

# Factores celulares que restringen la replicación del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH): nuevas esperanzas en la terapia antirretroviral

Yazmín Moreno-Valencia,\* Loana Xonái Álvarez-García,\* Joel Armando Vázquez-Pérez\*

\*Laboratorio de Investigación en Virología y Micología, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER).

**Cellular restriction factors that inhibit human immunodeficiency virus replication: new strategies in antiretroviral therapy**

## ABSTRACT

*Human immunodeficiency virus requires receptors and cellular factors in target cells in order to complete a successful replication. Conversely, host cells express different proteins like TRIM5a, Tetherin BST-2, as well as cytidine deaminase proteins (APOBEC3) to suppress viral replication. These proteins, known as cellular restriction factors, provide an initial defense against infection as components of the innate immune response. The best characterized restriction factor is the cytidine deaminase APOBEC3G that has been shown to have an important role in HIV pathogenesis. Here, we review the current knowledge of host restriction factors, focusing on APOBEC3G, and possible therapeutic strategies against HIV infection.*

**Key words.** Restriction factor. Innate immune response. Human immunodeficiency virus. APOBEC3G.

## INTRODUCCIÓN

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es un retrovirus de la familia lentivirus, el cual ha causado una de las epidemias más grandes de todos los tiempos. Desde su descubrimiento en 1983 como agente etiológico del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) hasta la fecha, ha causado la muerte de aproximadamente 28 millones personas y ocasionado que otros 35 millones vivan con la infección en todo el mundo.<sup>1</sup>

La biología del VIH, los mecanismos de patogenicidad, así como la respuesta inmunológica del humano

## RESUMEN

Para una replicación viral exitosa el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) se necesita en su célula blanco receptores y factores celulares del hospedero. En contraparte, el hospedero expresa diversas proteínas para contrarrestar la infección viral, tal es el caso de TRIM5a, Teterina o BST-2 y la familia de deaminasas de citidina APOBEC3. Estas proteínas, denominadas factores de restricción, forman parte de la respuesta inmune innata para el establecimiento de una línea de defensa temprana contra la infección. El factor celular mejor caracterizado es la proteína APOBEC3G, la cual ha demostrado tener un papel importante en la patogénesis del VIH. Es por eso que la caracterización y elucidación de cada uno de estos factores ofrecen un novedoso panorama para la investigación de nuevos elementos para una terapia antirretroviral.

**Palabras clave.** Factor celular. Respuesta inmune innata. APOBEC3G. Virus de inmunodeficiencia humana.

contra el virus ha sido estudiada a fondo. De hecho, los estudios dirigidos a conocer estos aspectos del VIH han permitido el avance en el conocimiento de otras enfermedades de etiología viral y de otras disciplinas totalmente distintas a la virología.

Desde los primeros años de la epidemia se conoce la información genética del VIH, la regulación de su expresión, las proteínas que lo constituyen y los conocimientos básicos de su ciclo de replicación.<sup>2-4</sup> Estos conocimientos permitieron el desarrollo de las primeras estrategias de tratamiento contra el virus, atacando blancos específicos como son las enzimas virales involucradas en su replicación. El primer

medicamento aprobado como terapia contra el VIH fue la azidovudina (AZT), que impide la acción de la enzima viral transcriptasa reversa.<sup>5</sup> La AZT se empleó a partir de 1986, pero debido a que se utilizó como terapia única o monoterapia, rápidamente provocó la aparición de virus resistentes al medicamento.<sup>6</sup> Posteriormente se crearon diferentes medicamentos dirigidos contra otras enzimas del VIH, como la proteasa, la integrasa y, más recientemente, medicamentos que inhiben la fusión y la entrada del virus. Actualmente, la terapia antirretroviral contra el VIH se compone de una mezcla de éstos, denominándose terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA).

