2004; Reddy et al., 2010; Valcke et al., 2006]. Además, el SNP *APOBEC3G* C40693T (un cambio en el intrón 4, rs17496018) ha sido asociado con un riesgo de infección incrementado en una cohorte de adultos caucásicos, aunque su impacto sobre la progresión de la enfermedad no ha sido evaluado [Valcke et al., 2006]. La relevancia de la variabilidad del gen *CUL5* también ha sido analizada, habiéndose reportado que *CUL5* SNP6 (un cambio A→G en el intrón 3, rs11212495) acelera la progresión a SIDA en afroamericanos pero no en europeoamericanos adultos, sin alterar el riesgo de infección [An et al., 2007].

La variabilidad de *vif* de HIV-1 ha sido estudiada en relación a la tasa de progresión de la enfermedad, fundamentalmente en la búsqueda de alteraciones génicas determinantes de una atenuación viral en casos que exhiben una enfermedad de curso lento o bien no progresiva. Reportes esporádicos han vinculado deleciones groseras [Rangel et al., 2009; Sandonís et al., 2009], inserciones [Alexander et al., 2002; Rangel

et al., 2009] y diferentes sustituciones [Farrow et al., 2005; Hassaine et al., 2000; Rangel et al., 2009] con un desarrollo retrasado de SIDA, aunque la importancia precisa de mutaciones en *vif* para el status clínico permanece sin ser clara [Miura et al., 2008].

Además, diversos trabajos han tratado de conectar el nivel de edición en HIV-1 con variantes genéticas de *APOBEC3* y/o *vif*, pero en su mayoría han arrojado sólo asociaciones débiles y no concluyentes [Gandhi et al., 2008; Gourraud et al., 2011; Pace et al., 2006; Piantadosi et al., 2009; Ulenga et al., 2008].

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

El objetivo general del proyecto es investigar la relevancia de las características genéticas del HIV-1 y de su hospedador para el desarrollo de SIDA pediátrico, focalizándonos en el sistema Vif-APOBEC3.

2.2 Objetivos específicos

(1) Analizar la **variabilidad del gen *vif*** de HIV-1 en niños infectados por transmisión vertical en relación con el tiempo de progresión a SIDA.

(2) Establecer la frecuencia en nuestra población de diferentes **polimorfismos de genes celulares del sistema Vif-APOBEC3**, estudiando la relevancia de estas variantes para el riesgo de infección perinatal y el desarrollo de SIDA infantil.

(3) Investigar la ocurrencia de **edición mediada por APOBEC3** en provirus de HIV-1 presentes en pacientes pediátricos, indagando sobre su asociación con el curso clínico de la enfermedad.

Adicionalmente, se pretende explorar las posibles asociaciones que la variabilidad del virus, la variabilidad del hospedador y la edición APOBEC3 mantengan entre sí. De esta manera se persigue evaluar en forma integral la importancia del sistema Vif-APOBEC3 en la infección pediátrica por HIV-1, considerando de manera conjunta la multiplicidad de factores involucrados **(Fig. O1)**.

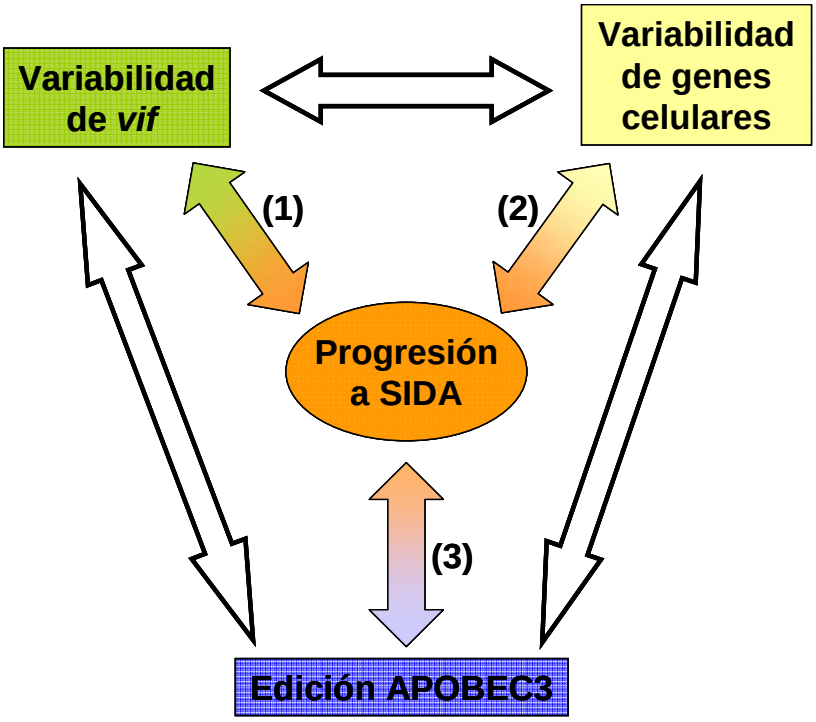

Figura O1. Factores vinculados al sistema Vif-APOBEC3 y finalidades del estudio. Los objetivos específicos principales refieren a la asociación que el tiempo de progresión a SIDA pueda mantener con la variabilidad de *vif*, la variabilidad de genes celulares o la edición viral mediada por APOBEC3 (flechas 1, 2 y 3). Además, se busca analizar la relación que estos tres factores puedan mostrar entre sí (flechas blancas) para completar una evaluación integral.

3 MATERIALES

Y MÉTODOS

3.1 Población estudiada

El estudio fue realizado en población pediátrica de constitución étnica hispano-caucásica de Argentina. A partir de una cohorte general de aproximadamente 600 niños infectados perinatalmente por HIV-1, se practicó inicialmente un muestreo que incluyó 425 pacientes nacidos entre 1986 y 1999 **(Fig. M1a)**. Se consideraron además 109 casos en los que la exposición perinatal al HIV-1 no resultó en infección (expuestos no infectados) **(Fig. M1b)**. Todos estos niños recibieron atención médica en el Hospital de Pediatría "Juan P. Garrahan" (Buenos Aires, Argentina). El diagnóstico de infección por HIV-1 y la definición de SIDA se establecieron de acuerdo con la clasificación para niños del criterio de 1994 del Centro de Control y Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos [Caldwell et al., 1994]. Ninguno de los 109 pares madre-hijo correspondientes al grupo de expuestos no infectados recibieron tratamiento profiláctico según el régimen de zidovudina del Protocolo 076 del Grupo de Estudios Clínicos Pediátricos en SIDA (siglas en inglés PACTG 076) [Connor et al., 1994]. De los 425 pares madre-hijo correspondientes a los niños infectados por HIV-1, 85.6% no recibieron tratamiento profiláctico, 11.8% recibieron tratamiento profiláctico según PACTG 076 y no hubo datos disponibles para el 2.6%. La mediana de tiempo de seguimiento para los niños infectados por HIV-1 fue de 120.9 meses (2.6 – 237.6 meses). El 67% progresó a SIDA en el período de estudio que concluyó en mayo del 2006. El 81% de los niños recibieron terapia antirretroviral de alta eficacia durante el seguimiento. Análisis de tiempo a SIDA en distintos grupos de pacientes se efectuaron de acuerdo a los datos registrados en las correspondientes historias clínicas.

Ulteriormente, se identificaron en la cohorte general de infectados por HIV-1 un conjunto de 11 pacientes nacidos entre 1987 y 1998 que se distinguieron por no haber

desarrollado SIDA a más 100 meses de su nacimiento sin haber recibido terapia antirretroviral **(Fig. M1c)**. Debido a este curso inusualmente lento de la enfermedad se los consideró como progresores lentos pediátricos.

El Comité de Ética y el Comité de Revisión de Proyectos de Investigación del Hospital de Pediatría "Juan P. Garran" aprobaron el estudio. Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de los padres o guardianes legales de los niños.

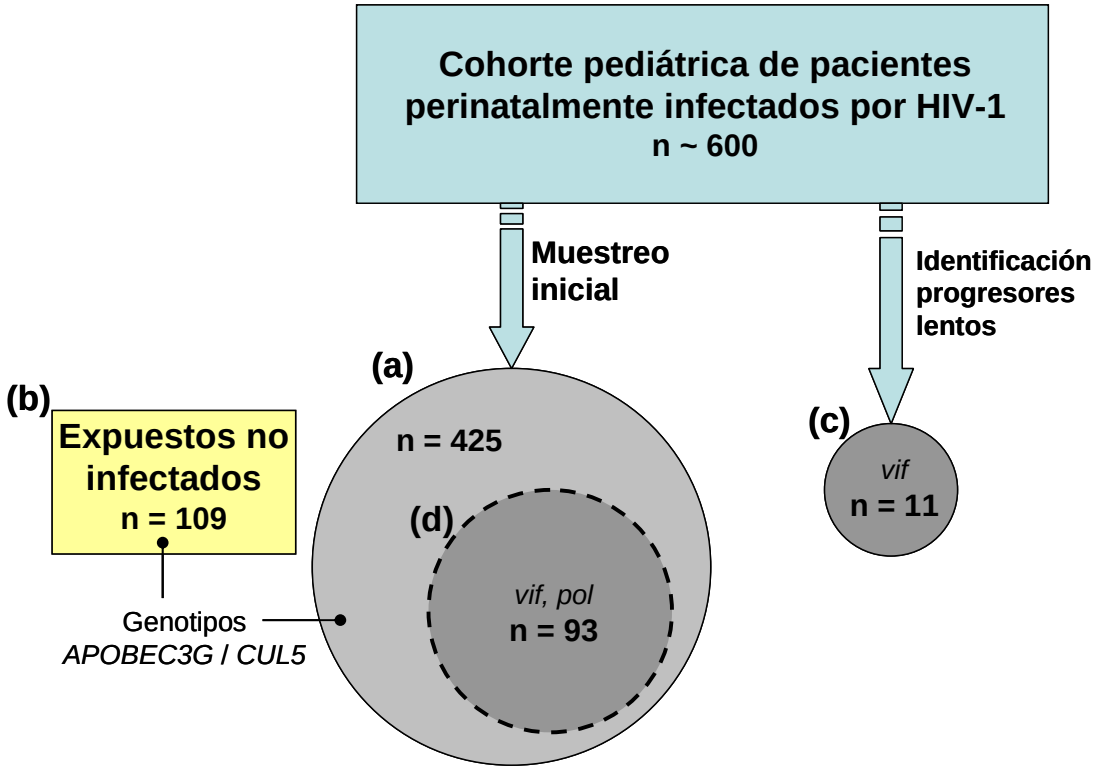

Figura M1. Detalle de los diferentes grupos de estudio. El número total de pacientes perinatalmente infectados por HIV-1 que se incluyó en el estudio fue de 436 **(a y c)**. Se consideraron también 109 niños nacidos de madres positivas para HIV-1 pero que no resultaron infectados en ausencia de tratamiento profiláctico **(b)**.

3.2 Obtención de células mononucleares totales a partir de sangre periférica

Sangre periférica (aproximadamente 5 ml) anticoagulada con EDTA 10% fue diluida al medio con solución fisiológica para proceder al aislamiento de células mononucleares totales (CMT) mediante gradiente de Ficoll-Triyosom (50 M, amidotrizoato sódico 50%, densidad 1.077 gr/ml a 4ºC), centrifugando a 1500 rpm por 30 minutos a 4ºC. Las células recuperadas fueron sometidas a dos lavados con solución fisiológica (centrifugación a 1800 rpm durante 10 minutos). Ante la presencia de eritrocitos, se procedió a su eliminación por lisis con agua destilada durante 1 minuto (los restos de hemoglobina pueden inhibir la posterior amplificación de ADN) seguida de un nuevo lavado. Luego, se realizó el recuento de las CMT mediante contador hematológico o cámara de Neubauer. Finalmente, las células obtenidas se almacenaron a -20ºC.

3.3 Preparación de lisados de células mononucleares totales

A partir de CMT conservadas a –20°C en alícuotas de $2x10^6$ células, se prepararon los lisados con solución C (200 µl, Tris-Cl 5 mM pH = 8.3, Tween 20 0.5%, Tritón X100 0.5%) y proteinasa K en una concentración final de 20 µg/ml. Se practicó una incubación a 56°C por 60 minutos y posteriormente se procedió a la inactivación de la enzima (95°C, 15 minutos). Los lisados celulares se almacenaron a –20°C.

3.4 Extracción de ADN genómico a partir de células mononucleares totales

Las células mononucleares totales previamente almacenadas a -20ºC se trataron con buffer de lisis de glóbulos blancos (WCLB: Tris-Cl 2 M, EDTA 0.5 M pH = 8,

NaCl 5 M, SDS 10%) y proteinasa K (20.85 mg/ml). Se realizó una incubación durante toda la noche a 55°C, luego se efectuó un lavado con NaCl 5 M y centrifugación a 13000 rpm durante 30 minutos. Se descartó el sobrenadante y se procedió a la precipitación del ADN con etanol 100%. Posteriormente, se realizaron dos lavados cada uno con dos volúmenes de etanol 70% y se dejó secar en estufa a 37°C. Finalmente, se resuspendió el ADN en buffer TE (Tris 1 M pH = 8, EDTA 0.5 M) y se conservó a -20°C.

3.5 Cuantificación del ADN

El ADN extraído se cuantificó por espectrofotometría, midiendo la absorbancia a 260 nm (longitud de onda de absorción de ADN). Se obtuvo la concentración de ADN considerando que un valor de absorbancia de 1 densidad óptica (DO) corresponde aproximadamente a 50 μg/ml (para ADN doble hebra) y usando la fórmula Concentración = Absorbancia a 260 nm X 50 μg/ml X Factor de dilución. La pureza del ADN extraído se calculó en base a la relación entre la absorbancia a 260 nm y la absorbancia a 280 nm (longitud de onda de absorción de proteínas). La pureza esperada corresponde a una relación entre 1.7 y 2.0.

3.6 Genotipificación de *APOBEC3G* y *CUL5*

Se determinaron los genotipos para polimorfismos de *APOBEC3G* y *CUL5* tanto en un grupo de pacientes infectados por HIV-1 como también en niños expuestos no infectados **(Fig. M1a y b)**. Lisados de CMT o su ADN purificado se emplearon para la determinación de genotipos por ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (siglas

en inglés PCR) seguida de digestión y análisis de polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (siglas en inglés RFLP). La genotipificación de *APOBEC3G* H186R se realizó en base a lo reportado por An et al. [2004], obteniéndose un amplicón de 409 pb que fue sometido a digestión con la enzima de restricción HhaI **(Fig. M2a)**. En paralelo, el mismo producto de PCR fue digerido con BseRI para determinar el genotipo *APOBEC3G* C40693T **(Fig. M2b)**. La genotipificación de *CUL5* SNP6 se llevó a cabo usando los primers reportados por An et al. [2007] para amplificar una región de 73 pb, que seguidamente se digirió con XceI **(Fig. M2c)**. Todas las digestiones descriptas se hicieron a 37ºC durante toda la noche. Finalmente, los fragmentos de digestión fueron separados en geles de agarosa 3.5% y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio o SYBR green bajo luz UV en el equipo El Logic 200 imaging system (Kodak, Rochester, NY, EEUU). Los patrones de restricción para cada diferente genotipo fueron determinados *in silico* usando NEBcutter v2.0 (http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php).

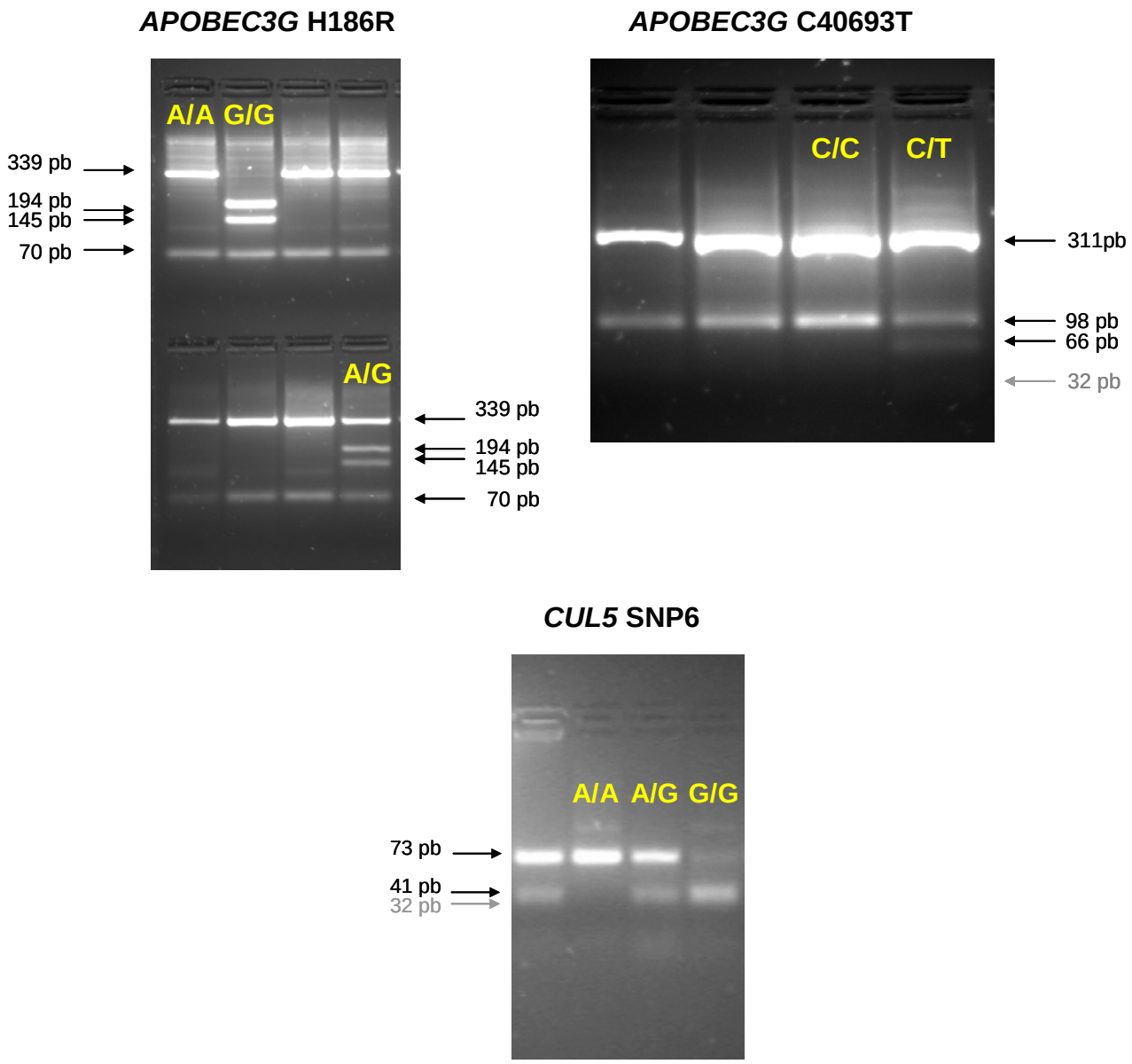

Figura M2. Patrones de restricción. Polimorfimsmo *APOBEC3G* H186R: Para el alelo A la enzima HhaI digiere el producto de PCR de 409 pb en dos fragmentos de 339 pb y 70 pb. En el caso del alelo G, se introduce un sitio de corte que determina fragmentos de 194 pb, 145 pb y 70 pb **(a)**. Polimorfismo *APOBEC3G* C40693T: Para el alelo C la enzima BseRI digiere el amplicón de 409 pb en fragmentos de 311 pb y 98 pb. En el alelo T, se introduce un sitio de corte que determina fragmentos de 311 pb, 66 pb y 32 pb **(b).** Polimorfismo *CUL5* SNP6: Para el alelo A la enzima XceI no digiere el producto de PCR de 73 pb, mientras que en el alelo G se introduce un sitio que determina fragmentos de 41 pb y 32 pb **(c)**.

3.7 Genotipificación de HLA-B

Se determinaron los genotipos de HLA-B para tres casos particulares del grupo de progresores lentos **(Fig. M1c)**. La genotipificación se realizó a nivel molecular mediante un ensayo basado en perlas fluorescentes con la plataforma Luminex (Luminex, Austin, Texas, EEUU) para alta resolución. Brevemente, el sistema LIFEMATCH (*Gen-Probes*, Stamford, Connecticut, EEUU) para determinación de HLA-B recurre a la detección simultánea de perlas de múltiples colores en suspensión. En este estudio, un tubo de reacción conteniendo producto específico de amplificación para HLA-B fue hibridizado con un set de sondas unidas a perlas fluorescentes y la discriminación de hibridización positiva se efectuó mediante la unión de estreptavidina-ficoeritrina a los productos de PCR portando primers originales biotinilados. Los alelos de HLA-B se asignaron usando el programa LIFEMATCH v2.5.2. La genotipificación se llevó a cabo en el Departamento de Medicina de la Universidad de Texas, Centro de Ciencias de la Salud, San Antonio, Texas, EEUU.

3.8 Amplificación y secuenciación de HIV-1

Se estudió el gen *vif* de HIV-1 de 93 niños perinatalmente infectados que fueron seleccionados en base a la disponibilidad de muestras de CMT recolectadas durante el primer año de vida (0.2 a 11.9 meses, mediana de 5.5 meses) **(Fig. M1d)**. Para estos casos, la amplificación de *vif* completo fue realizada por PCR anidada usando los *primers* (5´-3´) *vif*-FO ACAGCAGTACAAATGGCAGTATT / *vif*-RO TGTTGACACCCAATTCTGAAATG para la primera ronda y el par *vif*-FI ACCCACTTTGGAAAGGACCAGCA / *vif*-RI GATATGTTGTCCTAAGCCATGGAGC

para la segunda ronda. Estos *primers* fueron diseñados procurando minimizar el número de sitios susceptibles de sufrir edición en las secuencias de hibridización. Para el mismo conjunto de 93 pacientes se obtuvieron secuencias de 312 pb (HXB2 positions 4584–4895) correspondientes a la región cPPT dentro del gen *pol*. Se practicó una PCR anidada usando los *primers* degenerados (5´-3´) HypIN-F1 AARTTAGCARRAARATRGCCAG / HypIN-R1 TTTGCTGGTYYTTTYYAAASTGG para la primera ronda y el par HypIN-F2 AACAATACATACARACAATRGC / HypIN-R2 CTGTYYYTGTAATAAACYYGRAA para la segunda ronda. Ambos pares de *primers* degenerados fueron diseñados contemplando las dos bases posibles en sitios blanco de edición, de forma similar a Janini et al. [2001] y Suspène et al. [2005]. Esto permitiría un reconocimiento eficiente tanto de secuencias editadas como no editadas.

Los productos de PCR fueron purificados con columnas de purificación QIAquick (QIAGEN, Alemania) y luego sujetos a secuenciación poblacional o directa usando ambos primers de la segunda ronda. Las reacciones de secuenciación se realizaron con el kit Big Dye Terminator v1.1 (Amersham Biosciences, Inglaterra), se corrieron en un secuenciador automático ABI PRISM 3130 y se analizaron con *DNA Sequencing Analysis Software* v5.3.1 (Applied Biosystems, EEUU). Los cromatogramas se inspeccionaron visualmente y editaron usando el programa FinchTV v1.4.0 (http://www.geospiza.com/Products/finchtv.shtml), registrando en cada posición nucleotídica la base predominante.