Desde 1996 han sido aprobados por la máxima institución de Estados Unidos en regulación de medicamentos (FDA) más de 20 medicamentos para el tratamiento contra el VIH.<sup>7</sup> Con esta terapia un gran número de pacientes que son diagnosticados a tiempo han logrado la disminución de la replicación del VIH y, por lo tanto, la reducción de los efectos que causa el virus en el sistema inmunológico. Esto ha dado lugar a una mejora en la calidad de vida de los pacientes que viven con VIH/SIDA.<sup>8</sup>

El uso de estos antirretrovirales aún no tiene una cobertura a nivel mundial, aunado a esto, el uso de TARGA presenta dos principales desventajas: la presencia de variantes virales con mutaciones de resistencia para cada uno de los medicamentos y una incidencia cada vez más notoria de enfermedades crónico-degenerativas en pacientes que han tomado la terapia por periodos prolongados.<sup>9,10</sup>

A pesar del adelanto en todas estas áreas del conocimiento con respecto al VIH, aún no se cuenta con una cura contra el virus. Los primeros intentos para desarrollar una vacuna se enfocaron en el desarrollo de la respuesta de tipo humoral, es decir, en la estimulación de anticuerpos que neutralizaran al virus y de esta forma impedir la entrada a la célula y, por lo tanto, la infección. Sin embargo, las características intrínsecas del virus, como una alta tasa de replicación, de mutación y de recombinación, impidieron el éxito de este tipo de vacunas. Posteriormente las investigaciones se dirigieron al desarrollo de una vacuna que estimulara una respuesta celular, principalmente de linfocitos T CD8+, pues se sabe que es una de las respuestas más efectivas contra el virus.<sup>11</sup> El resultado más prometedor fue el reportado en 2009, donde se empleó una vacuna basada en un vector de expresión conocido como Canarypox (ALVAC) al cual se agregó la información genética necesaria para expresar los genes del VIH: gag, pol, env y *nef*. Con este vector se realizó la in-

munización a los meses 1, 3 y 6, y se empleó un refuerzo a los tres y seis meses con la proteína recombinante gp120 de los subtipos B/E. La fase III de la investigación se llevó a cabo en Tailandia, resultando en un poco prometedor 31.2% de eficiencia y en una rápida respuesta inmunológica, pero con poca duración.<sup>12</sup>

Los resultados poco promisorios obtenidos en los últimos 10 años de investigación en vacunas han permitido el desarrollo de otras líneas alternativas para alcanzar la erradicación del virus. Una de las líneas más importantes es el estudio de proteínas celulares que tengan un papel importante en eliminar o disminuir la replicación de los retrovirus, incluyendo al VIH. Esta reciente línea de investigación ha sido denominada como factores celulares que restringen la replicación del VIH. En esta revisión se analizan los principales estudios a partir del descubrimiento del primer factor celular APOBEC3G en 2003, hasta la fecha.

## FACTORES CELULARES DE RESTRICCIÓN Y MECANISMOS DE EVASIÓN

Las células de mamíferos expresan ampliamente diversas proteínas que funcionan de manera autónoma para suprimir la replicación de diferentes virus, entre ellos el VIH. Estas proteínas reciben el nombre de factores celulares de restricción o factores intrínsecos de resistencia. Constituyen una línea primaria de defensa contra infecciones, como un componente de las respuestas antivirales innatas. Algunos de estos factores son el complejo de edición similar al polipéptido catalítico de la enzima editora del RNAm de la apolipoproteína B-3 (APOBEC3), teterina o antígeno celular 2 del estroma de la médula ósea (BST2 o CD317) y el motivo tripartita contenedor de 5 $\alpha$  (TRIM5 $\alpha$ ).<sup>13</sup>

### Proteínas APOBEC3

La interacción entre las proteínas APOBEC3 (apolipoprotein B messenger RNA (mRNA)-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3) y el VIH fue descubierta al observar la síntesis de viriones defectuosos a partir de la infección con un VIH deficiente del factor de infectividad viral o Vif ( $\Delta$ Vif VIH). Experimentos mediante la infección de células “permissivas” (susceptibles a la infección con  $\Delta$ Vif VIH) y células “no permisivas” (no susceptibles a dicha infección) sugirieron la existencia de un factor celular que inhibía la replicación de  $\Delta$ Vif VIH. Sheehy, *et al.*, en 2002<sup>14</sup> emplearon transcriptómica comparativa,

en la cual, al expresar las bibliotecas de cDNA de células no permisivas en las células permisivas, permitió la selección y aislamiento del gen que confería resistencia a la infección por  $\Delta$ Vif VIH.<sup>13-15</sup>