Se estudió además el gen *vif* de un grupo de 11 niños considerados progresores lentos **(Fig. M1c)**. Para estos pacientes se dispuso de muestras de CMT que correspondieron a edades entre 11 y 168 meses (mediana de 128 meses). En este caso, la amplificación por PCR anidada se efectúo con los primers (5´-3´) Fw-CGGGTTTATTACAGGGACAGC / Rv-TCTCCGCTTCTTCCTGCCATAG para la primera

ronda y el par Fw-CTCTGGAAAGGTGAAGGGGCAGTAG / Rv-CAAGCAGTTTTAGGCTGACTTCC para la segunda ronda. El procedimiento para la obtención de secuencias fue similar al antes descripto, pero empleando para las reacciones de secuenciación el kit DYEnamic ET Terminator Cycle (Amersham Biosciences, Inglaterra), corridas en un secuenciador automático ABI PRISM 310 y analizadas con el *DNA Sequencing Analysis Software v3.3* (Applied Biosystems, EEUU). Por inspección visual de los cromatogramas se dejó registro de las posiciones nucleotídicas para las que se advirtieron poblaciones mixtas (es decir, dobles picos).

3.9 Números de acceso para las secuencias nucleotídicas

Las secuencias determinadas en este estudio han sido remitidas a GenBank bajo los números de acceso a continuación detallados. Secuencias obtenidas a partir de subset de 93 pacientes: JF494923–JF495015 (*vif*) y JN630631-JN630723 (*pol*, región cPPT). Secuencias obtenidas a partir del grupo de 11 progresores lentos: FJ197319-FJ197329 (*vif*).

3.10 Análisis de secuencias

El alineamiento de secuencias se llevó a cabo mediante la herramienta HIValign (http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HMM/HmmAlign.html). Genes *vif* de referencia para distintos subtipos se obtuvieron de la base de datos de HIV de *Los Alamos National Laboratory* (LANL) (http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/NEWALIGN/align.html). El paquete de programas MEGA5 se utilizó para la elección de modelos de evolución molecular apropiados, el cálculo de distancias entre pares de

secuencias y la construcción de árboles filogenéticos por el método de *neighbor-joining* (*bootstrap* como medida de soporte, 1000 réplicas) [Tamura et al., 2011]. La determinación de subtipo viral e identificación de secuencias recombinantes se efectuaron con las herramientas REGA (http://www.bioafrica.net/rega-genotype/html/subtypinghiv.html) y RIP 3.0 (http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/RIP/RIP.html).

La herramienta *Entropy* (http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/ENTROPY/entropy.html) en su opción "Entropy-one" se usó para calcular la frecuencia del aminoácido más común y también la entropía de Shannon (medida cuantitativa de variabilidad) en cada posición de alinemiento para Vif. La misma herramienta en su opción "Entropy-two" se empleo para realizar comparaciones de entropía sitio a sitio entre dos sets de secuencias (estimación de apoyo estadístico mediante 10000 aleatorizaciones con reemplazo).

La frecuencia de diferentes sustituciones aminoacídicas en la base de datos de HIV de LANL fue determinada en base a 1599 secuencias del *Filtered Web Alignment* 2009 para *vif* de HIV-1 (todo el grupo M, A-K más recombinantes). Secuencias de nuestra población pediátrica previamente remitidas a GenBank e incluídas en este alineamiento curado fueron omitidas para el cálculo de frecuencias. La aplicación *Sequence Search Interface* (http://www.hiv.lanl.gov/components/sequence/HIV/search/search.html) fue utilizada para recuperar de la base de datos de HIV de LANL secuencias *vif* (una por paciente) correspondientes a controladores de elite (50 secuencias en agosto 2011).

La presencia de motivos de anclaje para HLA-B específicos en proteínas Vif fue evaluada con la herramienta *Motif Scan* (http://www.hiv.lanl.gov/content/immunology/motif_scan/motif_scan).

3.11 Detección de edición mediada por APOBEC3

Se utilizó el programa *Hypermut* 2.0 (http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/ HYPERMUT/hypermut.html) para la detección de provirus severamente editados o hipermutados (definidos como aquellas secuencias con $p < 0.05$ en una prueba exacta de Fisher que compara el número de cambios G→A en el total de contextos APOBEC3 versus cambios G→A en el total de contextos control), usando como referencias secuencias del subtipo apropiado provistas por la base de datos de HIV de LANL (http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/ NEWALIGN/align.html) u obtenidas por HIV BLAST (http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/BASIC_BLAST/ basic_blast.html), o bien consensos generados con nuestras propias secuencias usando la herramienta *Consensus Maker* (http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/ CONSENSUS/ consensus.html).

Además, hemos desarrollado un nuevo índice de edición basado en el previamente propuesto *PS ratio* (*product substrate ratio*) [Suspène et al., 2006]. Brevemente, *PS ratio* contabiliza el número de dinucleótidos AG, AA, GG y GA en una dada secuencia para calcular la razón (AG + AA) : (GG + GA). En esencia, esta es una razón A : G dentro de los contextos afectados por la actividad APOBEC3. Consideramos entonces ajustarlo por la razón A : G fuera de tales contextos. La expresión modificada define la razón de chances (en inglés *odds ratio*) [(AG + AA) : (GG + GA)] / [(AC + AT) : (GC + GT)]. Decidimos luego aplicarla en un estimador de la edición que explote las propiedades de la región de 312 pb del gen *pol* secuenciada, la cual incluye al cPPT. Los segmentos vecinos río arriba y río abajo a este elemento han sido reportados como máximo y mínimo para la susceptibilidad a APOBEC3, respectivamente [Suspène et al., 2006; Wurtzer et al., 2006; Armitage et al., 2008; Hu et

al., 2010]. Por tal motivo partimos en dos a la región de 312 pb, teniendo por un lado los 201 pb ubicados 5´ del cPPT y por el otro lado los 111 pb restantes (incluyendo al propio cPPT de 16 pb), para luego calcular separadamente la razón de chances. El valor de la razón de chances obtenido para el máximo fue dividido por el que se obtuvo para el mínimo, resultando así el llamado índice ODDSMM **(Fig. M3)**. El desarrollo de este índice tuvo por objeto incrementar la especificidad al cuantificar edición, corrigiendo la señal atribuible a la actividad APOBEC3 por otra que podría considerarse como basal.

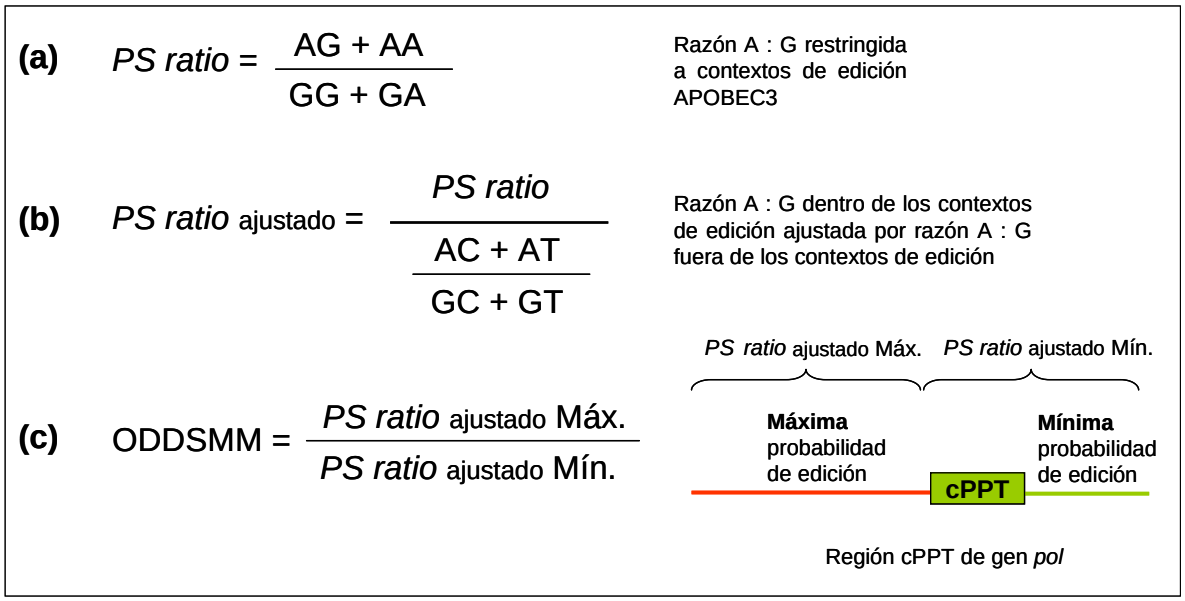

Figura M3. Estimadores de la edición mediada por APOBEC3. Se describe el índice *PS ratio* original [Suspène et al., 2006] **(a)**, la forma ajustada propuesta **(b)** y su aplicación particular a la región cPPT dentro del gen *pol*, de la cual resulta el índice ODDSMM **(c)**.

3.12 Determinación de carga viral

La carga viral (copias de ARN de HIV-1/ ml) en plasma se determinó utilizando métodos comerciales de acuerdo con su disponibilidad en la institución a lo largo del tiempo. Se empleó HIV-1 *RNA QT Nuclisens* (*Organon Teknika*) desde mayo 1998 a junio 2005, *Amplicor HIV-1 Monitor test v 1.5* (*Roche Diagnostics Systems*) desde junio 2005 a octubre 2007 y *HIV-1 RNA Cobas® TaqMan 48* (*Roche Diagnostic Systems*) desde octubre 2007 al presente.

3.13 Recuentos de células T CD4+

El recuento de células T CD4+ (% de células T CD4+) se realizó a partir de sangre entera por citometría de flujo (*FACS Sorter, Becton Dickinson*). Estas mediciones fueron realizadas por el Laboratorio de Inmunología del Hospital de Pediatría "Juan P. Garrahan", a cargo del Dr. Jorge Rossi.

3.14 Análisis estadístico

Diferencias en las frecuencias genotípicas fueron evaluadas con la prueba de Fisher-Freeman-Halton (StatXact 3 v3.1). El desequilibrio de ligamiento entre loci se analizó con el estadístico D´ (http://bioinfo.iconcologia.net/en/SNPStats_web).

Para establecer la bondad de ajuste de las frecuencias genotípicas observadas al equilibrio de Hardy-Weinberg y también para evaluar diferencias entre grupos en cuanto a la distribución de variantes de Vif se recurrió a la prueba de chi cuadrado de Pearson (Statistix v7.0).

La asociación entre diferentes mutaciones de Vif, o entre polimorfismos en *APOBEC3G*/*CUL5* y variantes de Vif, o también entre distancia genética y ODDSMM se evaluó con la prueba de correlación de rangos de Spearman (StatXact 3 v3.1 y Statistix v7.0).

La distribución normal del índice ODDSMM se evaluó mediante la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk (Statistix v7.0).

Diferencias en los niveles de edición (ODDSMM) entre los subtipos de HIV-1, los genotipos de *APOBEC3G*/*CUL5* o variantes de Vif fueron analizados con la prueba de suma de rangos de Wilcoxon (Statistix v7.0), al igual que las diferencias entre grupos de pacientes para carga viral plasmática y porcentaje de células T CD4+. Las distancias de a pares de secuencias se compararon usando la prueba t standard para dos muestras (paquete estadístico R v2.10.1).

El método de Kaplan-Meier fue usado para la estimación de curvas de supervivencia. Para evaluar diferencias entre grupos de pacientes en el tiempo a SIDA se utilizó la prueba de *Log-rank* de Mantel-Cox (GraphPad Prism 5, v5.03). La asociación entre variables continuas (como el índice de edición ODDSMM) y tiempo a SIDA se analizó con una prueba de razón de verosimilitudes bajo un modelo de Cox de regresión de riesgos proporcionales (Statistix v7.0).

Se especifican los casos en los que el método de Bonferroni fue utilizado para corregir el nivel de significancia al realizarse múltiples pruebas.

4 RESULTADOS

4.1 Relevancia de los polimorfismos en los genes *APOBEC3G* / *CUL5* del hospedador y de la variabilidad del gen *vif* de HIV-1 en el SIDA pediátrico

4.1.1 Asociación de los genotipos de *APOBEC3G* y *CUL5* con la transmisión vertical de HIV-1 y la progresión a SIDA pediátrico

Para determinar si los polimorfismos de *APOBEC3G* H186R, *APOBEC3G* C40693T y *CUL5* SNP6 tienen un efecto sobre la infección perinatal por HIV-1, se comparó la distribución de genotipos entre los grupos de niños infectados y expuestos no infectados **(Tabla R1)**. Los tres loci evaluados mostraron una baja frecuencia (por debajo del 10%) para los alelos minoritarios, con frecuencias genotípicas que no difirieron entre grupos (prueba exacta de Fisher-Freeman-Halton $p > 0.05$) y ajustaron al equilibrio de Hardy-Weinberg (prueba de chi cuadrado de Pearson $p > 0.05$). Además, no se halló evidencia de desequilibrio de ligamiento entre los SNPs *APOBEC3*G H186R y *APOBEC3G* C40693T (D´ = 0.821).

Se examinó luego la posible influencia de los polimorfismos de *APOBEC3G* y *CUL5* estudiados sobre la tasa de progresión de la enfermedad, pero el análisis de tiempo a SIDA no mostró diferencias significativas entre genotipos (prueba de *Log-rank* de Mantel-Cox $p > 0.05$, **Fig. R1a-c**).

En conjunto, los resultados sugieren que la transmisión perinatal de HIV-1 y el inicio de SIDA no son afectados por los polimorfismos *APOBEC3G* H186R, *APOBEC3G* C40693T o *CUL5* SNP6. Sin embargo, un efecto de los alelos minoritarios en homocigosidad no pudo ser evaluado apropiadamente debido a su baja frecuencia.

Tabla R1. Frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos de nucleótido simple *APOBEC3G* H186R, *APOBEC3G* C40693T y *CUL5* SNP6 en niños perinatalmente infectados por HIV-1 y niños expuestos no infectados.

SNP		Infectados por HIV-1	Expuestos no infectados	*p* [a]
APOBEC3G H186R		n=363	n=105	
Genotipo [n(%)]	A/A	297 (81.82)	89 (84.76)	0.322
	A/G	65 (17.91)	15 (14.29)	
	G/G	1 (0.28)	1 (0.95)	
Alelo minoritario [%]		9.23	8.10	
APOBEC3G C40693T		n=365	n=106	
Genotipo [n(%)]	C/C	332 (90.96)	91 (85.85)	0.092
	C/T	33 (9.04)	15 (14.15)	
	T/T	0 (0.00)	0 (0.00)	
Alelo minoritario [%]		4.52	7.08	
CUL5 SNP6		n=425	n=109	
Genotipo [n(%)]	A/A	356 (83.76)	93 (85.32)	0.669
	A/G	64 (15.06)	14 (12.84)	
	G/G	5 (1.18)	2 (1.83)	
Alelo minoritario [%]		8.71	8.26	

Diferencias en el número total de casos para los distintos polimorfismos se deben a dificultades en la amplificación.

Todas las frecuencias genotípicas se ajustan al equilibrio de Hardy-Weinberg (prueba de chi cuadrado de Pearson $p > 0.05$).

[a]Valor de *p* para la prueba exacta de Fisher-Freeman-Halton.

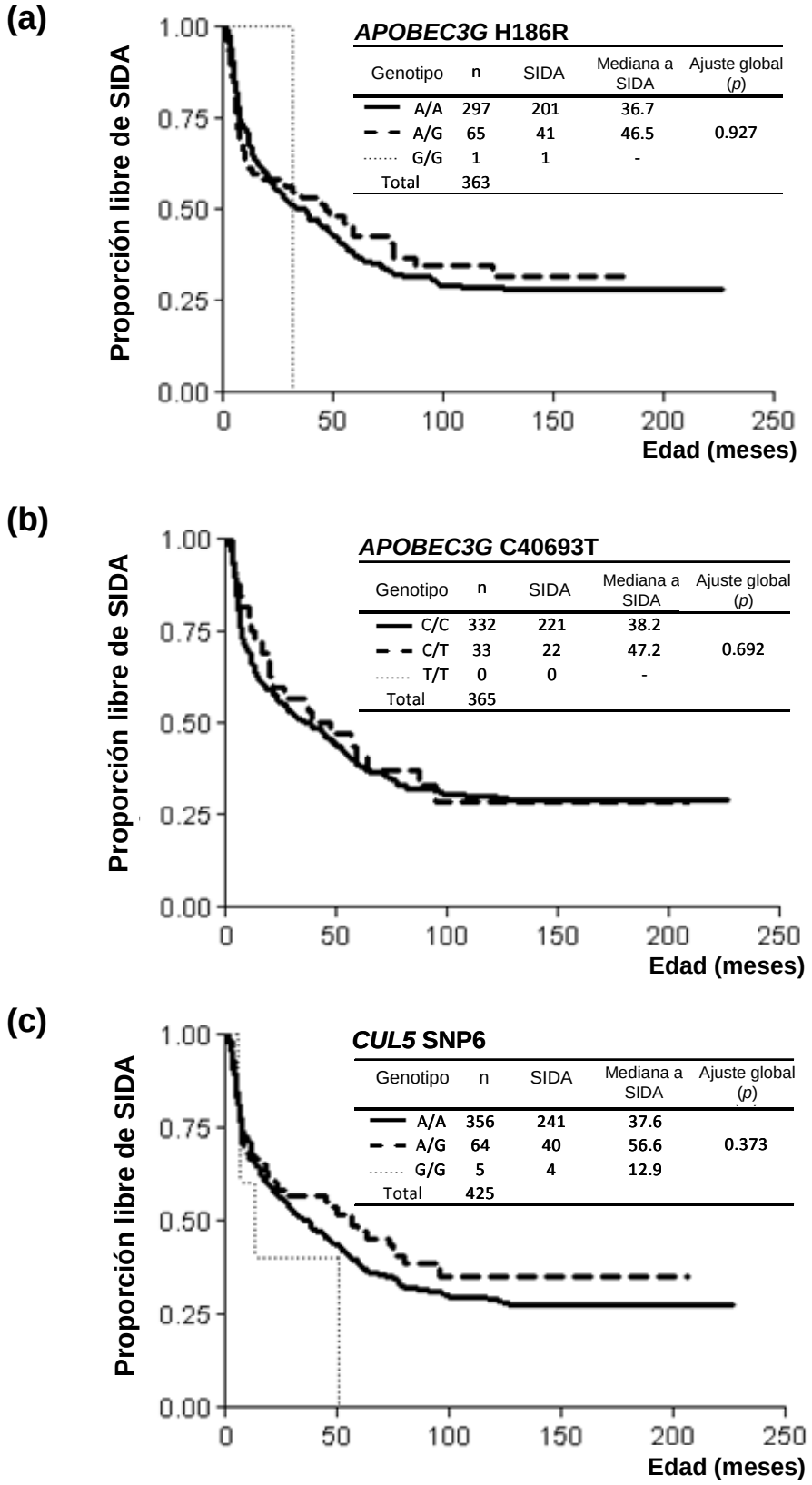

Figura R1. Polimorfismos de *APOBEC3G* y *CUL5* y progresión a SIDA. El método de Kaplan-Meier fue usado para estimar la proporción libre de SIDA para los genotipos de *APOBEC3G H186R* **(a)**, *APOBEC3G* C40693T **(b)** y *CUL5* SNP6 **(c)**. Los ajustes globales se evaluaron mediante la prueba *de Log-rank* de Mantel-Cox.

4.1.2 Variabilidad de Vif y progresión a SIDA pediátrico

Se obtuvieron secuencias provirales de *vif* a partir de 93 niños perinatalmente infectados por HIV-1 incluidos en la cohorte pediátrica. Dichos pacientes fueron seleccionados en base a la disponibilidad de muestras de CMT tomadas durante el primer año de vida. Esto permite buscar provirus hipermutados y analizar variantes tempranas de *vif* minimizando posibles efectos de factores confundentes, tales como la influencia sobre las características de la población viral del tiempo desde la infección y/o la historia de terapia. La asignación de subtipo para los genes *vif* reveló que 76 (81.7%) de las secuencias fue subtipo F1, 11 (11.8%) fue subtipo B, 5 (5.4%) fue recombinante B/F1 y 1 (1.1%) fue subtipo A1 **(Fig. R2)**. Ninguna de las secuencias exhibió signos de hipermutación mediada por APOBEC3, habiéndose empleado Hypermut 2.0 para evaluar edición tanto en contexto general (GR) como específico (GG o GA). Para los análisis subsiguientes, nos restringimos a los genes *vif* de subtipo F1, habiendo sido estas secuencias las más numerosas (n = 76) obtenidas a partir de nuestra cohorte.

La variabilidad de las proteínas deducidas Vif subtipo F1 se ilustra en la **Fig. R3**, detallando la frecuencia del residuo consenso y la entropía de Shannon para cada posición. Ninguna de las proteínas presentó *stops* prematuros u otro defecto grosero. Se observó una preponderancia de sitios altamente conservados, con un 52.6% de sitios invariantes (entropía de Shannon = 0) y otro 12.0% mostrando sólo un cambio respecto del residuo consenso (entropía de Shannon = 0.07). Por tanto, las secuencias obtenidas mostraron globalmente un perfil de baja entropía, que parece reflejar una alta restricción funcional que concuerda con la importancia de la actividad de Vif para la replicación viral.

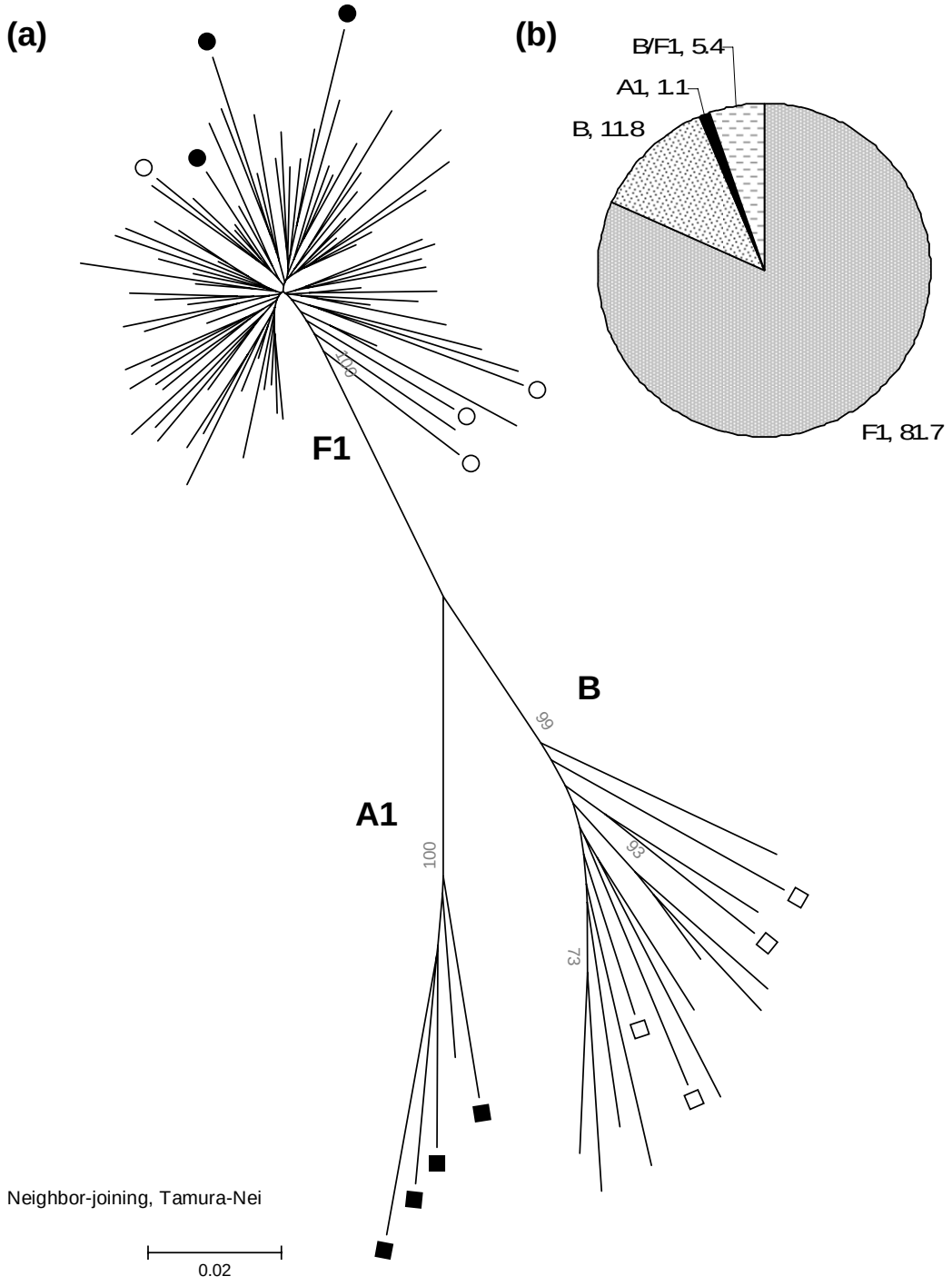

Figura R2. Asignación de subtipo para *vif*. Árbol filogenético que muestra la distribución entre los subtipos F1, B y A1 de los genes *vif* secuenciados (5 recombinantes B/F1 fueron omitidos). Cuadrados negros: Referencias A1, Cuadrados blancos: Referencias B, Círculos negros: Referencias CRF_12, Círculos blancos: Referencias F1. Se indican sólo los valores de *bootstrap* (1000 réplicas) superiores al 70% **(a)**. Frecuencia porcentual para las 93 secuencias provirales obtenidas según subtipo **(b)**.

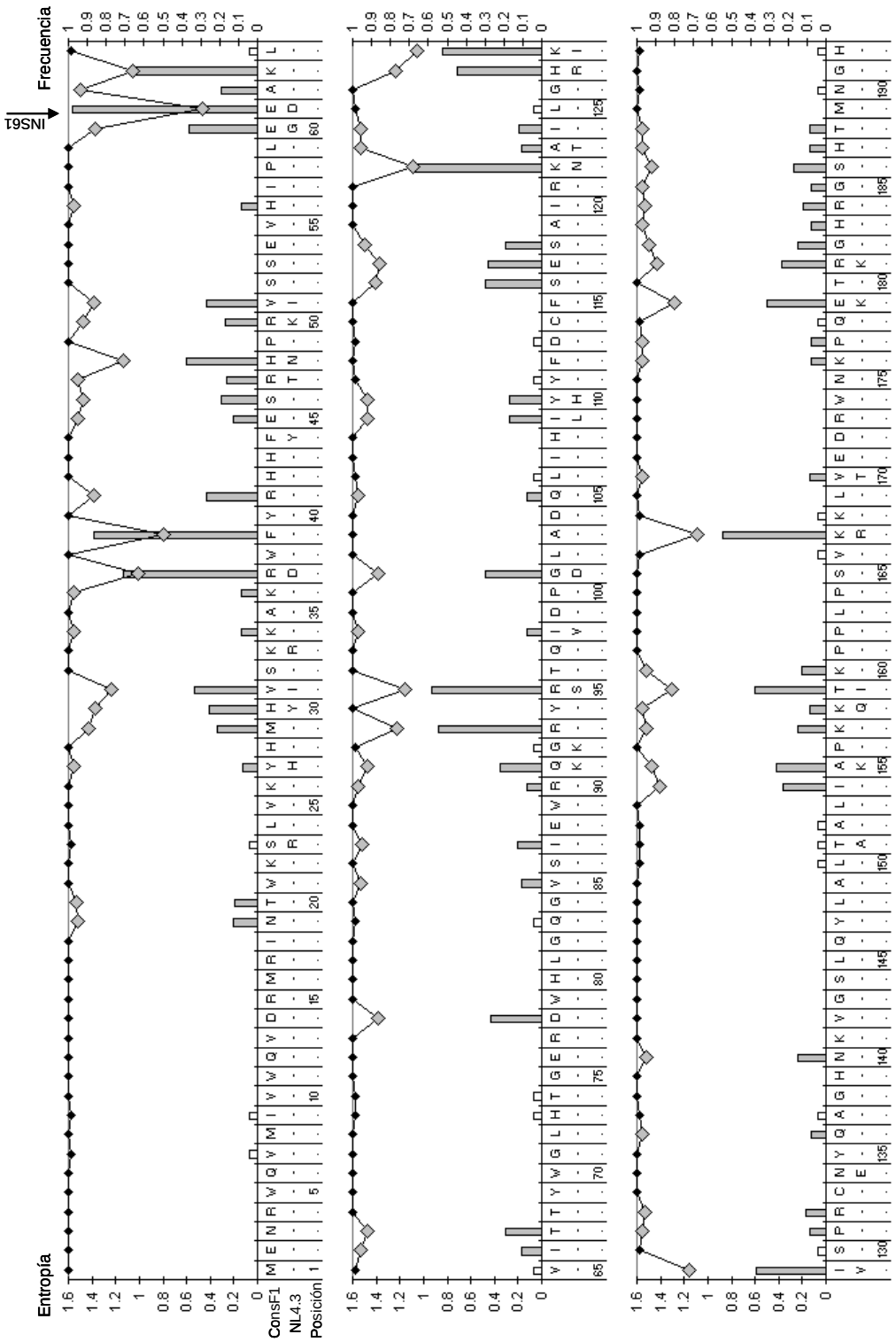

Figura R3. Variabilidad de las proteínas Vif subtipo F1. Se muestran la entropía de Shannon (barras) y la frecuencia del residuo consenso (línea) en cada posición para un set de 76 secuencias. Las barras y los marcadores de línea en color gris destacan los 68 sitios considerados para el análisis estadístico. INS61 indica la inserción de un aminoácido (flecha). ConsF1: consenso para proteínas Vif subtipo F1, NL4.3: cepa prototípica de subtipo B incluida como referencia.

Se analizó además la variabilidad de Vif con el fin de explorar su potencial impacto sobre el curso clínico de la infección pediátrica por HIV-1. En primer lugar, se intentó determinar si variaciones estructurales de Vif pueden afectar la tasa de progresión de la enfermedad. La única alteración de esa clase fue la inserción de un aminoácido (residuo A o T) en la posición 61 (INS61), que fue observada en 4% de los casos (3/76 secuencias). El análisis de supervivencia sugirió que la variante INS61 estaba asociada con una progresión rápida a SIDA (prueba de *Log-rank* de Mantel-Cox $p = 0.003$, **Fig. R4a**).

Luego, continuamos nuestro estudio considerando las sustituciones aminoacídicas en las proteínas Vif deducidas. Para facilitar la evaluación estadística y la ulterior interpretación biológica, el análisis se limitó a 68 sitios de Vif para los que al menos dos secuencias de nuestro set presentaron un residuo diferente al aminoácido *wild type* (por encima de un umbral de entropía de 0.07, **Fig. R3**). El análisis de supervivencia reveló que las sustituciones A62D/N/S y Q136P estaban asociadas con una progresión acelerada a SIDA (prueba de *Log-rank* de Mantel-Cox $p < 0.05$ corregida por Bonferroni, **Fig. R4b y c**). Los cambios en estas posiciones exhibieron una frecuencia de 7% (5/76) para A62D/N/S y 3% (2/76) para Q136P.

Se exploró luego acerca de la presencia simultánea de INS61 y las sustituciones en los sitios 62 y 136. Estas variaciones estuvieron distribuidas en nueve secuencias Vif de diferentes pacientes sin estar asociadas estadísticamente (prueba de correlación de rangos de Spearman $p > 0.05$). Sólo una proteína Vif portó simultáneamente dos de ellas (INS61 + A62N).

En conjunto, los resultados sugieren que las variaciones INS61, A62D/N/S y Q136P en Vif subtipo F1 podrían individualmente contribuir a un desarrollo rápido de SIDA en niños.

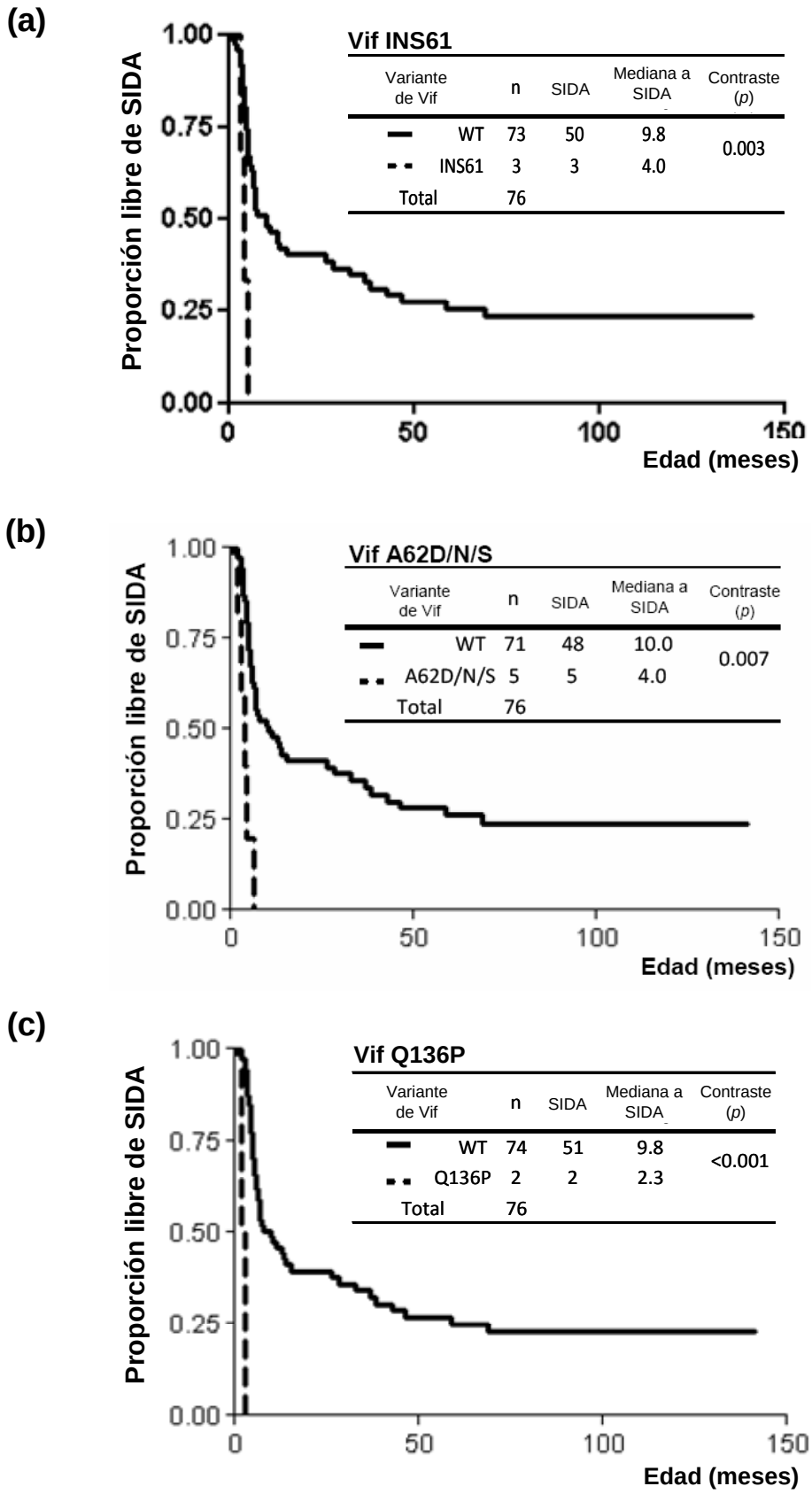

Fig. R4. Variantes de Vif de HIV-1 y progresión a SIDA. El método de Kaplan-Meier fue usado para estimar la proporción libre de SIDA para Vif *wild type* (WT) y las variantes INS61**(a)**, A62D/N/S **(b)** o Q136P **(c)**. Los contrastes fueron evaluados mediante la prueba de *Log-rank* de Mantel-Cox. En (b) y (c) los valores *p* fueron corregidos por Bonferroni.

4.1.3 Asociación de los SNPs de *APOBEC3G* y *CUL5* con las variantes de Vif

Nos propusimos determinar si los polimorfismos de *APOBEC3G* y *CUL5* estudiados pueden influir sobre la variabilidad de Vif de HIV-1. En ese sentido, se investigó la asociación entre estos SNPs y las variantes de Vif. Para el análisis estadístico se consideraron la alteración INS61 y también los 68 sitios de Vif previamente estudiados. La evaluación arrojó dos pares correlacionados de alelos *APOBEC3G*/*CUL5* y variantes de Vif (prueba de correlación de rangos de Spearman $p < 0.05$ corregida por Bonferroni, **Fig. R5**). Estas asociaciones fueron entre el alelo minoritario de *APOBEC3G* C40693T y Vif E45D **(Fig. R5a)** y entre el alelo minoritario de *CUL5* SNP6 y Vif R132K **(Fig. R5b)**. Los cambios E45D y R132K mostraron una frecuencia de 5% (4/76) y 4% (3/76), respectivamente. De esta manera, las variantes genéticas de *APOBEC3G* y *CUL5* portadas por el hospedador parecerían tener un impacto sobre las características de Vif.

Aunque no se observaron formas de Vif significativamente asociadas tanto con el tiempo a SIDA como con polimorfismos del hospedador de manera simultánea, cabe mencionar que el cambio A62D/N/S (fuertemente ligado a un desarrollo acelerado de SIDA) mostró para su correlación con el alelo minoritario de *APOBEC3G* C40693T un valor no corregido de $p = 0.027$ (prueba de correlación de rangos de Spearman, no mostrado), lo cual puede ser interpretado al menos como una tendencia.

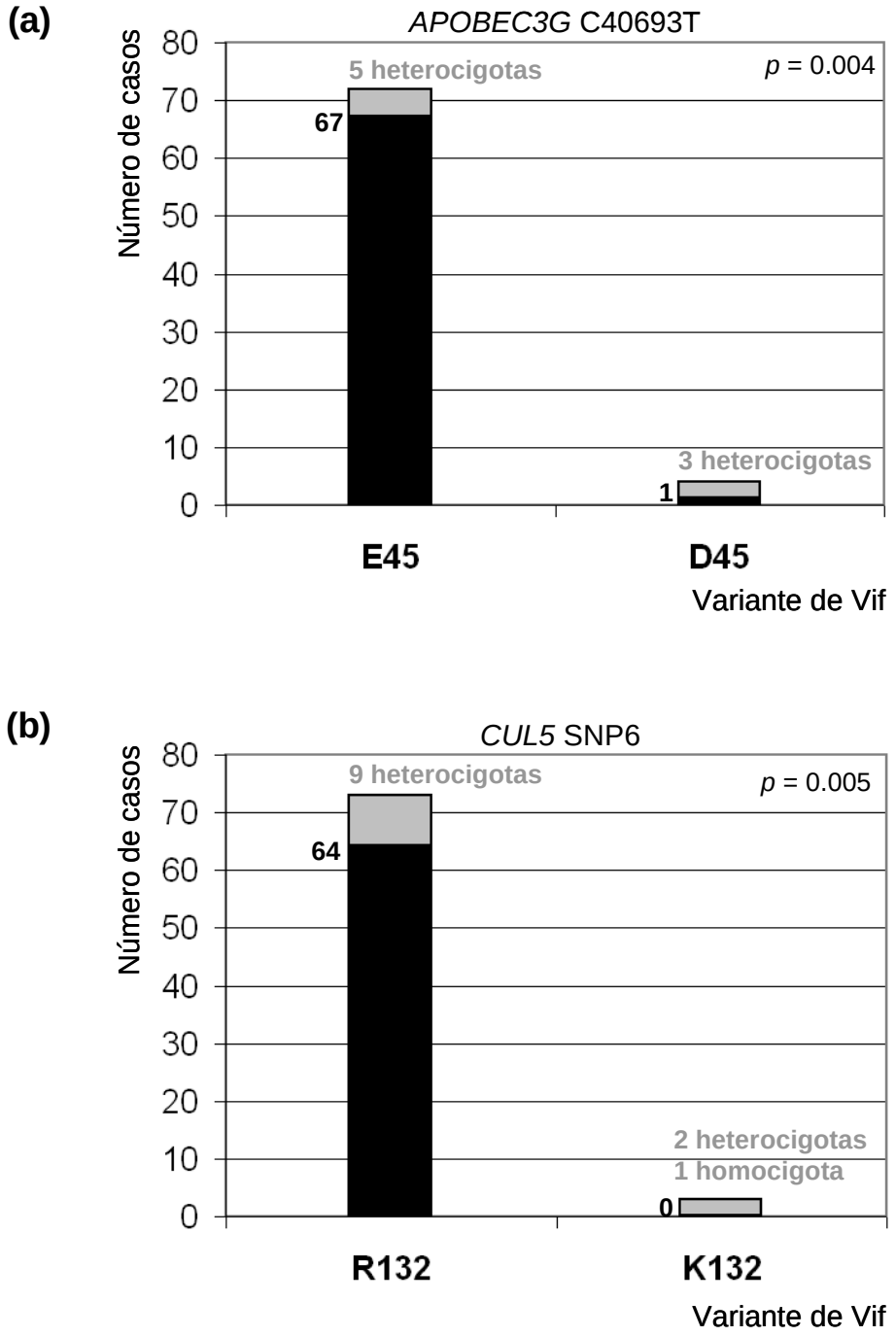

Figura R5. Asociación de polimorfismos de *APOBEC3G* y *CUL5* con variantes de Vif. El número de casos en los que cada variante de Vif fue observada en portadores de alelos minoritarios de *APOBEC3G* **(a)** o *CUL5* **(b)** se indica en gris. El número de casos restantes se muestra en negro. La evaluación estadística se efectuó mediante la prueba de correlación de rangos de Spearman. Los valores *p* fueron corregidos por Bonferroni.

4.2 Detección de provirus de HIV-1 hipermutados en pacientes pediátricos

En el capítulo precedente, se intentó detectar hipermutación mediada por APOBEC3 analizando un total de 93 secuencias *vif* de provirus de HIV-1. Sin embargo, no hallamos señales de este fenómeno en ninguno de los pacientes pediátricos estudiados. A partir de esto, nos propusimos realizar una búsqueda sobre un número mayor de casos. Consideramos hacer uso de un conjunto de secuencias provirales previamente obtenidas por secuenciación directa en el marco de otros estudios del laboratorio [Aulicino et al., 2007 y 2011]. Se trata de secuencias correspondientes ya sea a un segmento *vpu*-5´*env* o bien a una porción 5´ del gen *pol*, provenientes de unos 138 niños infectados. Empleando nuevamente el programa Hypermut 2.0, el análisis identificó dos secuencias con señal de edición severa o hipermutación, designadas con los números de acceso de Genbank DQ767703 (*vpu*-5´*env*) y HQ158256 (5´*pol*) **(Tabla R2)**. Interesantemente, DQ767703 presentó huellas de edición en contexto característico de APOBEC3G (GG→AG), en tanto que HQ158256 lo hizo en contexto característico de APOBEC3F (GA→AA). Un gráfico de dispersión mostrando porcentaje de adenina respecto de porcentaje de guanina permite visualizar la composición de bases alterada de los dos hipermutantes **(Fig. R6)**. Es importante destacar que ambas secuencias se obtuvieron a partir de muestras de sangre tomadas dentro de los dos primeros meses de vida de los niños.

Debe aclararse que este último conjunto de secuencias analizado no se obtuvo según un diseño dirigido a estudios de asociación (muestras provenientes de pacientes sin registro clínico completo, tomadas a distintas edades/tiempos de infección, disparidad de historias de terapia y/o estadio clínico). Sin embargo, la exploración realizada permitió comprobar que el fenómeno de hipermutación afectando el grueso de

la población proviral puede ser observado tempranamente en nuestros pacientes pediátricos, aunque sólo en una muy baja proporción de casos. Esto último sugeriría un bajo nivel de actividad editora en la población de niños bajo análisis.

A partir de lo expuesto, y considerando que la susceptibilidad a APOBEC3 varía a lo largo del genoma de HIV-1, nos propusimos continuar el estudio enfocándonos ahora sobre una región del virus que elegimos dada su alta probabilidad para la edición: la región cPPT hacia 3´ del gen *pol*. Esto nos permitiría incrementar la sensibilidad para detectar huellas de la actividad APOBEC3 y, trabajando con un diseño adecuado, determinar su relación con otros factores implicados en la infección por HIV-1.

Tabla R2. Secuencias provirales hipermutadas según Hypermut 2.0

				Hypermut 2.0			
Secuencias hipermutadas[a]	Región genómica HIV-1	Posiciones en HXB2[b]	Longitud	Significancia general (GR)	Significancia específica (GG)	Significancia específica (GA)	Referencias[a, c]
DQ767703	*vpu*- 5´*env*	6030-6559	524 pb	0.00068	0.00003	0.12219	AY284984
HQ158256	*5´pol*	2274-3186	913 pb	0.00691	0.09907	0.00503	EF120160

[a] Se indican los números de acceso de GenBank, [b] Localización en genoma de referencia HXB2 (K03455), [c] Obtenidas con la herramienta de LANL HIV BLAST . Los valores de significancia indicados corresponden a una prueba exacta de Fisher.