La familia de citidina deaminasas APOBEC3 es única en mamíferos y está involucrada en la edición de DNA y su mutación,<sup>16</sup> se expresan ampliamente en tejidos y células humanas, principalmente en células hematopoyéticas. Los genes que codifican estas proteínas en humanos se localizan en tándem en el cromosoma 22, siendo un total de siete genes: APOBEC3A, APOBEC3B, APOBEC3C, APOBEC3DE, APOBEC3F, APOBEC3G, y APOBEC3H.<sup>15</sup> Son conocidas por su papel importante en la respuesta inmune innata del hospedero en el control de los retrovirus, retrotransposones, hepadnavirus y posiblemente a algunos virus de DNA, tales como los virus de papiloma humano.<sup>17</sup> De estos miembros, APOBEC3G y APOBEC3F son los inhibidores más potentes de la replicación de VIH.<sup>18</sup> APOBEC3G realiza la edición post-sintética de los residuos de citidina a uridina y con ello altera la secuencia de nucleótidos al introducir una base no natural.

Por otro lado, en el cromosoma 12 existen otras dos proteínas de esta familia: APOBEC1 y AID, las cuales fueron las primeras en ser caracterizadas, mientras que en el cromosoma 6 se encuentra APOBEC2. La primera está relacionada con el metabolismo de lípidos,<sup>19</sup> la segunda con la diversidad del receptor del linfocito B<sup>20</sup> y la última se expresa en músculo cardíaco y esquelético, pero aún no se conoce su función.<sup>21</sup>

La actividad antirretroviral de las enzimas APOBEC3 recae principalmente en su mecanismo de edición del DNA, pero también muestran una actividad independiente de esta edición muy probablemente interfiriendo en la actividad de la transcriptasa reversa viral.<sup>22</sup> Las enzimas APOBEC3 se localizan en el citoplasma celular o núcleo, permitiendo la protección de ambos compartimentos; en el caso del núcleo, del virus del papiloma humano, del herpes simple y de retrotransposones sin LTR y en el del citoplasma, del virus de hepatitis B, retrovirus y retrotransposones con LTR. APOBEC3D, APOBEC3F y APOBEC3G son citoplásmicos, APOBEC3B se localiza en el núcleo, mientras que APOBEC3A, APOBEC3C y APOBEC3H se encuentran en ambos, núcleo y citoplasma.<sup>23</sup>

### Estructura

Todas las proteínas de la familia APOBEC3 contienen una o dos copias de un dominio de desamina-



Figura 1. Estructura cristalina de APOBEC3G. Se observan las  $\alpha$  hélices en tono oscuro, rodeando las cinco hebras  $\beta$ . El ión de zinc es representado por un círculo pequeño en el centro. Imagen tomada de Holden, et al.<sup>23</sup>

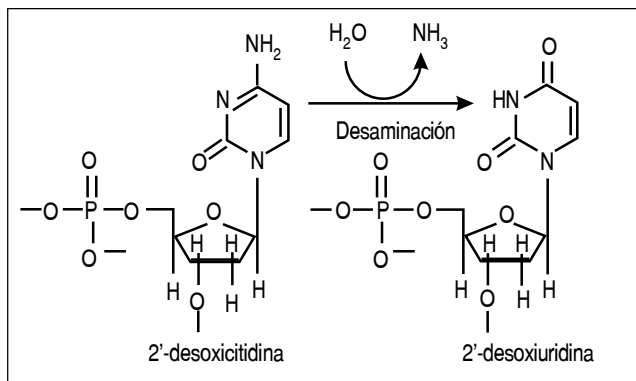


Figura 2. Mecanismo de desaminación de APOBEC3G. La desaminación hidrolítica ocurre en la posición 4 del anillo pirimidina de la citidina. El agua es necesaria tanto como donadora de protones para el funcionamiento de la enzima como para la donación del grupo hidroxilo que es adicionado por ataque nucleofílico para la síntesis del grupo carboxilo y la oxidación resultante en uridina.