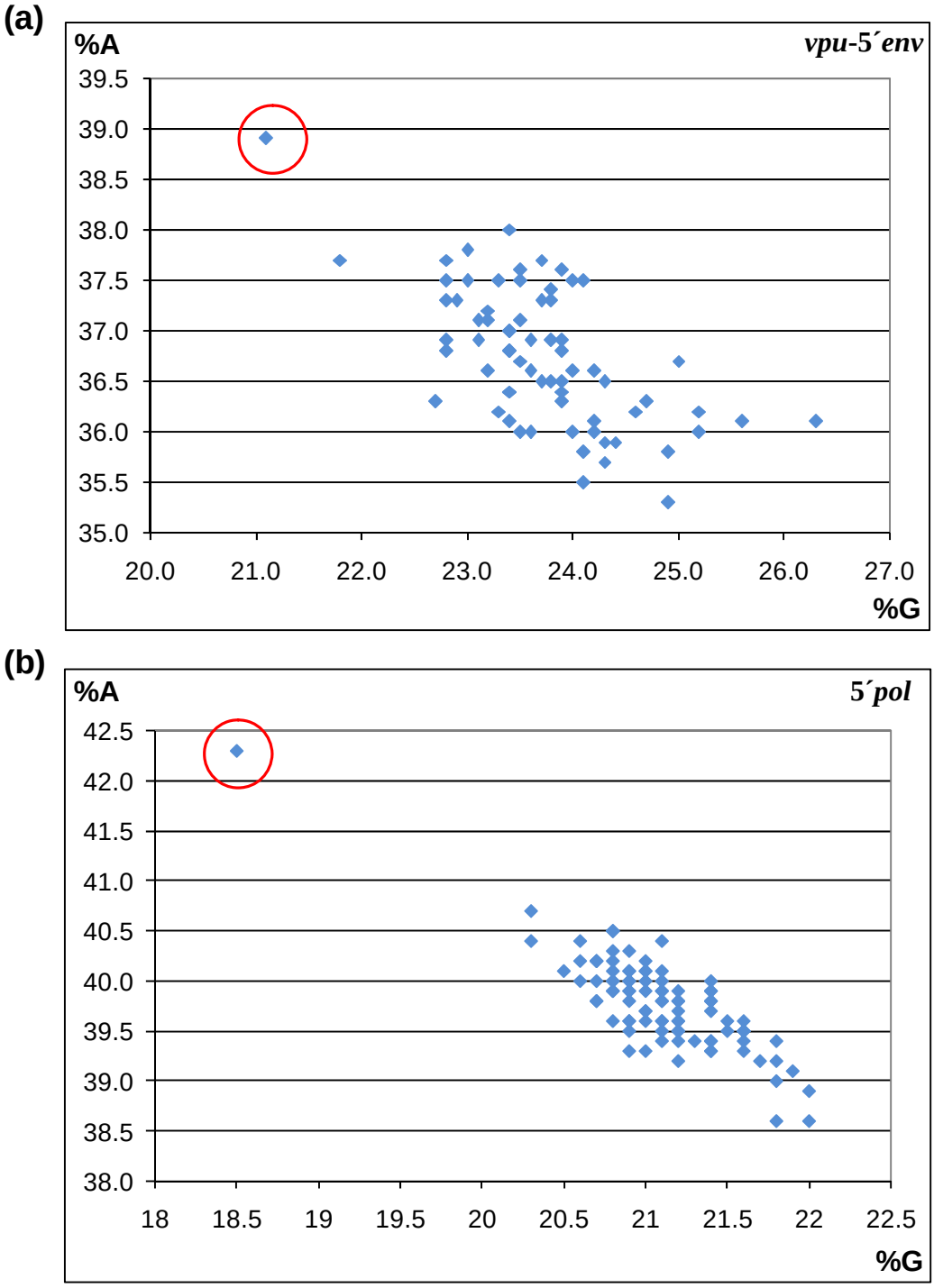

Figura R6. Composición de bases de las secuencias provirales. Los gráficos para proporción de adenina (%A) versus proporción de guanina (%G) permiten observar a las secuencias hipermutadas como datos aberrantes. Entre las secuencias del segmento *vpu*-5´*env* (n = 69) se distingue DQ767703 **(a)**, en tanto que para las correspondientes a 5´*pol* (n = 94) se aprecia a HQ158256 como claramente apartada de la distribución **(b)**.

4.3 Edición mediada por APOBEC3 en HIV-1 de pacientes pediátricos y su asociación con polimorfismos en *APOBEC3G / CUL5* y la variabilidad de *vif*

4.3.1 Análisis de la edición mediada por APOBEC3

Secuencias provirales de la región cPPT dentro del gen *pol* de HIV-1 fueron obtenidas por secuenciación directa a partir de muestras tempranas provenientes de 93 niños perinatalmente infectados. Se trabajó sobre un segmento de 312 pb del genoma viral considerado altamente informativo para el estudio de la edición. Se observó que 67 (72.0%) de las secuencias eran de subtipo F1, 25 (26.9%) de subtipo B y 1 (1.1%) de subtipo A1 **(Fig. R7)**.

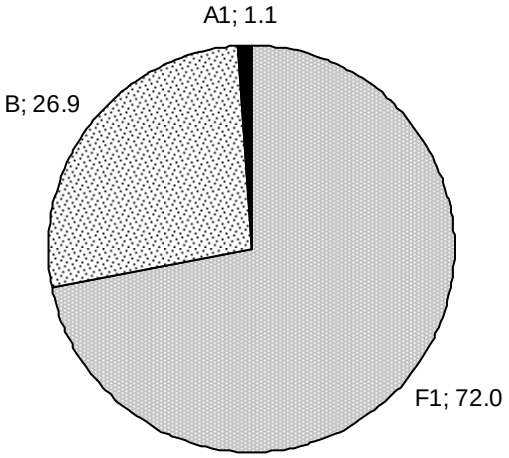

Figura R7. Asignación de subtipo para región cPPT del gen *pol*. Se presenta la frecuencia porcentual para las 93 secuencias provirales obtenidas según subtipo.

Con el objeto de identificar secuencias altamente editadas, se empleó el programa Hypermut 2.0. Las secuencias fueron analizadas separadamente usando referencias apropiadas de acuerdo al subtipo viral. Este procedimiento no indicó a ninguna secuencia como hipermutada (tanto para contexto general GR como específico GG o GA), lo cual destaca la rareza de casos pediátricos mostrando una fracción mayor de la población proviral compuesta por formas severamente editadas.

Debe destacarse que Hypermut 2.0 es una herramienta ampliamente utilizada que se aplica fundamentalmente para clasificar secuencias en las categorías de "hipermutante" o "no hipermutante". Este mismo criterio de "todo o nada" es usualmente adoptado por otras aproximaciones basadas en *scores* de edición y análisis de *clusters* [Pace et al., 2006; Piantadosi et al., 2009]. Sin embargo, estrategias que no se apoyan en tal distinción han demostrado ser también valiosas en diferentes estudios de asociación realizados [Land et al., 2008; Ulenga et al., 2008; Gourraud et al., 2011], destacando que los niveles de edición pueden resultar informativos a través de un amplio rango antes de que la secuencia afectada pueda considerarse como hipermutada. Por tanto, decidimos llevar a cabo un estudio focalizado en el espectro de baja edición mediada por APOBEC3 que podría presentarse en nuestra cohorte pediátrica. A tal fin, desarrollamos especialmente el índice ODDSMM, intentando mejorar el análisis del fenómeno de edición cuando este se da de manera débil. En este índice, la señal de edición se estima como la razón A : G dentro de los contextos APOBEC3 en relación a la razón A : G fuera de ellos, lo que se detalla en la expresión [(AG + AA) : (GG + GA)] / [(AC + AT) : (GC + GT)]. Para lograr el valor de ODDSMM, la señal de edición es obtenida para una secuencia nucleotídica ubicada en un máximo de susceptibilidad a la actividad APOBEC3 (inmediatamente río arriba del cPPT) y luego ajustada por la señal en un mínimo contiguo (el propio cPPT y la secuencia inmediatamente río abajo).

Esto permitiría ganar especificidad para la medida de edición, ya que se corrige una señal atribuible a la actividad APOBEC3 por otra que podría considerarse basal o espuria.

Al calcularse los valores de ODDSMM para los 93 casos estudiados, se observó que estos diferían significativamente entre los subtipos de HIV-1 (prueba de suma de rangos de Wilcoxon $p < 0.0001$, **Fig. R8a**). En consecuencia, decidimos restringir los siguientes análisis a las regiones de cPPT de subtipo F1 por ser las más numerosas. Además, para minimizar factores confundentes vinculados al linaje viral (dada la presencia de diferentes recombinantes B/F1), consideramos sólo aquellos casos determinados previamente también como de subtipo F1 en el gen *vif*. Continuamos entonces nuestros estudios de edición con un subset de 66 pacientes pediátricos. Este grupo presentó una distribución de ODDSMM que no se apartó significativamente de la normalidad (prueba de normalidad de Shapiro-Wilk $p = 0.3121$, **Fig. R8b**).

4.3.2 Edición mediada por APOBEC3 y polimorfismos de *APOBEC3G* / *CUL5*

Para determinar si diferentes niveles de edición se asociaban con los polimorfismos *APOBEC3G* H186R, *APOBEC3G* C40693T o *CUL5* SNP6, realizamos para cada uno de estos loci una comparación de los valores de ODDSMM entre los homocigotas para el alelo mayoritario y los portadores del alelo minoritario. Mientras que los SNPs de *APOBEC3G* no se vincularon con diferencias de ODDSMM (prueba de suma de rangos de Wilcoxon $p > 0.05$, **Fig. R9a y b**), el alelo minoritario de *CUL5* SNP6 se asoció con edición reducida (prueba de suma de rangos de Wilcoxon $p = 0.0479$, **Fig. R9c**).

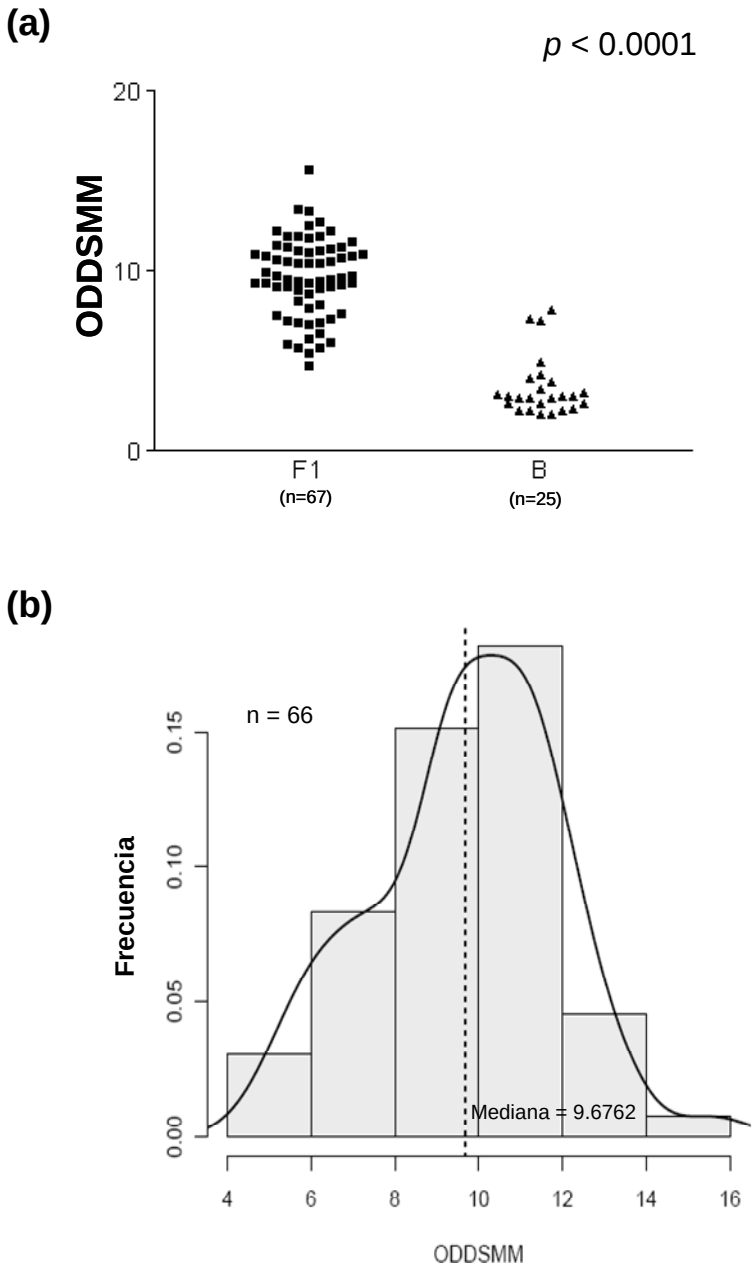

Figura R8. Edición mediada por APOBEC3 e índice ODDSMM. La comparación de los valores de ODDSMM entre los subtipos F1 y B de HIV- 1 mostraron diferencias estadísticamente significativas (prueba de suma de rangos de Wilcoxon) **(a)**. Distribución normal de ODDSMM para 66 casos en los que HIV-1 se determinó como subtipo F1 tanto en región cPPT del gen *pol* como en gen *vif* **(b)**.

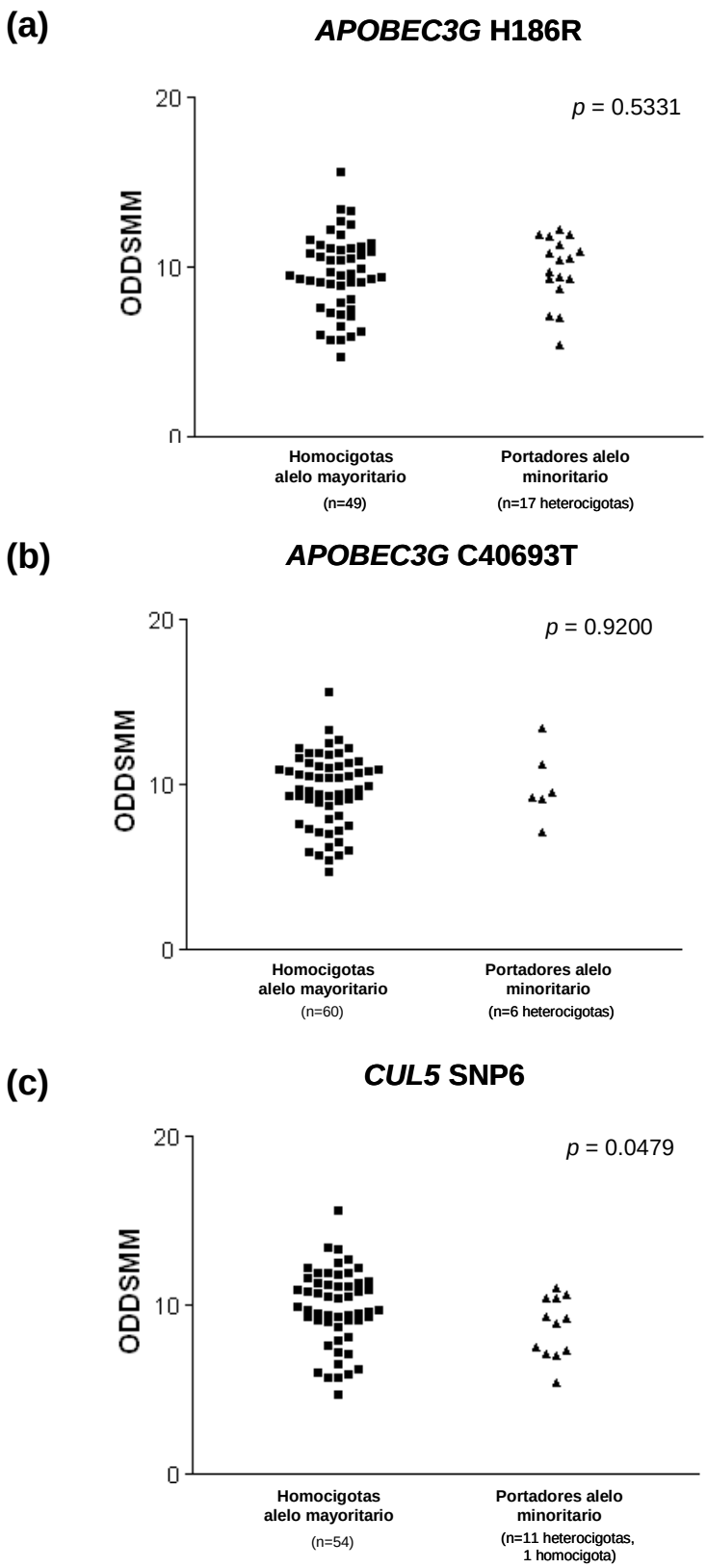

Figura R9. Asociación de la edición con polimorfismos en *APOBEC3G* / *CUL5*. No se observaron diferencias en el nivel de edición entre los genotipos de *APOBEC3G* H186R y *APOBEC3G* C40693T **(a, b)**. El alelo minoritario de *CUL5* SNP6 se relacionó con niveles de edición más bajos **(c)**. Comparaciones por prueba de suma de rangos de Wilcoxon.

4.3.3 Edición mediada por APOBEC3 y variabilidad de Vif

Se evaluó luego si las diferencias en el nivel de edición se hallaban asociadas con diferencias en la variabilidad de Vif. Los casos estudiados se dividieron de acuerdo a su ODDSMM en dos grupos mostrando valores por debajo o por encima de la mediana, para después comparar entre ellos la entropía en cada posición de Vif. El análisis indicó que una entropía incrementada en los sitios 46, 122 y 160 estaba vinculada con un ODDSMM más bajo, en tanto que una entropía incrementada en el sitio 182 se vinculaba con un ODDSMM más alto (**Fig. R10a)**. Seguidamente, los niveles de edición exhibidos por Vif *wild type* fueron contrastados directamente con aquellos mostrados por los mutantes para las posiciones mencionadas. Aunque los gráficos de dispersión revelan valores distribuidos en rangos superpuestos, diferencias estadísticamente significativas fueron halladas entre las variantes de Vif para los sitios 46, 122 y 160 (prueba de suma de rangos de Wilcoxon $p < 0.05$, **Fig. R10b-e**). La presencia simultánea de estas mutaciones fue evaluada sin que se observen asociaciones entre ellas (prueba de correlación de rangos de Spearman $p > 0.05$).

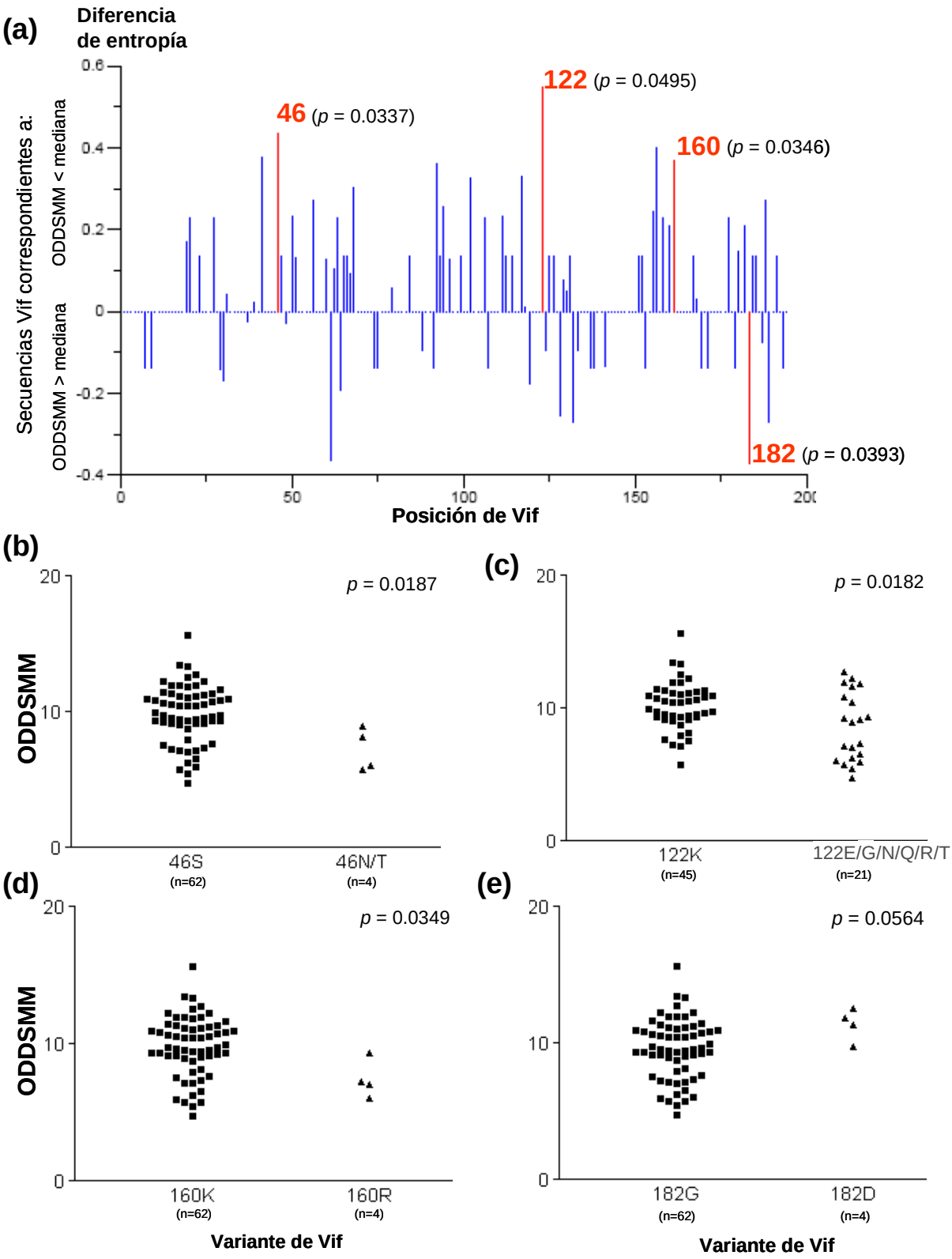

Figura R10. Asociación de la edición con variantes de Vif. Las posiciones de Vif con diferencias de entropía en relación con nivel de edición se encuentran indicadas (evaluación estadística mediante 10000 aleatorizaciones) **(a)**. Comparación de ODDSMM entre Vif *wild type* y mutante. Evaluación estadística por prueba de suma de rangos de Wilcoxon **(b-e)**.

4.3.4 Edición mediada por APOBEC3 y progresión a SIDA pediátrico

Para determinar la relevancia de la edición para el desarrollo de la enfermedad en nuestra cohorte pediátrica, se evaluó si las variaciones de ODDSMM estaban vinculadas con cambios en el tiempo a SIDA. En primera instancia se efectuó un análisis tratando el espectro de edición de manera continua, sin que se evidencie una asociación para los 66 casos considerados (regresión de riesgos proporcionales de Cox, prueba de razón de verosimilitudes p = 0.9884). Luego, se practicó un análisis considerando dos niveles de edición (por encima o por debajo de la mediana de ODDSMM), pero los pacientes de ambos grupos mostraron tasas de progresión similares (prueba de *Log-rank* de Mantel-Cox p = 0.7356, **Fig. R11**). Además, para descartar la terapia como una posible variable confundente, se realizaron análisis censurando a los pacientes al tiempo de inicio de HAART, pero esto tampoco sugirió asociación alguna (no mostrado). De esta manera, los niveles de edición observados parecieron no tener efecto sobre el riesgo de desarrollo de SIDA pediátrico.

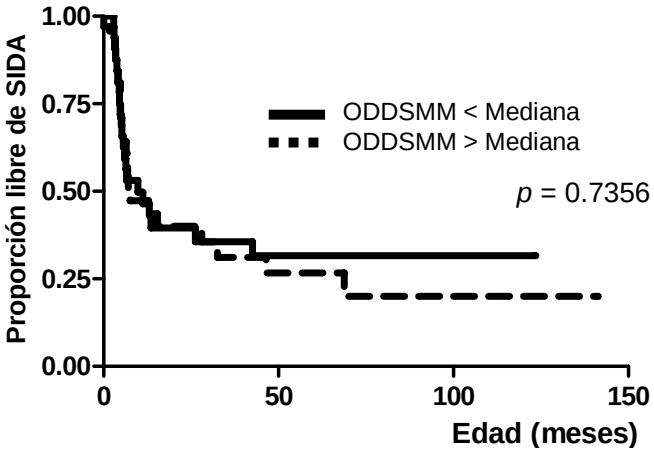

Figura R11. Edición y tiempo de inicio de SIDA. El método de Kaplan-Meier fue usado para estimar la proporción libre de SIDA para los pacientes separados según nivel de ODDSMM por debajo o por encima de la mediana. Evaluación estadística mediante la prueba de Log-rank de Mantel-Cox.

En este punto, a pesar de no haberse evidenciado relación entre las variables consideradas, nos propusimos indagar acerca del posible efecto que las alteraciones previamente asociadas con una progresión más rápida de la enfermedad (INS61, A62D/N/S y Q136P) pudieran tener sobre la edición. Aunque no fuera destacada por el análisis basado en entropía posicional del apartado anterior, la mutación INS61 se vinculó por una tendencia a niveles incrementados de edición (prueba de suma de rangos de Wilcoxon p = 0.0583, no mostrado). Debe notarse que tal estimación se apoyó en un grupo de sólo tres casos debido a la baja frecuencia de la inserción de interés. Intentamos por tanto ampliar el número de pacientes para la variante Vif INS61 mediante la obtención de secuencias provirales del hermano de uno de estos niños, nacido un año y medio después e infectado también de manera perinatal (la muestra empleada se tomó a los 4.3 meses de edad). La presencia de la alteración INS61 se verificó en este caso adicional, el que interesantemente exhibió al igual que su hermano un desarrollo temprano de SIDA (previo a los 4 meses en ambos niños) acompañado de un valor aumentado de ODDSMM (cercano a 13.4). Logró así reunirse un conjunto de cuatro casos para el que se registró una asociación significativa entre INS61 y medidas de edición más altas (prueba de suma de rangos de Wilcoxon p = 0.0149, no mostrado). Aunque la falta de independencia debida al parentesco entre dos de los niños nos obliga a interpretar la evaluación estadística realizada sólo como orientativa, debe destacarse la congruencia del caso adicional con lo observado para el resto de los pacientes. Por lo tanto, mediante la aproximación efectuada, se delinea un patrón que permite especular acerca de un efecto de Vif INS61 tanto sobre la progresión a SIDA como sobre el nivel de edición en la población de HIV-1.

4.3.5 Edición mediada por APOBEC3 y divergencia filogenética viral

Para explorar si la edición afecta los procesos evolutivos de HIV-1, árboles filogenéticos fueron construidos con las secuencias obtenidas para el segmento de *pol* y para el gen *vif* completo. Se advirtió que para las dos regiones había una correspondencia inversa entre el largo de rama y el nivel de edición (**Fig. R12a y b**). La distancia genética de cada secuencia de *pol* o *vif* al respectivo consenso (generado para los 66 casos de subtipo F1) mostró para ambas regiones genómicas del virus una correlación negativa con los valores de ODDSMM (prueba de correlación de rangos de Spearman $p < 0.05$, **Fig. R12c y d**).

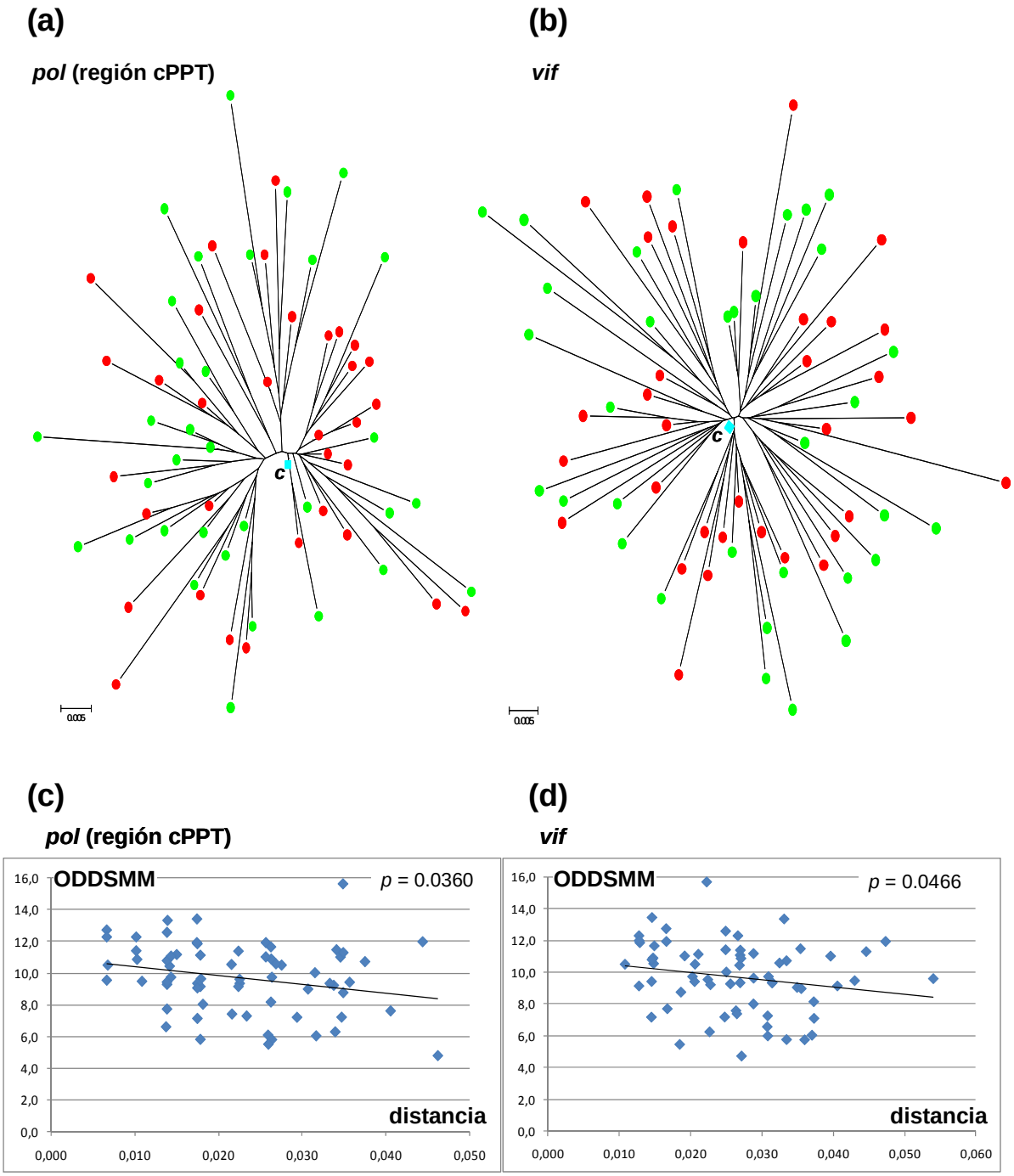

Figura R12. Edición y divergencia viral. Los árboles filogenéticos para la región cPPT de *pol* y para el gen *vif* completo exhiben una correspondencia inversa entre el largo de rama y el nivel de edición (círculos verde claro: ODDSMM < mediana, círculos rojo oscuro: ODDSMM > mediana, *c*: consenso). Método de Neighbor-joining, modelo Tamura-Nei + gamma. No hubo valores de *bootstrap* por encima del 70% (1000 réplicas) **(a, b)**. Las distancias genéticas de cada secuencia al consenso se correlacionaron negativamente con el ODDSMM en ambas regiones genómicas de HIV-1 estudiadas. Evaluación estadística por la prueba de correlación de rangos de Spearman **(c, d)**.

4.4 Análisis de *vif* en progresores lentos pediátricos

4.4.1 Pacientes de interés: Identificación de progresores lentos y sus características

Para evaluar si defectos en *vif* de HIV-1 contribuyen a demorar el inicio del SIDA pediátrico, se obtuvieron secuencias provirales de *vif* provenientes de niños que han exhibido una tasa de progresión de la enfermedad en extremo lenta **(Tabla R3)**. Este grupo comprendió 11 pacientes infectados perinatalmente por HIV-1 (incluyendo un par de hermanos) que fueron seleccionados en base a su característica distintiva de no desarrollar SIDA por más de 8 años en ausencia de terapia antirretroviral. Debe notarse que estos progresores lentos corresponden a menos del 2% de los casos en nuestra población pediátrica infectada por HIV-1. Por lo tanto, estos niños podrían resultar altamente informativos en lo que concierne a factores determinantes de una atenuación viral. Además, para establecer comparaciones, se emplearon los genes *vif* provirales de los 93 niños infectados perinatalmente por HIV-1 ya antes analizados. Estos pacientes pueden considerarse en conjunto como progresores típicos, constituyendo un grupo control apropiado por no incluir casos que hayan exhibido una progresión tardía de la enfermedad, independientemente de la terapia antirretroviral **(Fig. R13)**.

En base al total de determinaciones disponibles para cada paciente, los progresores lentos mostraron valores significativamente reducidos para la máxima carga viral (prueba de suma de rangos de Wilcoxon $p < 0.001$) y una tendencia a valores incrementados para el mínimo porcentaje de células T CD4+ (prueba de suma de rangos de Wilcoxon $p = 0.064$) respecto de los progresores típicos **(Fig. R14)**.

Tabla R3. Datos epidemiológicos, bioquímicos y clínicos de los progresores lentos.

Progresor lento	Género	Fecha nacimiento (mes/año)	Fecha última visita (mes/año)	Carga viral		Células T CD4+		SIDA clínico (meses)[b]	Terapia antirretroviral		Secuencia *vif*	
				Rango (log)	Mediana (n)[a]	Rango (%)	Mediana (n)[a]		Inicio (meses)[b]	Drogas	Código	Toma de muestra (meses)[b]
JDM	F	11/92	09/07	<1.7 - 5.1	4.1 (15)	10 - 23	19 (13)	146	105	3TC AZT EFV	F856-JDM	125
VA [c]	M	12/91	01/08	<1.7 - 5.3	4.6 (17)	21 - 41	30 (21)	-	179	3TC AZT EFV	I842-VA	168
VT [c]	M	01/96	01/08	<1.7 - 4.8	3.2 (14)	13 - 37	27 (16)	-	117	3TC AZT EFV	I270-VT	113
GI	M	10/90	04/03	2.8 - 3.8	3.1 (6)	26 - 55	33 (9)	-	-		C303-GI	116
BML	F	07/87	05/07	<1.7 - 5.4	3.1 (20)	21 - 66	52 (34)	-	115	ddI	C997-BML	162
PFS	M	01/94	10/07	<1.7 - 4.4	2.6 (28)	25 - 39	32 (35)	-	-		F83-PFS	104
SGR	F	12/92	05/07	<1.7 - 4.1	2.8 (20)	20 - 39	27 (20)	123	149	3TC AZT EFV	H129-SGR	137
EHL	M	08/95	11/07	<1.7 - 4.9	3.8 (22)	18 - 34	23 (26)	-	141	3TC AZT EFV	K97-EHL	128
GLOA	F	11/98	02/08	<1.7 - 4.0	2.9 (29)	21 - 43	36 (33)	-	*13**	AZT ddI NFV	B693-GLOA	11
SCJ	M	06/95	06/06	3.3 - 3.5	3.4 (2)	27 - 31	29 (2)	-	-		K100-SCJ	130
FSA	F	01/95	04/06	4.0 - 4.9	4.3 (6)	13 - 24	22 (12)	-	-		I661-FSA	130

[a] Número total de determinaciones disponibles, [b] Edad del paciente, [c] Hermanos

* Tratamiento interrumpido luego de 5 meses

F: femenino, M: masculino

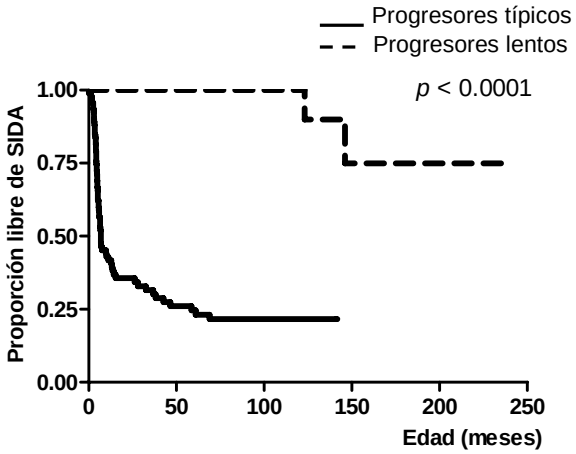

Figura R13. Diferentes perfiles de progresión clínica. Se aprecia el contraste en los tiempos de inicio de SIDA entre los progresores lentos (n = 11) y los progresores típicos (n = 93). Evaluación estadística mediante la prueba de *Log-rank* de Mantel-Cox.

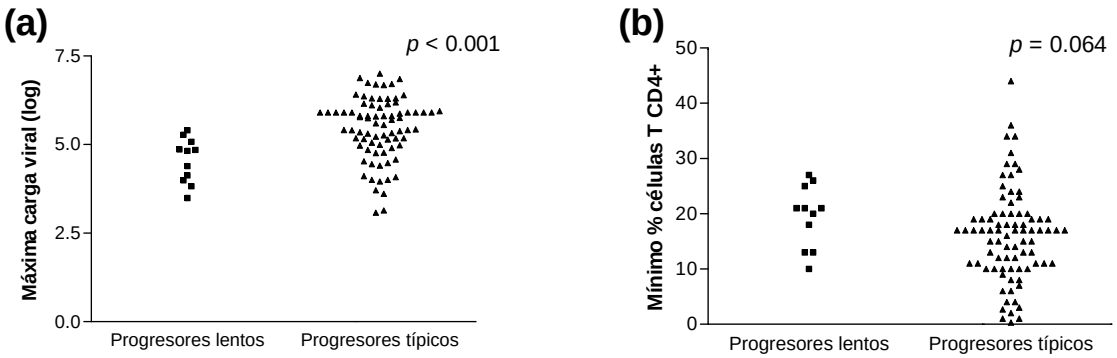

Figura R14. Niveles de ARN de HIV-1 y células T CD4+ en niños con diferentes perfiles de progresión. Se comparan entre los progresores lentos y los progresores típicos los valores para la máxima carga viral (log) registrada **(a)** y los valores para el mínimo porcentaje de células T CD4+ registrado **(b)**. Evaluación estadística por prueba de suma de rangos de Wilcoxon.

4.4.2 Secuencias nucleotídicas de *vif* en progresores lentos: Filogenia, conservación estructural, heterogeneidad e hipermutación

Con el objeto de establecer si los virus en progresores lentos derivan en común de una cepa de HIV-1 ancestral con virulencia reducida, se realizó un análisis filogenético con las 104 secuencias *vif* obtenidas de progresores lentos y de progresores típicos. En el árbol filogenético, los genes *vif* se dispusieron entremezclados en cuanto a la tasa de progresión de la enfermedad y se distribuyeron de forma similar entre los conjuntos correspondientes al subtipo B y al subtipo F1 **(Fig. R15)** (además, la secuencia del progresor lento FSA se identificó como recombinantes B/F1). Por consiguiente, no se halló evidencia para un vínculo epidemiológico que pueda explicar la condición clínica compartida por los niños progresores lentos.

El examen de los genes *vif* hallados en los progresores lentos no reveló alteraciones de importancia, sin que se aprecien inserciones, codones de terminación prematuros o falta del codón de iniciación en ninguno de los casos. De esta manera, no se verificaron defectos groseros en *vif* que mostraran una distinción clara entre las secuencias de progresores lentos y las de progresores típicos.

Seguidamente, la heterogeneidad de *vif* fue estudiada a través del cálculo de la distancia nucleotídica (usando distancia p) dentro y entre los grupos de progresores lentos y típicos. En los casos de subtipo F1 (5 progresores lentos y 76 típicos), el valor de la mediana para la distancia de a pares fue de 0.041 dentro de los progresores lentos, de 0.039 dentro de los típicos y de 0.041 entre los niños de ambos grupos **(Fig. R16)**. No hubo diferencias estadísticamente significativas (prueba t standard para dos muestras $p > 0.05$). Esto se observó también en los casos de subtipo B (5 progresores lentos y 11 típicos), aunque valores de mediana más altos fueron estimados para las distancias

dentro y entre los grupos (alrededor de 0.070, no mostrado). Por lo tanto, para el gen *vif*, los progresores lentos y los progresores típicos exhibieron niveles similares de heterogeneidad y no se diferenciarían en términos de diversidad nucleotídica.

Además, la incidencia de edición mediada por APOBEC3 en los genes *vif* fue investigada. El programa Hypermut 2.0 no indicó a ninguna de las secuencias como hipermutada, evaluando un patrón de edición ya sea general (GR) o específico (GG o GA).

4.4.3 Secuencias aminoacídicas de Vif en progresores lentos: Detección de cambios distintivos, su frecuencia en base de datos y regiones afectadas

Las proteínas deducidas fueron luego estudiadas para identificar sustituciones aminoacídicas que pudieran dar cuenta de una actividad alterada en aquellas variantes de Vif observadas en progresores lentos. A tal fin, se efectuó un análisis posición por posición. Se observó que 85 sitios no mostraron variación en el set completo de secuencias Vif obtenido de progresores lentos y progresores típicos, 70 sitios mostraron variación en ambos grupos, 33 sitios mostraron variación sólo en progresores típicos y, de manera interesante, 4 sitios mostraron variación restringida a progresores lentos. Por tanto, el análisis subsiguiente se centró en los cambios hallados en estas últimas 4 posiciones. Las mutaciones detectadas fueron M8L, V13I, V55T y L81M, las cuales se presentaron en forma separada en las secuencias de Vif de los pacientes EHL, GI, FSA y PFS, respectivamente **(Fig. R17)**.

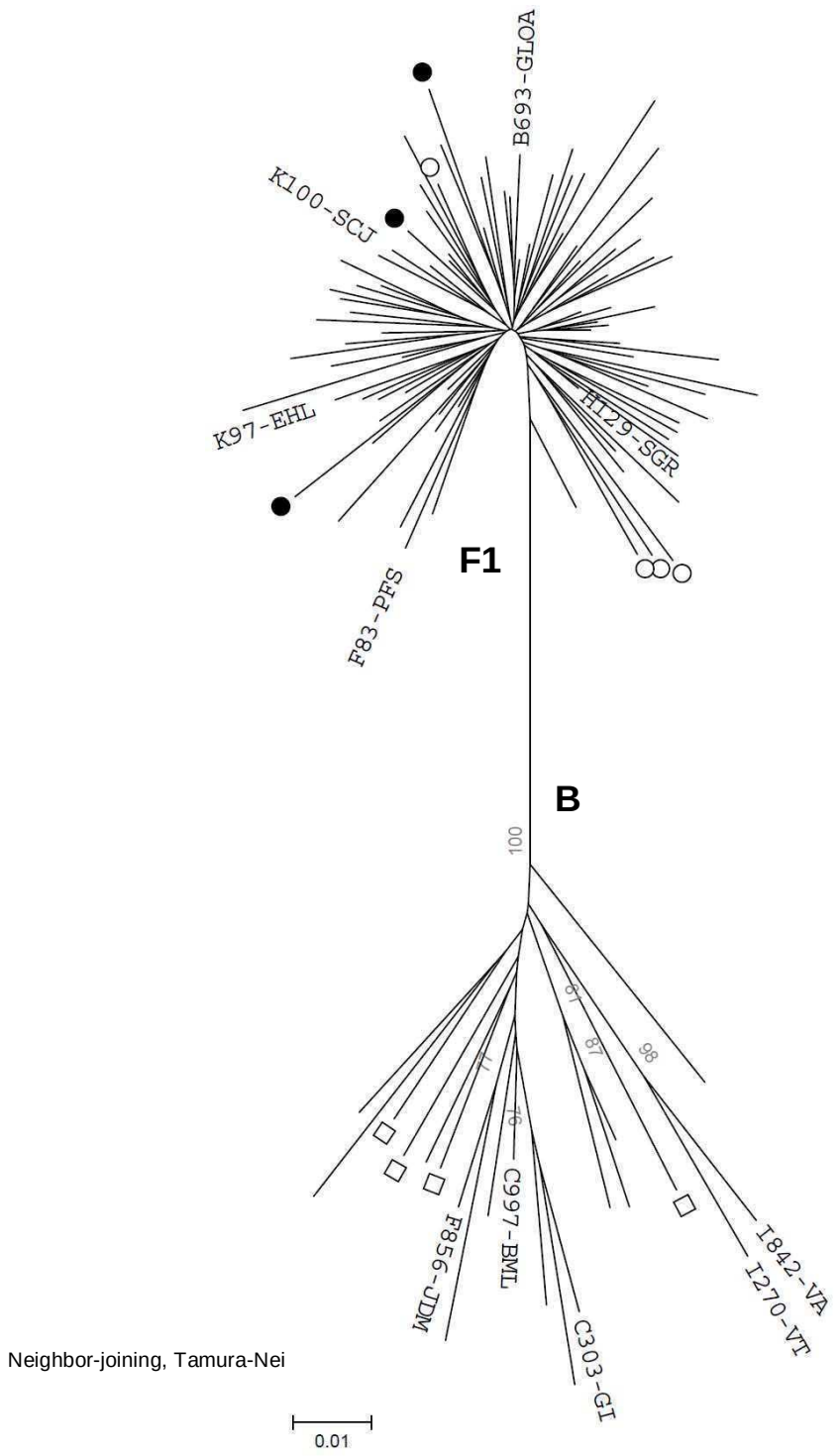

Figura R15. Análisis filogenético de genes *vif* obtenidos de progresores lentos. El árbol muestra la distribución entre los subtipos F1 y B de 10 de los genes *vif* (códigos indicados, 1 recombinante B/F1 omitido) hallados en niños progresores lentos. Cuadrados blancos: Referencias B, Círculos negros: Referencias CRF_12, Círculos blancos: Referencias F1. Se indican sólo los valores de *bootstrap* (1000 réplicas) superiores al 70%.