sa característico: H-X-E(X)<sub>27-28</sub>-P-C-X<sub>2-4</sub>-C, el cual es coordinado por zinc (dominio Z) y comprende una plataforma de cinco hebras  $\beta$  que envuelven a  $\alpha$  hélices y bucles conectores, el ión de Zn<sup>2+</sup> es coordinado por tres residuos de histidina o cisteína, mientras que un residuo catalítico de ácido glutámico participa en el intercambio de protones<sup>24</sup> (Figura 1). Estos componentes se organizan en un dominio corto alfa hélice seguido de un dominio catalítico (DC), un

péptido corto enlazador (ligador) y un dominio pseudo-catalítico (DPC). En APOBEC3B, APOBEC3F y APOBEC3G, la unidad completa se duplica para conformar un dominio con estructura hélice 1-DC1-ligador1-DPC1-hélice 2-DC2-ligador2-DPC2. Se sabe que en APOBEC3G el dominio carboxilo terminal participa en la desaminación, en contraste con el dominio amino terminal, que no posee actividad catalítica, pero lleva a cabo su incorporación a las partículas de VIH y es reconocido por Vif.<sup>13,15</sup>

APOBEC3G posee la habilidad de reunirse en grandes complejos multiproteicos de alto peso molecular (HMM, por sus siglas en inglés) que en su mayoría se han encontrado en células activadas y en complejos de bajo peso molecular (LMM) presentes principalmente en células en reposo, sugiriendo que las formas de bajo peso molecular son catalíticamente activas y más capaces de restringir la replicación viral.<sup>25</sup>

### Mecanismo de acción

En ausencia de Vif, APOBEC3G es incorporado a los nuevos viriones mediante la unión al RNA e interacciones del dominio amino terminal Z con la nucleocápside. Una vez que el virus infecta una nueva célula e inicia su replicación, APOBEC3G se asocia con el complejo de retrotranscripción y desamina residuos específicos de citidina en la cadena molde de DNA.<sup>26</sup> La citidina blanco para desaminación hidro-

lítica (Figura 2) es 5'-CCCA, donde la base subrayada es desaminada.<sup>27</sup> Estas ediciones resultan en cambios de guanosina a adenosina (G→A) en el genoma del VIH que derivan en mutaciones. En el caso del codón triptófano, el resultado son codones de paro fatales para el virus. Asimismo, se ha observado una disminución en los niveles de cDNA que son acumulados durante la infección; una posible explicación para este último evento es que las proteínas celulares degradan el material viral hipermutado mediante una N-glicosilación de los uracilos (Figura 3).

Se ha demostrado que Vif protege al virus de una posible inactivación al prevenir la incorporación de APOBEC3G en la progenie viral. Esta inactivación la lleva a cabo mediante el reclutamiento del complejo de ligasas de ubiquitina que comprende a la proteína de andamiaje Cullin5, las elonginas B y C, Rxb2 y la enzima conjugante E2. Esto resulta en la poliubiquitinación y la subsecuente degradación proteosomal de APOBEC3G<sup>13,28</sup> (Figura 3).

Recientemente se han descrito otros mecanismos de restricción independientes de la actividad de desaminasa de APOBEC3G, como la unión de la nucleocápside viral, lo cual impide el alineamiento del iniciador de tRNA<sup>Lys3</sup> al RNA genómico inhibiendo la transcripción reversa.<sup>29</sup> Esta actividad antiviral podría ser de gran relevancia; por ejemplo, para APOBEC3A se ha encontrado que esta actividad inhibe parvovirus y retrotransposones, mientras que