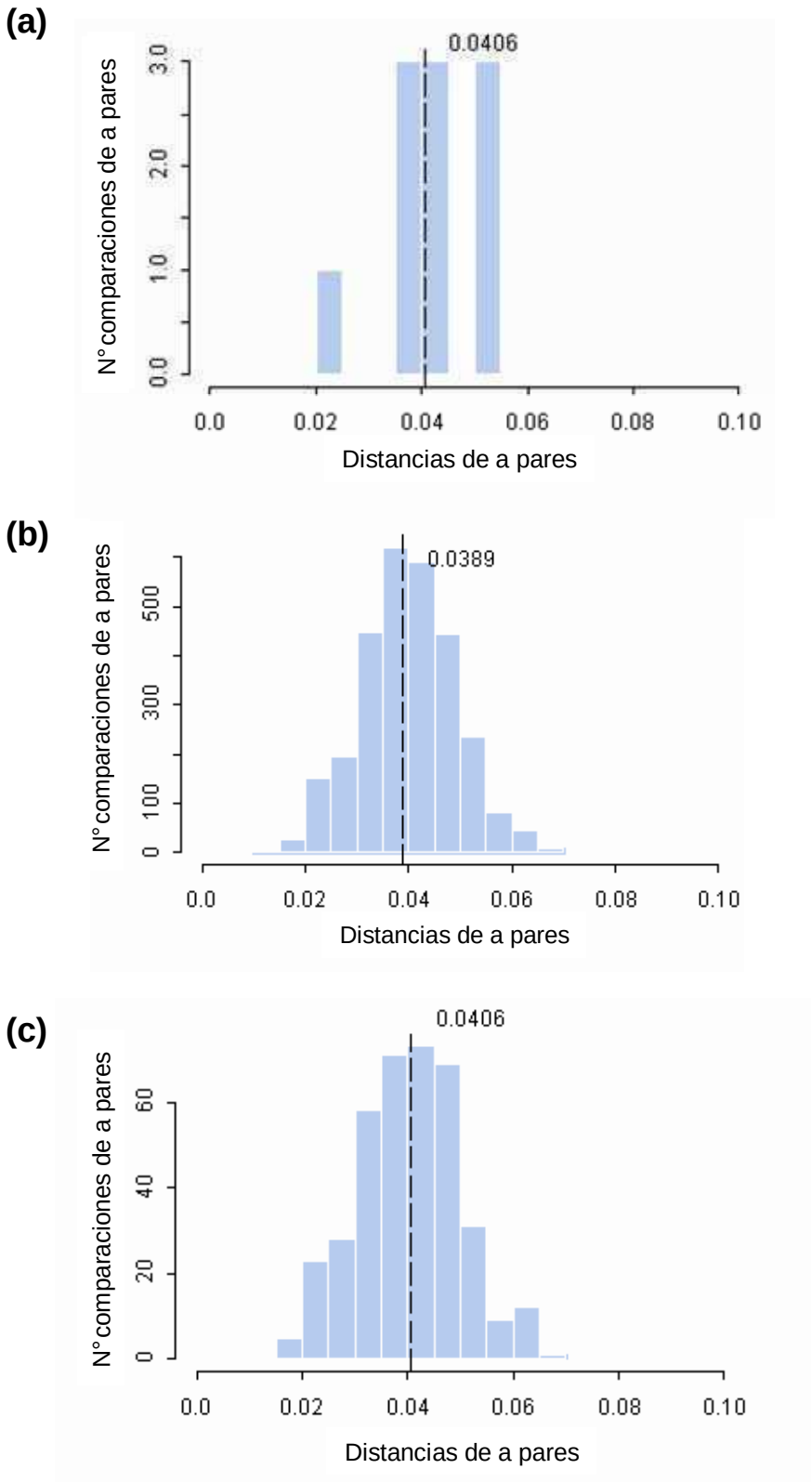

Figura R16. Heterogeneidad del gen *vif*. Distribución de las distancias nucleotídicas de a pares (distancia p) de las secuencias de subtipo F1 para las comparaciones dentro del grupo de progresores lentos **(a)**, dentro del grupo de progresores típicos **(b)** y entre los grupos de progresores lentos y típicos **(c)**. Se indican las medianas.

```
                                A3F     A3G  A3F                A3G                    A3G  A3F        A3F     A3G  A3F     A3G  A3F
                          11Wx2DRMR17 21WxSLVK26              40YRHHY44              55VxIPLx4LxΦx2YWxL72 74TGERxW79 81LGxGx2IxW89 96TQx5ADx2I107
HXB2(B)          MENRWQVMIV WQVDRMRIRT WKSLVKHHMY VSGKARGWFY RHHYESPHPR ISSEVHIPLG DARLVITTYW GLHTGERDWH LGQGVSIEWR KKRYSTQVDP
F856-JDM (B)     ---------- --------K- ---------- --K--K---- ---F--T--K ---------- ---------- -------E-- ---------- -R---S----
I842-VA  (B)     ---------- --------N- ------Y--- ------E-S- ------HN-- ---------- --G------- ---------- ---------- -kK-------
I270-VT  (B)     ---------- --------N- ------Y-K- I-K--KD-S- -----N-N-- ---------- --G------- ---------- ---------- --K-------
C303-GI  (B)     ------A--- --I------- ---------H I-------V- ----Q-NN-- V--------- --K------- ---------- ----A----- --G-------
C997-BML (B)     ---------- ---------- ---------- I---TKK-V- ------TN-- ---------- --K------- ---------- ---------- -E--------
F83-PFS  (F1)    ---------- --------N- ------Y--H I-K--KR-S- ------R--- ---------E T-K------- ---------- M--------- QGK-R--I--
H129-SGR (F1)    ---------- --------nt ------Y-IH I-K--KR-V- ---F--R--- V--------E E-K------- ---t------ ---------- qG-----I--
K97-EHL  (F1)    -------I-- --------N- ------Y--H I-K--KR-S- ---F--R--- V--------E A-N------- ---------- ---------- QG--R--I--
B693-GLOA(F1)    ---------- --------N- ------Y--H --K--Kr-f- ---F--R--K ---------E A-E------- -------d-- ---------- QG--R--I--
K100-SCJ (F1)    ---------- --------N- ------Y--- S-K--SR-V- ---F--R--- V--------E E-K------- --N----E-- ---------- QG--R--I--
I661-FSA (B/F1)  ---------- ---------- ---------- I-------V- K---Q-T--- ----T----- --KV-V---- ---------- ------V--- QG--T--I--
Posición                                |20                  |40                  |60                  |80                  |100

                                Cul5                                EloC                Cul5 EloB A3G  A3F
                          HCCH motif: 108Hx5Cx18Cx5H139       BC-Box: 144SLQYLA149     161PPLPx4L169 171EDRW174
HXB2(B)          ELADQLIHLY YFDCFSDSAI RKALLGHIVS PRCEYQAGHN KVGSLQYLAL AALITPKKIK PPLPSVTKLT EDRWNKPQKT KGHRGSHTMN GH*
F856-JDM (B)     N--------- ------E--- -H-I------ -S-------- ---------- ---Tk--R-- ------V--- ---------- ---------- ---
I842-VA  (B)     DI-------- ------E--- -NTI--YR-R -S-------- ---------- T---K--RR- ------K--- -------R-- -----N---S ---
I270-VT  (B)     DI-------- ------E--- -N-----R-R S--------- ---------- T---K---K- ------K--- ---------I ----EN---- ---
C303-GI  (B)     N--------- ------E--- -n-I------ ---------- ---------- ---T--k-i- ------a--- ------p-k- k--K------ ---
C997-BML (B)     N--------- ------E--- ---I------ ---------- ---------- ---T----T- ------A--- ---------- ---------- ---
F83-PFS  (F1)    G-------I- ---------- --VI---RI- ---N------ ---------- T---A---TR ------K--V ------S-E- RD-------- ---
H129-SGR (F1)    G-------I- ------E--- ---I---KI- ---N------ ---------- T---A---T- ------K--V --------E- R--------- ---
K97-EHL  (F1)    G-------I- -----AE--- -N-I---RI- ---N------ ---------- T---A-Q-A- ------Q--V -----N---- R-R------- ---
B693-GLOA(F1)    G-------V- ------E--- ---I--QK-- ---N------ ---------- T---A---T- ------Q--V ---------- R----N---n ---
K100-SCJ (F1)    G-------I- ------E--- ---I---KI- ---N------ ---------- T---A---T- ------K--V --------E- R--------- ---
I661-FSA (B/F1)  D-------G- ------E--- ---I---K-- ---N------ ---------- T---A---TR ------K--V --------E- R--------- ---
Posición                                |120                 |140                 |160                 |180                 |192
```

Figura R17 (pág. anterior). Secuencias Vif de HIV-1 en progresores lentos. El subtipo (B, F1 o recombinante B/F1) se indica para cada secuencia. Las proteínas son comparadas con la referencia de subtipo B HXB2 (K03455) en la línea superior. Los cambios en los sitios con variación sólo en los progresores lentos se destacan en negro. Los aminoácidos en minúscula indican los sitios para los que se detectó una población mixta (se muestra la alternativa de mayor frecuencia para el correspondiente subtipo). La región amino terminal incluye principalmente dominios importantes para el reconocimiento de APOBEC3G (A3G) y/o APOBEC3F (A3F), mientras que la región carboxilo terminal contiene dominios requeridos para el reclutamiento de ElonguinaC (EloC), ElonguinaB (EloB) y Culina5 (Cul5) en un complejo ubiquitin ligasa (representdo de acuerdo con Dang et al. [2010b] y He et al. [2008]).

Para estimar la posible relevancia de estas mutaciones para la función de Vif, su frecuencia fue estudiada en 1599 secuencias del *Filtered Web Alignment* 2009 de la base de datos de HIV-1 de LANL. Mientras que M8L fue comúnmente observada en Vif de ciertos clados virales (principalmente subtipo C y diversos recombinantes), los cambios V13I, V55T y L81M presentaron frecuencias de 1.1%, 0.1% y 0.8%, respectivamente, todos ellos afectando sitios altamente conservados (frecuencia del residuo predominante del 98% o mayor) **(Fig. R18)**. De esta manera, de los 4 cambios inicialmente identificados en progresores lentos, 3 pueden ser considerados como sustituciones inusuales en posiciones que exhiben muy baja variabilidad a través de secuencias Vif de diferentes subtipos de HIV-1.

El papel de las mutaciones V13I, V55T y L81M en la tasa de progresión de la enfermedad fue investigado mediante el análisis de un set de 50 secuencias (una por paciente) proveniente de controladores de elite (individuos con enfermedad no progresiva que controlan la replicación de HIV-1) recuperado de la base de datos de HIV-1 de LANL. El cambio V13I se halló en 2 (4%) casos, V55T en 1 (2%) casos y L81M en 2 (4%) casos. La frecuencia global en controladores de elite para estas mutaciones fue significativamente mayor que la observada en secuencias del *Filtered*

Web Alignment 2009 de la base de datos de HIV-1 de LANL (prueba de chi cuadrado de Pearson $p < 0.001$).

Se exploró luego el efecto potencial de las sustituciones V13I, V55T y L81M analizando si éstas ocurrían en posiciones previamente descriptas como relevantes para la actividad de Vif **(Fig. R17)**. Interesantemente, se verificó que estas mutaciones se localizan en tres diferentes motivos de Vif descriptos como importantes para su interacción con APOBEC3G/APOBEC3F [Russell y Pathak, 2007; He et al., 2008; Dang et al., 2010a; Dang et al., 2010b].

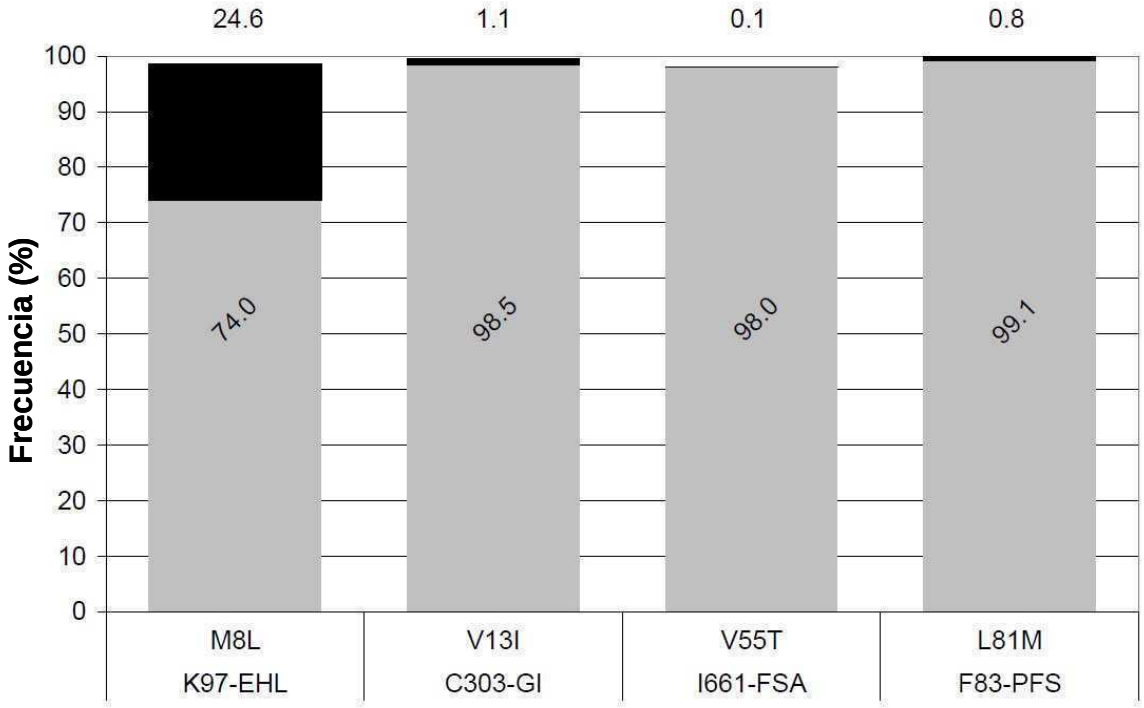

Figura R18. Frecuencia de cambios detectados en secuencias Vif de progresores lentos. La frecuencia en la base de datos de HIV-1 de LANL (1599 secuencias del *Filtered Web Alignment* 2009) para el residuo predominante (barra gris) y el mutante (barra negra) se muestra para las sustituciones M8L, V13I, V55T y L81M.

4.4.4 Evaluación de las sustituciones inusuales en Vif de progresores lentos como variantes de escape

Se evaluó en los niños la presencia de variantes de HLA que pudieran seleccionar positivamente las sustituciones inusuales en Vif y también contribuir a la progresión lenta. A tal fin, se llevó adelante un análisis focalizado en los alelos de HLA-B. Los genotipos de los pacientes GI, PFS y FSA fueron determinados como B*1302/B*1402, B*1402/B*4801 y B*1517/B*3801, respectivamente. Un rol protector durante la infección por HIV-1 no ha sido reportado para los alelos de HLA-B hallados, excepto por B*1302 [Honeyborne et al., 2007]. Las mutaciones V13I, V55T y L81M no parecen disrumpir epítopes de reconocimiento para células T CD8+, tal como puede predecirse en base al genotipo HLA-B del correspondiente hospedador. Por lo tanto, según nuestro análisis, las secuencias de Vif portando sustituciones inusuales que fueron observadas en progresores lentos no parecen constituir variantes de escape.

5 DISCUSIÓN

En el presente trabajo se estudió la variabilidad del sistema Vif-APOBEC3 en el contexto de la infección perinatal por HIV-1 y su influencia sobre el desarrollo de SIDA infantil. Habiendo transcurrido ya casi una década desde la identificación de APOBEC3G (llamado primeramente CEM15) como factor capaz de restringir la replicación de HIV-1 en ausencia de Vif [Sheehy et al., 2002], y luego de que un sinnúmero de investigaciones dirigidas a esclarecer diversos aspectos de esta particular vía de interacción entre virus y hospedador se hayan desarrollado, pocos estudios han sido realizados en el escenario pediátrico [Amoêdo et al., 2011; Koulinska et al., 2003] Además, debe destacarse que, en nuestro conocimiento, el actual trabajo constituye el primero en ser llevado a cabo en población argentina. De esta manera, se pone de relieve el valor de la investigación efectuada como labor de tesis doctoral.

5.1 Variabilidad del sistema Vif-APOBEC3 y SIDA pediátrico

Se comenzó investigando la relevancia de los polimorfismos *APOBEC3G* H186R, *APOBEC3G* C40693T y *CUL5* SNP6 para el riesgo de infección por HIV-1 y la progresión a SIDA en un importante número de niños expuestos perinatalmente. El análisis no mostró evidencia de un efecto de los SNPs estudiados sobre la transmisión de HIV-1 o la progresión de la enfermedad. Por tanto, nuestros resultados estuvieron de acuerdo con lo informado para cohortes de ascendencia europea respecto de los polimorfismos *APOBEC3G* H186R y *CUL5* SNP6 [An et al., 2004; An et al., 2007; Do et al., 2005; Valcke et al., 2006]. Sin embargo, el SNP *APOBEC3G* C40693T se detectó similarmente distribuido en los grupos de individuos infectados y expuestos no infectados, a diferencia de lo originalmente reportado en caucásicos [Valcke et al., 2006]. Debe tenerse en cuenta que las poblaciones previamente estudiadas consistieron

principalmente de adultos expuestos por contacto sexual o por el uso de drogas inyectables y no de pacientes pediátricos. Además, se han reportado variaciones en las frecuencias alélicas de los polimorfismos de *APOBEC3G* y *CUL5* que se relacionaron con la etnia poblacional. Para el polimorfismo *APOBEC3G* H186R, el alelo minoritario mostró en nuestra población pediátrica argentina una frecuencia cercana al 9%, la cual parece ligeramente superior a aquellas previamente observadas en poblaciones de ascendencia europea (3-7%) [An et al., 2004; Do et al., 2005; Valcke et al., 2006] pero marcadamente inferior a las reportadas para poblaciones de ascendencia africana (31-37%) [An et al., 2004; Reddy et al., 2010]. Para el polimorfismo *APOBEC3G* C40693T, se halló una frecuencia para el alelo minoritario de alrededor del 6%, próxima al 4.4% informado para caucásicos infectados [Valcke et al., 2006]. Para el polimorfismo *CUL5* SNP6, nuestra población pediátrica exhibió una frecuencia para el alelo minoritario de 8%, la que es intermedia entre las previamente reportadas de 5% para afroamericanos y de 11% para europeoamericanos [An et al., 2007].

Se analizó también el gen *vif* de HIV-1 presente en muestras tempranas de pacientes pediátricos. El estudio se practicó sobre la población proviral, la cual se ha demostrado apropiada para la detección de formas hipermutadas [Land et al., 2008; Russell et al., 2009]. Sin embargo, este fenómeno no fue observado en ninguna de las 93 secuencias *vif* obtenidas para nuestro estudio de cohorte. Por tanto, la detección de secuencias hipermutadas fue planteada como una meta ulterior.

Además, la variabilidad de la proteína Vif de subtipo F1 fue explorada en detalle en cuanto a su relevancia para la tasa de progresión de la enfermedad en niños. Se encontró que la inserción de un aminoácido en la posición 61 (INS61) y que las sustituciones A62D/N/S y Q136P podrían estar asociadas con un inicio temprano de SIDA. Estas alteraciones de Vif exhibieron una baja frecuencia en nuestra cohorte y

fueron colectivamente observadas en 9 de un total de 76 casos F1 estudiados. Esto indica que cerca del 12% de nuestros pacientes pediátricos podría presentar una variante perjudicial de Vif. Vale la pena mencionar que también se ha indagado sobre si una tasa de mutación incrementada podría estar ligada a un desarrollo temprano de SIDA, puesto que tal asociación podría ser un factor confundente afectando nuestra interpretación sobre la presencia de variantes específicas de Vif. En nuestro abordaje, buscando una correlación entre distancias genéticas de *vif* y tiempo a SIDA, no encontramos evidencia clara en favor de tal posibilidad. Esto constituiría un apoyo adicional para el rol que las formas de Vif identificadas potencialmente desempeñarían en la progresión de la enfermedad. Debe destacarse que las alteraciones ligadas a un desarrollo rápido de SIDA residen en dominios de Vif relevantes para la actividad de la proteína **(Fig. D1)**. Por un lado, INS61 y A62D/N/S se localizan dentro del motivo 55-VxIPLx$_4$L-64 que se ha reportado como implicado en la interacción de Vif con APOBEC3G y APOBEC3F [He et al., 2008]. Por otro lado, Q136P se ubica en el motivo HCCH, un dominio que abarca desde el sitio 108 al 139 y que es crítico para la capacidad de Vif de reclutar a Cul5 [Mehle et al., 2006; Xiao et al., 2006]. Por tanto, estas alteraciones pueden afectar la función de Vif mediante la modulación de su eficiencia de unión a diferentes proteínas del hospedador. Sin embargo, es difícil especular sobre la forma en que estas variantes particulares de Vif podrían contribuir a la patogenicidad viral. En tal sentido, dos diferentes posibilidades pueden ser consideradas. Primero, puede asumirse que estas variantes de Vif tienen una capacidad incrementada para contrarrestar a los factores de restricción, lo cual daría cuenta de una virulencia acentuada de HIV-1. Alternativamente, las variantes de Vif podrían tener una actividad anti-APOBEC3 disminuida que podría exponer al virus a un nivel moderado (subletal) de edición APOBEC3 [Sadler et al., 2010]. Esto podría representar una fuente de variabilidad que

facilitaría el surgimiento de formas virales de escape al sistema inmune o con resistencia a drogas. De esta manera, una progresión acelerada de la enfermedad puede ser determinada tanto por un incremento como por una reducción de la actividad de Vif **(Fig. D2)**. En cualquier caso, nuestros resultados señalan que las alteraciones de Vif pueden conducir a un aumento de virulencia y no sólo a la atenuación viral como usualmente se supone.

Interesantemente, se ha reportado que una inserción de dos aminoácidos en el mismo motivo donde hallamos las variaciones INS61 y A62D/N/S puede ser la responsable del status no progresor de un par madre-hijo infectado por HIV-1 subtipo B. El estudio mostró que la inserción reduce marcadamente la replicación viral en CMT, posiblemente por alterar la conformación y estabilidad de la proteína Vif [Alexander et al., 2002]. Aunque este caso reportado parece contradictorio con nuestros hallazgos, debe considerarse que el efecto sobre la progresión de la enfermedad de una determinada variante de Vif puede ser importantemente influenciada por el ambiente particular provisto por el hospedador, principalmente en lo que refiere a aquellos factores que regulan el nivel de actividad APOBEC3. Por tanto, las tasas opuestas de progresión de la enfermedad pueden ser interpretadas como diferentes resultados en el balance entre las actividades de APOBEC3 y Vif **(Fig. D3)**.

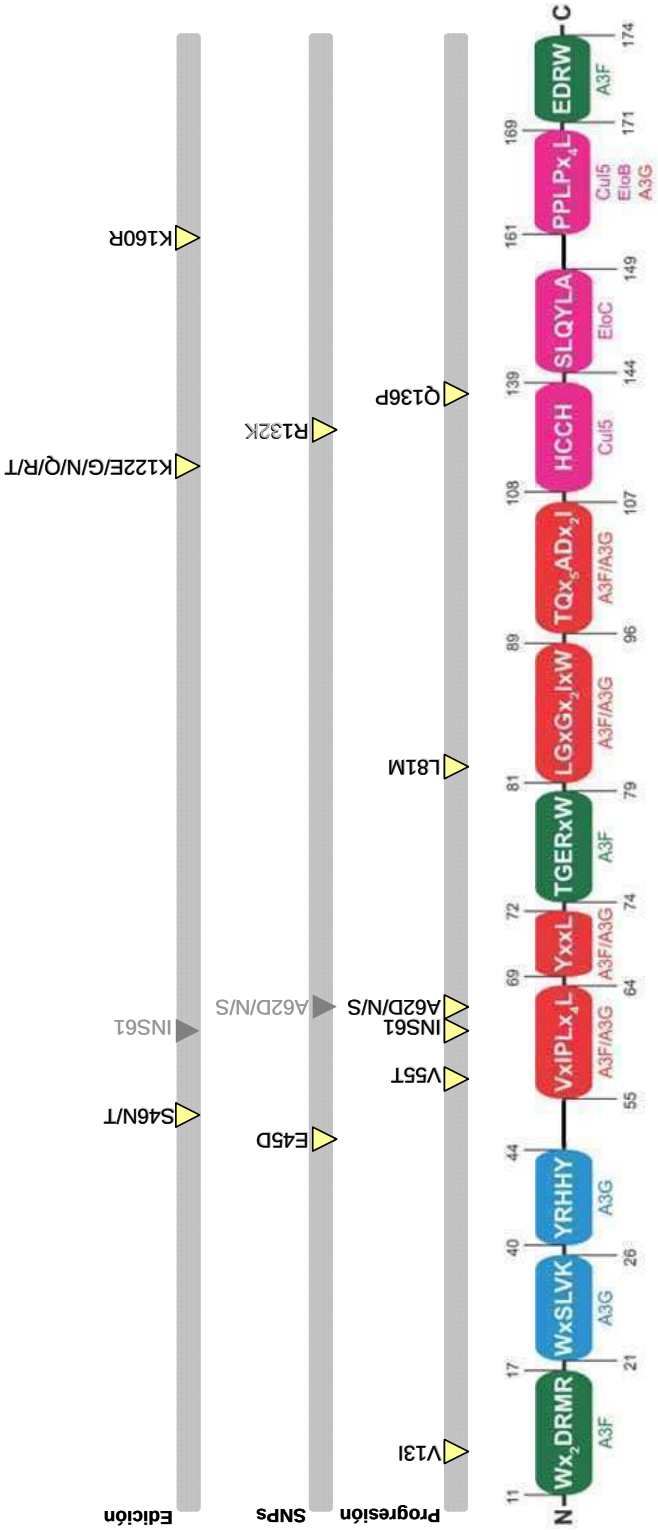

Figura D1. Mapa de la proteína Vif. Se indican las mutaciones que se observaron relacionadas con diferencias en la progresión a SIDA, SNPs de *APOBEC3G* o *CUL5* y variaciones en los niveles de edición. Se aprecian los motivos de Vif afectados en cada caso. Modificado de Dang et al. [2010b].

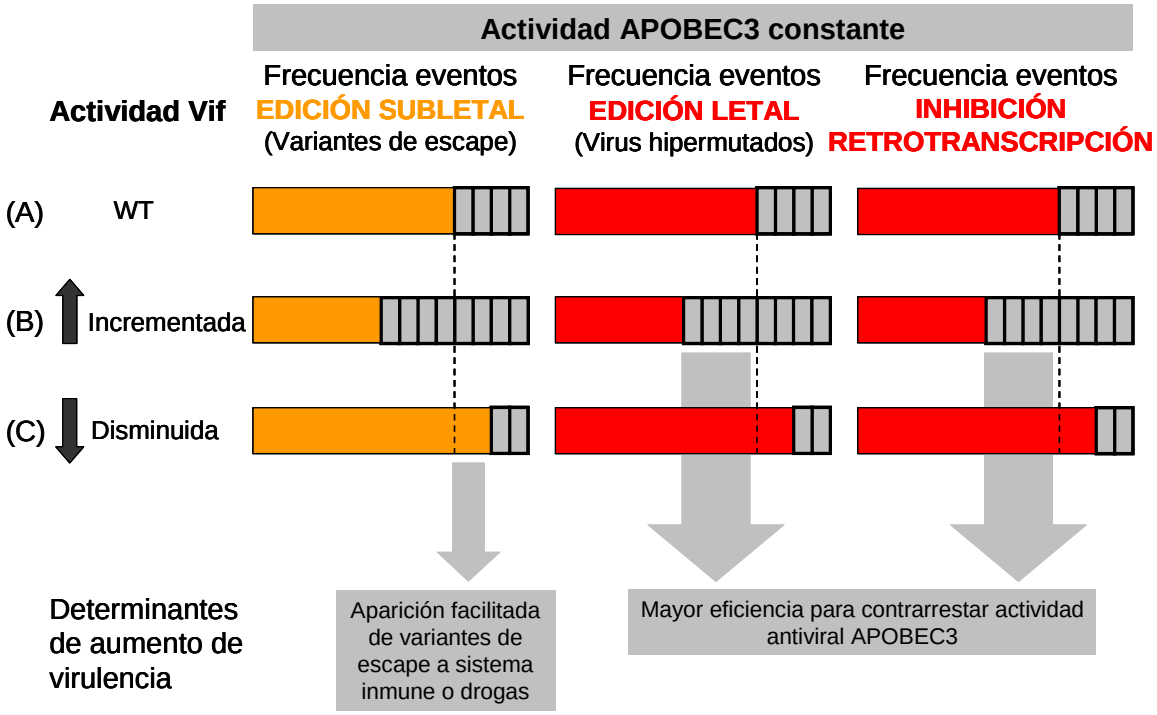

Figura D2. Eficiencia de Vif y progresión rápida de la enfermedad. Tanto el incremento como la disminución de la actividad de Vif pueden relacionarse con un desarrollo temprano de SIDA. Ante un dado nivel constante de actividad APOBEC3, HIV-1 con Vif WT (A) replicaría recibiendo cierta frecuencia de eventos de edición subletal, letal y de inhibición de la retrotranscripción. Una actividad de Vif incrementada (B) implicaría una reducción en los eventos de edición letal y/o de inhibición de la retrotranscripción. Esta mayor eficiencia de HIV-1 para contrarrestar la capacidad antiviral APOBEC3 podría determinar un aumento de su virulencia. Alternativamente, la replicación viral se vería dificultada por una actividad de Vif disminuida (C). Sin embargo, a pesar de sufrir un cierto grado de inhibición, existe la posibilidad de que el virus pueda verse favorecido en lo global al elevarse la frecuencia de eventos de edición subletal. Esto podría resultar en una fuente adicional de variabilidad que facilitaría la aparición de variantes de escape al sistema inmune o drogas.

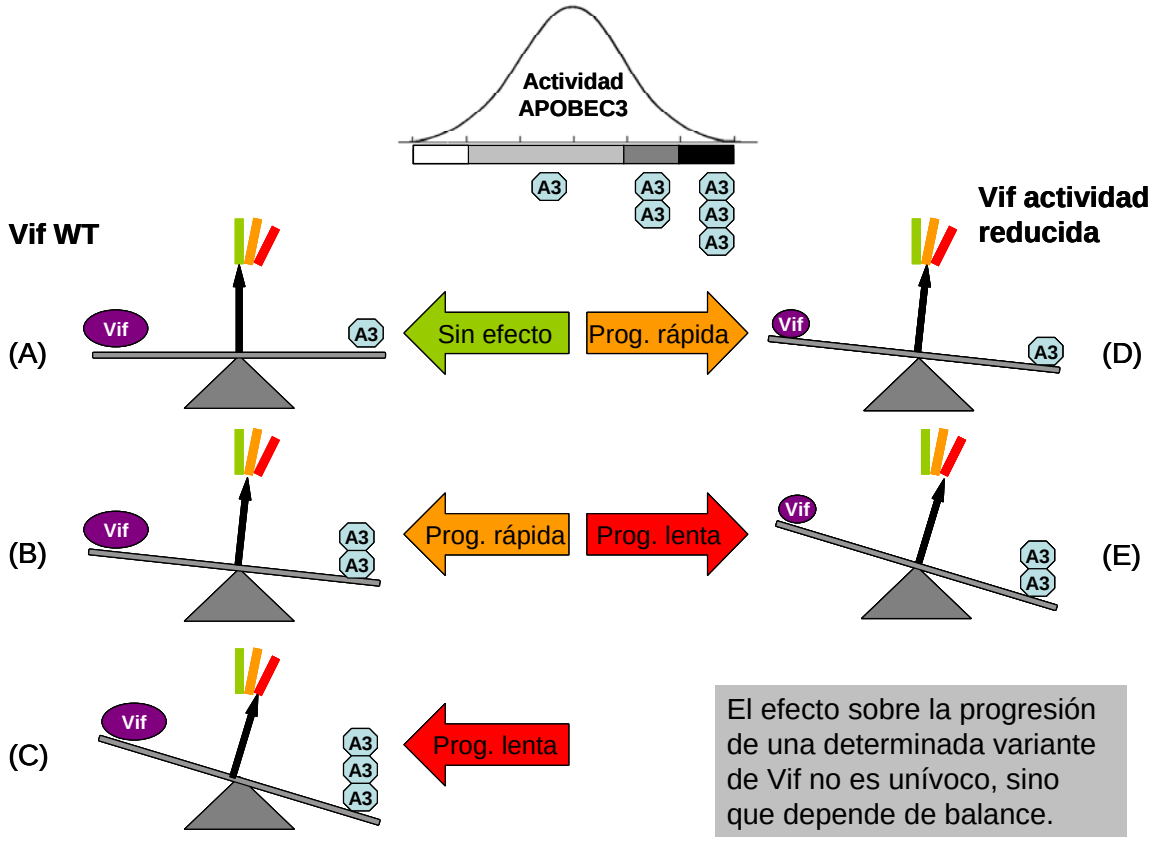

Figura D3. Tasa de progresión como resultado de balance entre actividades APOBEC3 y Vif. Una misma forma de Vif podría determinar una progresión más rápida o más lenta de la enfermedad dependiendo del ambiente provisto por el hospedador en cuanto a la actividad APOBEC3. En la situación habitual, las actividades de Vif y APOBEC3 contrapuestas estarían en un equilibrio que no tendría efecto significativo sobre la progresión (A). Cambios en este balance afectarían el curso de la enfermedad. Por ejemplo, la ocurrencia de una variante de Vif particular podrá asociarse con un desarrollo temprano de SIDA ante cierto nivel de actividad APOBEC3 (B y D), mientras que podrá vincularse con un desarrollo tardío en el caso en que la actividad APOBEC3 supere un cierto umbral (C y E). Tal umbral podrá ser diferente para variantes de Vif con distinta actividad (Vif WT versus Vif actividad reducida).

Además, las características de Vif pueden ser moldeadas por el genotipo del hospedador [Li et al., 2010]. En tal sentido, decidimos explorar sobre esta posibilidad en nuestra cohorte. Encontramos que a pesar de que los polimorfismos de *APOBEC3G* y *CUL5* analizados parecen no tener efecto sobre la progresión de la enfermedad, estos podrían ejercer una influencia sobre la variabilidad de Vif. De hecho, se observó que los alelos minoritarios de *APOBEC3G* C40693T y *CUL5* SNP6 estuvieron asociados con las sustituciones de Vif E45D y R132K, respectivamente. Se hace interesante el que ciertas sustituciones en ambos sitios 45 y 132 hayan sido reportadas con importante efecto sobre la actividad de Vif. El residuo en el sitio 45 es relevante para la interacción de Vif con las proteínas APOBEC3, ya que se ha demostrado que la variante de ocurrencia natural E45G puede contrarrestar con eficacia a APOBEC3F pero no a APOBEC3G [Mulder et al., 2008; Simon et al., 2005]. A su vez, la posición 132 se ubica en el motivo HCCH previamente mencionado, requerido por Vif para su unión a Cul5. La sustitución R132S ha sido asociada con baja carga viral en individuos infectados y también se ha visto que reduce la replicación viral *in vitro* [Hassaine et al., 2000; Rangel et al., 2009].

Debe notarse que la sustitución de Vif E45D asociada con el alelo minoritario de *APOBEC3G* C40693T se ubica precisamente en una región de Vif que esta involucrada en la interacción Vif-APOBEC3G. De forma similar, la sustitución de Vif R132K que se ha asociado con el alelo minoritario de *CUL5* SNP6 se localiza en una región de Vif relevante para la interacción Vif-Cul5 **(Fig. D1)**. Esta doble concordancia sugiere que las asociaciones encontradas no son sólo correlaciones estadísticas espurias, sino que parecen tener sentido biológico. Aunque los cambios E45D y R132K son conservativos (ya que un residuo es reemplazado por otro de características similares), estos podrían modular la actividad de Vif al menos de forma sutil, pudiéndose plantear la hipótesis de

que tales sustituciones son selectivamente favorecidas en respuesta a las variantes genéticas particulares de *APOBEC3G* y *CUL5* del hospedador.

No se observaron variantes de Vif mostrando simultáneamente un posible efecto sobre el tiempo a SIDA y una asociación con los polimorfismos de *APOBEC3G* o *CUL5*. Sin embargo, vale destacar que la alteración A62D/N/S, vinculada a una progresión rápida de la enfermedad, exhibió también un valor no corregido de $p = 0.027$ para su asociación con el alelo minoritario de *APOBEC3G* C40693T. Aunque tal asociación no alcanzó significancia estadística, podría estar reflejando un efecto indirecto del SNP de *APOBEC3G* sobre el curso de la enfermedad al favorecer el surgimiento de variantes de Vif perjudiciales. Estudios de co-variación más amplios, vinculando las características genéticas de los factores involucrados en el sistema Vif-APOBEC3, son necesarios para arrojar luz sobre esta compleja interacción virus-hospedador.

En conjunto, los resultados sugieren que las alteraciones de Vif pueden acelerar la progresión a SIDA pediátrico y que la variabilidad de Vif estaría influenciada por los alelos de *APOBEC3G* y *CUL5* del hospedador.

5.2 Edición mediada por APOBEC3 en HIV-1 de pacientes pediátricos

Luego de no hallar ningún hipermutante entre los genes *vif* provenientes de 93 niños considerados para nuestro estudio de cohorte, recurrimos a secuencias *vpu*-5´*env* o 5´*pol* obtenidas previamente de un conjunto adicional de 138 pacientes pediátricos. En este grupo se verificaron sólo dos casos exhibiendo provirus hipermutados. Ante una detección tan baja, decidimos proseguir con el estudio de edición pero aplicando una estrategia de mayor sensibilidad. La región genómica de HIV-1 escogida para el nuevo

análisis fue una porción del gen *pol* en torno al cPPT, la cuál incluye un máximo de susceptibilidad para la edición mediada por APOBEC3 [Suspène et al., 2006; Wurtzer et al., 2006; Hu et al., 2010]. Además, se emplearon *primers* degenerados en posiciones pasibles de ser editadas, buscando evitar una amplificación selectiva de sólo aquellas variantes no afectadas por la actividad APOBEC3. Las secuencias así generadas no indicaron para ninguno de 93 casos estudiados una población proviral hipermutada. Esto contrasta con aquellos trabajos en los que se informa de hipermutación detectable por secuenciación directa en una fracción considerable (10% o más) de los adultos infectados [Pace et al., 2006; Land et al., 2008; Vázquez-Pérez et al., 2009; Piantadosi et al., 2009]. La diferencia puede ser atribuida a la etnia de las cohortes y/o el subtipo de HIV-1, pero la disparidad de edades podría constituir un factor crítico. De esta manera, los resultados obtenidos indican que la restricción de HIV-1 por medio de hipermutación podría considerarse como insignificante en cuanto a su contribución para el retraso del SIDA en nuestra cohorte pediátrica, ya que los casos exhibiendo signos de una edición severa afectando sustancialmente la población proviral serían de una extrema rareza. En tal sentido, nuestros resultados están de acuerdo con la reciente publicación de Amoêdo et al. [2011], quienes encontraron en niños perinatalmente infectados un bajo porcentaje de clones hipermutados sin una correlación entre su abundancia y el perfil de progresión de la enfermedad.

Por lo antes expuesto, es preciso destacar que al explorar la relevancia de la edición en nuestra cohorte pediátrica nos vimos limitados a estudiar un espectro restringido de niveles que pueden considerarse como subletales [Sadler et al., 2010]. Esto nos llevó a desarrollar un estimador de edición formulado especialmente para encarar un análisis basado en señales débiles de actividad editora. El índice, al que llamamos ODDSMM, se diseñó explotando las características de la región cPPT, que

por contener no sólo un máximo sino también un mínimo para la susceptibilidad a la edición permitiría una cuantificación de alta especificidad. Además, debe tenerse en cuenta que el análisis de edición en niveles bajos presenta una situación muy particular, ya que cuando se hallan virus hipermutados, su incapacidad para replicar nos indicaría que la mutagénesis letal fue alcanzada en el actual hospedador, pero cuando se trata sólo de eventos subletales, los mismos pueden haberse producido tanto en el hospedador presente como en eslabones anteriores de la cadena de transmisión.

Al tratar de correlacionar la edición en HIV-1 con las variantes genéticas del paciente, no se observaron diferencias de nivel entre los alelos de *APOBEC3G*, pero sí se identificó un posible efecto de *CUL5 SNP6*. El alelo minoritario de este locus se asoció con una edición más baja, lo que sería acorde con una actividad incrementada para esta variante del gen, tal como fuera discutido por An et al. [2007]. Un aumento en la disponibilidad de la proteína Cul5 podría contribuir a la depleción mediada por Vif de los factores APOBEC3, lo cual se reflejaría en una reducción de la edición de HIV-1.

Se observó también que diferentes niveles de edición se vincularon con cambios en la variabilidad de Vif. A pesar de que los sitios afectados no han sido reportados como centrales para la función de Vif, es interesante notar que se ubican dentro o muy próximos de regiones relevantes de la proteína **(Fig. D1)**. El sitio 46 es contiguo a un dominio de unión a APOBEC3G (aminoácidos 40 a 45) [Simon et al., 2005; Russell y Pathak, 2007]. El residuo en la posición 122 se halla inmerso en el motivo HCCH, requerido por Vif para el reclutamiento de Cul5 [Mehle et al., 2006; Xiao et al., 2006]. El sitio 160 se encuentra inmediatamente antes del motivo rico en prolina (posiciones 161 a 164), el que ha sido reportado como importante para la interacción de Vif con APOBEC3G, Cul5 y ElonguinaB [Donahue et al., 2008; Stanley et al., 2008; Bergeron et al., 2010], además de estar involucrado en la oligomerización del propio Vif [Yang et

al., 2001]. La posición 182 parece ser una excepción, puesto que se localiza en la cola carboxilo terminal que es usualmente considerada como dispensable para las funciones críticas de Vif [Henzler et al., 2001]. Por lo tanto, podría hipotetizarse que las sustituciones en estos sitios modifican la actividad de Vif al menos de manera leve, pero suficiente como para alterar sistemáticamente el nivel de edición.

Aunque no se halló evidencia apoyando una asociación global entre los niveles subletales de edición observados y el tiempo a SIDA pediátrico, los virus codificando Vif INS61 se asociaron con una progresión rápida de la enfermedad y mostraron al mismo tiempo una tendencia hacia valores incrementados de edición. Esto nos condujo a considerar para esta variante particular de Vif un efecto sobre el desarrollo de SIDA mediado por un mayor impacto de la actividad editora sobre HIV-1. Sin embargo, la baja frecuencia de INS61 dificultó una evaluación más profunda del papel que esta alteración podría desempeñar durante el curso clínico de la infección.

Por tanto, en una consideración general, la variabilidad del sistema Vif-APOBEC3 podría afectar tanto el nivel de edición de la población viral como el curso de la enfermedad en niños, pero aparentemente no en una manera claramente acoplada.

Además, al analizar la influencia de la actividad enzimática APOBEC3 sobre la evolución de HIV-1, se advirtió que las divergencias filogenéticas estimadas para las secuencias provirales se correlacionaron negativamente con la edición. Se hace difícil el realizar una interpretación clara de estos resultados, puesto que nuestro índice ODDSMM (de forma semejante a cualquier otra estimador de edición) está en alguna medida relacionado con la distancia genética. Sin embargo, esta asociación se observó en coincidencia tanto para la región cPPT como para el gen *vif* (no usado para el cálculo de edición), lo cual nos condujo a especular acerca de un sentido biológico para este hallazgo. En tal sentido, puede proponerse que la edición, incluso dentro de un rango

subletal, podría afectar negativamente la dinámica replicativa del virus con un consecuente impacto sobre la tasa evolutiva, como parece reflejarse al nivel de evolución inter-hospedador estudiado.

Nuestros hallazgos exploratorios sugieren que, en el contexto de la infección pediátrica, tanto las características del hospedador como las del virus podrían modular la edición mediada por APOBEC3 de HIV-1.

5.3 Alteraciones en Vif de HIV-1 y progresión lenta de la enfermedad en pacientes pediátricos

Al realizar un estudio de cohorte explorando sobre asociaciones entre variantes particulares de Vif y distintos tiempos de inicio de SIDA, se identificaron mutaciones relacionadas con una progresión acelerada de la enfermedad pero no se halló ninguna alteración vinculada con un desarrollo tardío. A partir de eso, nos propusimos estudiar las características de Vif en un reducido aunque interesante grupo de casos que logramos identificar como progresores lentos dentro de la cohorte general de niños perinatalmente infectados por HIV-1. Se trató de 11 pacientes que sin recibir terapia antirretroviral no tuvieron manifestación clínica de SIDA por más de ocho años, diferenciándose del anterior grupo de 93 niños que en su conjunto pueden ser considerados como progresores típicos.

Se ha propuesto que en algunos individuos infectados por HIV-1 (adultos y niños) un inicio demorado de SIDA podría explicarse al menos parcialmente por la presencia de virus con genes *vif* alterados. Por un lado, ciertas mutaciones de Vif han sido halladas en común entre casos mostrando una progresión lenta de la enfermedad, como el cambio R132S (asociado con bajas cargas virales) [Hassaine et al., 2000;

Rangel et al., 2009], el cambio S130I (en virus de tres no progresores de largo plazo) [Sandonís et al., 2009] y una inserción de dos aminoácidos (detectada en par madre-hijo de no progresores) [Alexander et al., 2002]. Por el otro lado, también se han descripto un conjunto de defectos disímiles en *vif* que podrían dar cuenta de casos particulares de atenuación viral, incluyendo deleción de amplios segmentos del gen [Rangel et al., 2009; Sandonís et al., 2009], truncamiento de proteínas por codones *stop* prematuros [Rangel et al., 2009] y modificación de motivos de Vif capaces de regular su localización subcelular [Farrow et al., 2005]. En nuestra población de pacientes pediátricos infectados por HIV-1, esta variedad de alteraciones no sería una característica distintiva de las secuencias provenientes de niños mostrando progresión lenta a SIDA. En cambio, al comparar entre progresores lentos y típicos las secuencias Vif, se advirtió la presencia diferencial de los cambios V13I, V55T y L81M en los pacientes con un curso lento de la enfermedad. El análisis de secuencias almacenadas en la base de datos de HIV-1 de LANL indicó que estas sustituciones tienen una frecuencia extremadamente baja (0.1 a 1.1%), afectando sitios de Vif altamente conservados a través de los diversos clados de HIV-1. Además, secuencias de Vif provenientes de controladores de elite tomadas de base de datos parecieron estar enriquecidas en estas mutaciones específicas, una observación que puede ser interpretada como una validación externa a nuestros hallazgos. Es también interesante notar que los residuos en los sitios 13, 55 y 81 están dentro de motivos de Vif importantes para la supresión de las proteínas APOBEC3 **(Fig. D1)**.

Las alteraciones V13I, V55T y L81M no representan mutaciones de difícil reversión (como lo serían las inserciones y las deleciones). De esta manera, podría hipotetizarse que factores del hospedador que actúan seleccionando estos cambios pueden favorecer su predominio en el enjambre viral. En tal sentido, las sustituciones

fueron analizadas respecto del genotipo HLA-B de los pacientes, puesto que la presencia de ciertos alelos podría al mismo tiempo dar cuenta de la progresión lenta de la enfermedad en estos casos particulares [Tang et al., 2010; Singh et al., 2011]. Sin embargo, nuestro análisis no halló evidencias apoyando estas variantes de Vif como formas de escape a la respuesta inmune.

Vale la pena mencionar algunos factores que podrían ser invocados como confundentes para dar cuenta de las diferencias observadas entre Vif de progresores lentos y típicos, tal como discrepancias al momento de la recolección de las muestras de sangre respecto de la edad, el estadio de la enfermedad o la terapia antirretroviral previa [Adekale et al., 2005]. Sin embargo, no se hallaron diferencias globales en términos de heterogeneidad o diversidad nucleotídica entre las secuencias *vif* provenientes de ambos grupos. Además, las posibles confundentes enumeradas no explicarían con facilidad la frecuencia notoriamente baja en la base de datos de HIV-1 de LANL para los cambios que fueron observados sólo en el grupo de progresores lentos pediátricos. Por lo tanto, las sustituciones inusuales V13I, V55T y L81M merecen ser consideradas como alteraciones de Vif auténticamente vinculadas con la progresión lenta en pediatría.

Este estudio provee nuevas pistas acerca de la naturaleza de sustituciones inusuales en Vif que pueden estar ligadas con la atenuación de HIV-1 en pacientes perinatalmente infectados. Alteraciones aparentemente menores en distintos dominios de Vif podrían determinar proteínas con actividades subóptimas, afectando la tasa de progresión de la enfermedad.

6 CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo sugieren que en la infección pediátrica por HIV-1 la variabilidad del sistema Vif-APOBEC3 puede afectar el curso clínico de la enfermedad. Se hallaron evidencias de que ciertas mutaciones en Vif serían capaces de propiciar un desarrollo rápido de SIDA, pero se observó también que variantes inusuales de esta proteína podrían contribuir a la progresión en extremo lenta que se observa en unos pocos casos de excepción. Aunque polimorfismos en *APOBEC3G* y *CUL5* no mostraron un efecto sobre la transmisión perinatal de HIV-1 como tampoco sobre el curso de la enfermedad, sí se aprecio que determinados alelos podrían influir en las características de Vif.

Al buscar casos en los que el fenómeno de hipermutación o edición severa estuviera afectando al grueso de la población proviral, verificamos que esto ocurriría sólo en un número de pacientes sumamente escaso. Esta baja incidencia revelaría que la restricción de HIV-1 por hipermutación APOBEC3 no es un mecanismo de relevancia para el control de la infección viral en nuestra cohorte pediátrica. Sin embargo, al avocarnos al estudio de lo que correspondería a un espectro de edición en niveles subletales, apreciamos que estos podrían cambiar en función de las características tanto del hospedador como del virus. Evaluados globalmente, los débiles niveles de edición observados no se asociaron con diferencias en el tiempo de desarrollo de SIDA, aunque habría indicios de mutaciones en Vif relacionadas simultáneamente con progresión rápida y edición incrementada.

Consideramos que estos resultados serán relevantes para el diseño de futuros estudios que tengan por objetivo determinar el papel del sistema Vif-APOBEC3 durante el curso de la infección.

7 REFERENCIAS

Adekale, M.A., Cane, P.A., McCrae, M.A., **2005**. Changes in the Vif protein of HIV-1 associated with the development of resistance to inhibitors of viral protease. J Med Virol 75, 195-201.

Albin, J.S., Harris, R.S., **2010**. Interactions of host APOBEC3 restriction factors with HIV-1 in vivo: implications for therapeutics. Expert. Rev. Mol. Med. 12, e4.

Alexander, L., Aquino-DeJesus, M.J., Chan, M., Andiman, W.A., **2002**. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication by a two-amino-acid insertion in HIV-1 Vif from a nonprogressing mother and child. J. Virol. 76, 10533-10539.

Amoêdo, N.D., Afonso, A.O., Cunha, S.M., Oliveira, R.H., Machado, E.S., Soares M.A., **2011**. Expression of APOBEC3G/3F and G-to-A Hypermutation Levels in HIV-1-Infected Children with Different Profiles of Disease Progression. PLoS ONE 6, e24118.

An, P., Bleiber, G., Duggal, P., Nelson, G., May, M., Mangeat, B., Alobwede, I., Trono, D., Vlahov, D., Donfield, S., Goedert, J.J., Phair, J., Buchbinder, S., O'Brien, S.J., Telenti, A., Winkler, C.A., **2004**. APOBEC3G genetic variants and their influence on the progression to AIDS. J. Virol. 78, 11070-11076.

An, P., Duggal, P., Wang, L.H., O'Brien, S.J., Donfield, S., Goedert, J.J., Phair, J., Buchbinder, S., Kirk, G.D., Winkler, C.A., **2007**. Polymorphisms of CUL5 are associated with CD4+ T cell loss in HIV-1 infected individuals. PLoS Genet. 3, e19.

Armitage, A.E., Katzourakis, A., de Oliveira, T., Welch, J.J., Belshaw, R., Bishop, K.N., Kramer, B., McMichael, A.J., Rambaut, A., Iversen, A.K. **2008**. Conserved Footprints of APOBEC3G on Hypermutated Human Immunodeficiency Virus Type 1 and Human Endogenous Retrovirus HERV-K (HML2) Sequences. J. Virol. 82, 8743–8761.

Aulicino, P.C., Bello, G., Guimaraes, M.L., Ruchansky, D., Rocco, C., Mangano, A., Morgado, M.G., Sen, L., **2011**. Longitudinal analysis of HIV-1 BF1 recombinant strains in vertically infected children from Argentina reveals a decrease in CRF12_BF pol gene mosaic patterns and high diversity of BF unique recombinant forms. Infect. Genet. Evol. 11, 349-357.

Aulicino, P.C., Holmes, E.C., Rocco, C., Mangano, A., Sen, L., **2007**. Extremely rapid spread of human immunodeficiency virus type 1 BF recombinants in Argentina. J. Virol. 81, 427-429.

Bergeron, J.R., Huthoff, H., Veselkov, D.A., Beavil, R.L., Simpson, P.J., Matthews, S.J., Malim, M.H., Sanderson, M.R., **2010**. The SOCS-box of HIV-1 Vif interacts with ElonginBC by induced-folding to recruit its Cul5-containing ubiquitin ligase complex. PLoS Pathog. 6, e1000925.

Berk, D.R., Falkovitz-Halpern, M.S., Hill, D.W., Albin, C., Arrieta, A., Bork, J.M., Cohan, D., Nilson, B., Petru, A., Ruiz, J., Weintrub, P.S., Wenman, W., Maldonado, Y.A., California Pediatric HIV Study Group, **2005**. Temporal trends in early clinical

manifestations of perinatal HIV infection in a population-based cohort. JAMA 293, 2221-2231.

Bologna, R., **2007**. Infección HIV en pediatría. En: Benetucci, J.A., editor. SIDA y enfermedades asociadas (3ra edición). Buenos Aires, Argentina, Fundai, Pág. 633-670.

Bugarín, G., Cassetti, I., Stamboulián, D., **2007**. Mecanismos de transmisión. En: Benetucci, J.A., editor. SIDA y enfermedades asociadas (3ra edición). Buenos Aires, Argentina, Fundai, Pág. 141-154.

Caldwell, M.B., Oxtoby, M.J., Simonds, R.J., Lindegren, M.L., Rogers, M.F., **1994**. 1994 Revised Classification System for Human Immunodeficiency Virus Infection in Children Less Than 13 Years of Age. MMWR 43, 1–10.

Connor, E.M., Sperling, R.S., Gelber, R., Kiselev, P., Scott, G., O'Sullivan, M.J., VanDyke, R., Bey, M., Shearer, W., Jacobson, R.L., et al., **1994**. Reduction of maternal-infant transmission of human immunodeficiency virus type 1 with zidovudine treatment. Pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 076 Study Group. N. Engl. J. Med. 331, 1173-1180.

Dang, Y., Davis, R.W., York, I.A., Zheng, Y.H., **2010a**. Identification of 81LGxGxxIxW89 and 171EDRW174 domains from human immunodeficiency virus type 1 Vif that regulate APOBEC3G and APOBEC3F neutralizing activity. J Virol 84, 5741-5750.

Dang, Y., Wang, X., York, I.A., Zheng, Y.H., **2010b**. Identification of a critical T(Q/D/E)x5ADx2(I/L) motif from primate lentivirus Vif proteins that regulate APOBEC3G and APOBEC3F neutralizing activity. J Virol 84, 8561-8570.

DeHart, J.L., Bosque, A., Harris, R.S., Planelles, V., **2008**. Human immunodeficiency virus type 1 Vif induces cell cycle delay via recruitment of the same E3 ubiquitin ligase complex that targets APOBEC3 proteins for degradation. J. Virol. 82, 9265-9272.

Do, H., Vasilescu, A., Diop, G., Hirtzig, T., Heath, S.C., Coulonges, C., Rappaport, J., Therwath, A., Lathrop, M., Matsuda, F., Zagury, J.F., **2005**. Exhaustive genotyping of the CEM15 (APOBEC3G) gene and absence of association with AIDS progression in a French cohort. J. Infect. Dis. 191, 159-163.

Donahue, J.P., Vetter, M.L., Mukhtar, N.A., D'Aquila, R.T., **2008**. The HIV-1 Vif PPLP motif is necessary for human APOBEC3G binding and degradation. Virology 377, 49-53.

Fanales-Belasio, E., Raimondo, M., Suligoi, B., Buttò, S., **2010**. HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. Ann. Ist. Super. Sanita. 46, 5-14.

Farrow, M.A., Somasundaran, M., Zhang, C., Gabuzda, D., Sullivan, J.L., Greenough, T.C., **2005**. Nuclear localization of HIV type 1 Vif isolated from a long-term asymptomatic individual and potential role in virus attenuation. AIDS Res. Hum. Retroviruses 21, 565-574.

Fourati, S., Malet, I., Binka, M., Boukobza, S., Wirden, M., Sayon, S., Simon, A., Katlama, C., Simon, V., Calvez, V., Marcelin, A.G., **2010**. Partially active HIV-1 Vif alleles facilitate viral escape from specific antiretrovirals. AIDS 24, 2313-2321.

Freed, E.O., Martin, M.A., **2007**. HIVs and their replication. En: Knipe, D.M., Howley, P.M., editores. Field`s Virology (5ta edición). Filadelfia, EEUU, Lippincott Williams & Wilkins, Pág. 2107-2185.

Gandhi, S.K., Siliciano, J.D., Bailey, J.R., Siliciano, R.F., 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.

Goff, S.P., **2007**. *Retroviridae*: The Retroviruses and Their Replication. En: Knipe, D.M. y Howley, P.M., editores. Field`s Virology (5ta edición). Filadelfia, EEUU, Lippincott Williams & Wilkins, Pág. 1999-2069.

Gourraud, P.A., Karaouni, A., Woo, J.M., Schmidt, T., Oksenberg, J.R., Hecht, F.M., Liegler, T.J., Barbour, J.D., **2011**. APOBEC3H haplotypes and HIV-1 pro-viral vif DNA sequence diversity in early untreated human immunodeficiency virus-1 infection. Hum Immunol 72, 207-212.

Hassaine, G., Agostini, I., Candotti, D., Bessou, G., Caballero, M., Agut, H., Autran, B., Barthalay, Y., Vigne, R., **2000**. Characterization of human immunodeficiency virus type 1 vif gene in long-term asymptomatic individuals. Virology 276, 169-180.

He, Z., Zhang, W., Chen, G., Xu, R., Yu, X.F., **2008**. Characterization of conserved motifs in HIV-1 Vif required for APOBEC3G and APOBEC3F interaction. J. Mol. Biol. 381, 1000-1011.

Henriet, S., Mercenne, G., Bernacchi, S., Paillart, J.C., Marquet, R., **2009**. Tumultuous relationship between the human immunodeficiency virus type 1 viral infectivity factor (Vif) and the human APOBEC-3G and APOBEC-3F restriction factors. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 73, 211-232.

Henzler, T., Harmache, A., Herrmann, H., Spring, H., Suzan, M., Audoly, G., Panek, T., Bosch, V., **2001**. Fully functional, naturally occurring and C-terminally truncated variant human immunodeficiency virus (HIV) Vif does not bind to HIV Gag but influences intermediate filament structure. J. Gen. Virol. 82, 561-573.

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

Honeyborne, I., Prendergast, A., Pereyra, F., Leslie, A., Crawford, H., Payne, R., Reddy, S., Bishop, K., Moodley, E., Nair, K., van der Stok, M., McCarthy, N., Rousseau, C.M., Addo, M., Mullins, J.I., Brander, C., Kiepiela, P., Walker, B.D., Goulder, P.J., **2007**. Control of human immunodeficiency virus type 1 is associated with HLA-B*13 and targeting of multiple gag-specific CD8+ T-cell epitopes. J. Virol. 81, 3667-3672.

Hu, C., Saenz, D.T., Fadel, H.J., Walker, W., Peretz, M., Poeschla, E.M., **2010**. The HIV-1 Central Polypurine Tract Function as a Second Line of Defense against APOBEC3G/F. J Virol 84, 11981-11993.

Janini, M., Rogers, M., Birx, D.R., McCutchan, F.E., **2001**. Human immunodeficiency virus type 1 DNA sequences genetically damaged by hypermutation are often abundant in patient peripheral blood mononuclear cells and may be generated during near-simultaneous infection and activation of CD4(+) T cells. J. Virol. 75, 7973-7986.

Kataropoulou, A., Bovolenta, C., Belfiore, A., Trabatti, S., Garbelli, A., Porcellini, S., Lupo, R., Maga, G., **2009**. Mutational analysis of the HIV-1 auxiliary protein Vif identifies independent domains important for the physical and functional interaction with HIV-1 reverse transcriptase. Nucleic Acids Res. 37, 3660-3669.

Kieffer, T.L., Kwon, P., Nettles, R.E., Han, Y., Ray, S.C., Siliciano, R.F., **2005**. G-->A hypermutation in protease and reverse transcriptase regions of human immunodeficiency virus type 1 residing in resting CD4+ T cells in vivo. J. Virol. 79, 1975-1980.

Kim, E.Y., Bhattacharya, T., Kunstman, K., Swantek, P., Koning, F.A., Malim, M.H., Wolinsky, S.M., **2010**. Human APOBEC3G-mediated editing can promote HIV-1 sequence diversification and accelerate adaptation to selective pressure. J. Virol. 84, 10402-10405.

Koulinska, I.N., Chaplin, B., Mwakagile, D., Essex, M., Renjifo, B., **2003**. Hypermutation of HIV type 1 genomes isolated from infants soon after vertical infection. AIDS Res. Hum. Retroviruses 19, 1115-1123.

Kuritzkes, D.R., Walker, B.D., **2007**. HIV-1: Pathogenesis, Clinical Manifestations, and Treatment. En: Knipe DM y Howley PM, editores. Field`s Virology (5ta edición). Filadelfia, EEUU, Lippincott Williams & Wilkins, Pág. 2187-2214.

Land, A.M., Ball, T.B., Luo, M., Pilon, R., Sandstrom, P., Embree, J.E., Wachihi, C., Kimani, J., Plummer, F.A, **2008**. Human Immunodeficiency Virus (HIV) Type 1 proviral hypermutation correlates with CD4 count in HIV-infected women from Kenya. J. Virol. 82, 8172-8182.

Li, M.M., Wu, L.I., Emerman, M., **2010**. The range of human APOBEC3H sensitivity to lentiviral Vif proteins. J. Virol. 84, 88-95.

Mehle, A., Thomas, E.R., Rajendran, K.S., Gabuzda, D., **2006**. A zinc-binding region in Vif binds Cul5 and determines cullin selection. J. Biol. Chem. 281, 17259-17265.

Mercenne, G., Bernacchi, S., Richer, D., Bec, G., Henriet, S., Paillart, J.C., Marquet, R., **2010**. HIV-1 Vif binds to APOBEC3G mRNA and inhibits its translation. Nucleic Acids Res. 38, 633-646.

Miura, T., Brockman, M.A., Brumme, C.J., Brumme, Z.L., Carlson, J.M., Pereyra, F., Trocha, A., Addo, M.M., Block, B.L., Rothchild, A.C., Baker, B.M., Flynn, T.,

Schneidewind, A., Li, B., Wang, Y.E., Heckerman, D., Allen, T.M., Walker, B.D., **2008**. 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.

Mulder, L.C., Harari, A., Simon, V., **2008**. Cytidine deamination induced HIV-1 drug resistance. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105, 5501-5506.

Okumura, A., Alce, T., Lubyova, B., Ezelle, H., Strebel, K., Pitha, P.M., **2008**. HIV-1 accessory proteins VPR and Vif modulate antiviral response by targeting IRF-3 for degradation. Virology 373, 85-97.

Pace, C., Keller, J., Nolan, D., James, I., Gaudieri, S., Moore, C., Mallal, S., **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.

Piantadosi, A., Humes, D., Chohan, B., McClelland, R.S., 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.

Pillai, S.K., Wong, J.K., Barbour, J.D., **2008**. Turning up the volume on mutational pressure: is more of a good thing always better? (A case study of HIV-1 Vif and APOBEC3). Retrovirology 5, 26.

Poropatich, K., Sullivan, D.J. Jr., **2011**. Human immunodeficiency virus type 1 long-term non-progressors: the viral, genetic and immunological basis for disease non-progression. J. Gen. Virol. 92, 247-268.

Rangel, H.R., Garzaro, D., Rodríguez, A.K., Ramírez, A.H., Ameli, G., Del Rosario Gutiérrez, C., Pujol, F.H., **2009**. Deletion, insertion and stop codon mutations in vif genes of HIV-1 infecting slow progressor patients. J. Infect. Dev. Ctries. 3, 531-538.

Reddy, K., Winkler, C.A., Werner, L., Mlisana, K., Abdool Karim, S.S., Ndung'u, T., CAPRISA Acute Infection Study Team, **2010**. APOBEC3G expression is dysregulated in primary HIV-1 infection and polymorphic variants influence CD4+ T-cell counts and plasma viral load. AIDS 24, 195-204.

Russell, R.A., Moore, M.D., Hu, W.S., Pathak, V.K., **2009**. APOBEC3G induces a hypermutation gradient: purifying selection at multiple steps during HIV-1 replication results in levels of G-to-A mutations that are high in DNA, intermediate in cellular viral RNA, and low in virion RNA. Retrovirology 6, 16.

Russell, R.A., Pathak, V.K., **2007**. Identification of two distinct human immunodeficiency virus type 1 Vif determinants critical for interactions with human APOBEC3G and APOBEC3F. J. Virol. 81, 8201-8210.

Sadler, H.A., Stenglein, M.D., Harris, R.S., Mansky, L.M., **2010**. APOBEC3G contributes to HIV-1 variation through sublethal mutagenesis. J. Virol. 84, 7396-7404.

Sakai, K., Dimas, J., Lenardo, M.J., **2006**. The Vif and Vpr accessory proteins independently cause HIV-1-induced T cell cytopathicity and cell cycle arrest. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 103, 3369-3374.

Sandonís, V., Casado, C., Alvaro, T., Pernas, M., Olivares, I., García, S., Rodríguez, C., del Romero, J., López-Galíndez, C., **2009**. A combination of defective DNA and protective host factors are found in a set of HIV-1 ancestral LTNPs. Virology 391, 73-82.

Sheehy, A.M., Gaddis, N.C., Choi, J.D., 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.

Simon, V., Zennou, V., Murray, D., Huang, Y., Ho, D.D., Bieniasz, P.D., **2005**. Natural variation in Vif: differential impact on APOBEC3G/3F and a potential role in HIV-1 diversification. PLoS Pathog. 1, e6.

Singh, K.K., Gray, P.K., Wang, Y., Fenton, T., Trout, R.N., Spector, S.A., **2011**. HLA alleles are associated with altered risk for disease progression and central nervous system impairment of HIV-infected children. J. Acquir. Immune Defic. Syndr. 57, 32-39.

Stanley, B.J., Ehrlich, E.S., Short, L., Yu, Y., Xiao, Z., Yu, X.F., Xiong, Y., **2008**. Structural insight into the human immunodeficiency virus Vif SOCS box and its role in human E3 ubiquitin ligase assembly. J. Virol. 82, 8656-8663.

Suspène, R., Henry, M., Guillot, S., Wain-Hobson, S., Vartanian, J.P., **2005**. Recovery of APOBEC3-edited human immunodeficiency virus G->A hypermutants by differential DNA denaturation PCR. J. Gen. Virol. 86, 125-129.

Suspène, R., Rusniok, C., Vartanian, J.P., Wain-Hobson, S., **2006**. Twin gradients in APOBEC3 edited HIV-1 DNA reflect the dynamics of lentiviral replication. Nucleic Acids Res. 34, 4677-4684.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., **2011**. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol. Biol. Evol. 28, 2731-2739.

Tang, Y., Huang, S., Dunkley-Thompson, J., Steel-Duncan, J.C., Ryland, E.G., St. John, M.A., Hazra, R., Christie, C.D., Feeney, M.E., **2010**. Correlates of spontaneous viral control among long-term survivors of perinatal HIV-1 infection expressing human leukocyte antigen-B57. AIDS 24, 1425-1435.

Ulenga, N.K., Sarr, A.D., Hamel, D., Sankale J.L., Mboup, S., Kanki, P.J., **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. Retrovir. 24, 1285–1290.

Valcke, H.S., Bernard, N.F., Bruneau, J., Alary, M., Tsoukas, C.M., Roger, M., **2006**. APOBEC3G genetic variants and their association with risk of HIV infection in highly exposed Caucasians. AIDS 20, 1984-1986.

Vázquez-Pérez, J.A., Ormsby, C.E., Hernández-Juan, R., Torres, K.J., Reyes-Terán, G., **2009**. APOBEC3G mRNA expression in exposed seronegative and early stage HIV infected individuals decreases with removal of exposure and with disease progression. Retrovirology 6, 23.

Wood, N., Bhattacharya, T., Keele, B.F., Giorgi, E., Liu, M., Gaschen, B., Daniels, M., Ferrari, G., Haynes, B.F., McMichael, A., Shaw, G.M., Hahn, B.H., Korber, B., Seoighe, C., **2009**. HIV evolution in early infection: selection pressures, patterns of insertion and deletion, and the impact of APOBEC. PLoS Pathog. 5, e1000414.

Wurtzer, S., Goubard, A., Mammano, F., Saragosti, S., Lecossier, D., Hance, A.J., Clavel, F., **2006**. Functional Central Polypurine Tract Provides Downstream Protection of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Genome from Editing by APOBEC3G and APOBEC3B. J. Virol. 80, 3679-3683.

Xiao, Z., Ehrlich, E., Yu, Y., Luo, K., Wang, T., Tian, C., Yu, X.F., **2006**. Assembly of HIV-1 Vif-Cul5 E3 ubiquitin ligase through a novel zinc-binding domain-stabilized hydrophobic interface in Vif. Virology 349, 290-299.

Yang, S., Sun, Y., Zhang, H., **2001**. The multimerization of human immunodeficiency virus type I Vif protein: a requirement for Vif function in the viral life cycle. J. Biol. Chem. 276, 4889-4893.