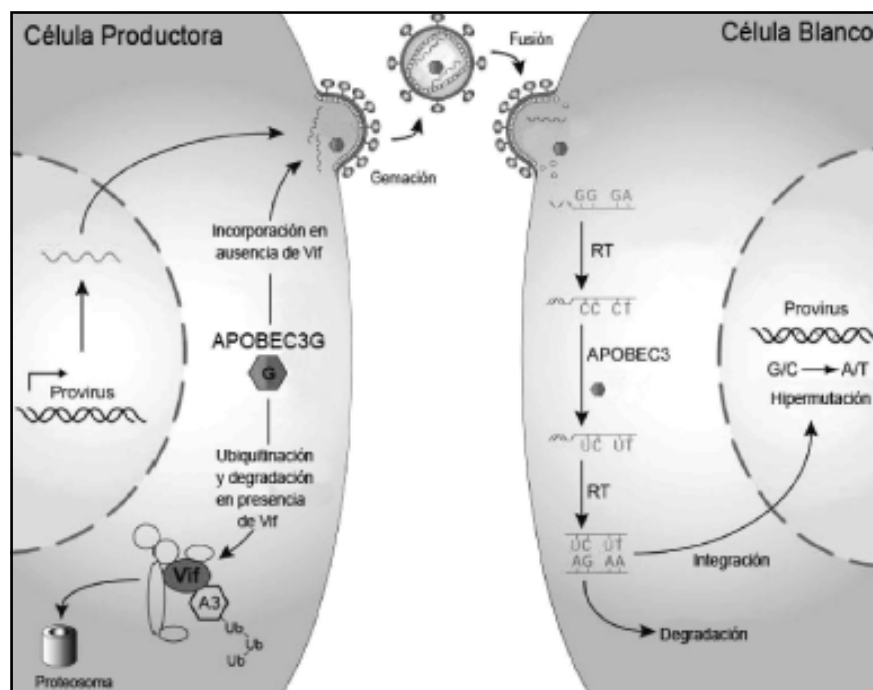


Figura 3. Modelo de restricción del VIH mediada por APOBEC3G. En una célula infectada la ausencia de Vif permite la integración de la proteína APOBEC3G en la progenie viral. Después de la fusión de estos virus con una nueva célula blanco y el inicio de la transcripción reversa, APOBEC3G desamina citosinas a uracilos en la cadena molde del cDNA viral resultando en hipermutación que puede generar provirus no funcionales o la degradación del material genético previo a su integración. Mientras que la presencia de Vif ocasiona la degradación de APOBEC3G al actuar como un adaptador entre el factor celular y las proteínas del complejo de ligasas de ubiquitina, causando la degradación de A3G por vía proteosomal. Imagen modificada de Hultquist, et al.<sup>58</sup>

APOBEC3G inhibe por esta vía a virus como HTLV-1 y el virus de hepatitis B.<sup>23</sup>

Por otro lado, se sabe que muchas de las mutaciones que confieren resistencia a antirretrovirales, así como escape de la respuesta inmunológica, son cambios de G→A, por lo que es necesario considerar que los cambios inducidos por APOBEC3G podrían conferir ventajas al virus al introducir cambios en su secuencia nucleotídica que le permitan escapar de las diversas estrategias terapéuticas o inclusive generar resistencia.

### **Homología de las proteínas APOBEC en otras especies**

Las proteínas APOBEC3 son únicas de los mamíferos, el primer gen identificado fue el gen 3 de rescate del virus Friend (Rfv3) de ratones, que posteriormente se identificó que formaba parte de la familia de las deaminasas de citidina.<sup>30</sup> Se estima que un gen APOBEC3 ancestro en mamíferos presentaba un rearrreglo del dominio catalítico coordinado por Zn<sup>2+</sup> y que eventos de duplicación de los genes APOBEC3 ocurrieron de forma independiente en diferentes linajes: humanos, felinos y equinos. En todos ellos, la duplicación genética ha dado como resultado cambios en la actividad enzimática y la especificidad en el sustrato, siendo estas proteínas un ejemplo de evolución adaptativa convergente a nivel genómico.<sup>31</sup> Diversas proteínas de esta familia en simios, felinos y roedores han mostrado tener actividad de restricción a retroelementos; sin embargo, otro tipo de proteínas APOBEC3 en otros mamíferos no ha sido examinado aún. En lo que respecta a las proteínas de primates, estudios comparativos de monos de América han demostrado que las proteínas APOBEC3 han estado bajo una fuerte selección positiva por al menos 33 millones de años. Esta presión de selección aunada a una expansión no paralela de un solo gen en roedores a siete en primates, sugiere que estas proteínas forman un sistema de defensa innato adaptable y altamente flexible, el cual puede ser capaz de enfrentar retroelementos nuevos y potencialmente invasivos.<sup>32</sup>

### **Actividad contra el VIH *in vitro***

La actividad de APOBEC3G y APOBEC3F contra el VIH *in vitro* está muy bien caracterizada. Se conocen los sitios de interacción con su contraparte en el virus: la proteína Vif. Huthoff, *et al.*,<sup>33</sup> demostraron que hay siete aminoácidos que se encuentran en los residuos 124 al 130 que están implicados en la

interacción de APOBEC3G con la proteína accesoria viral Vif del VIH. Esta interacción inhibe la actividad de APOBEC3G y, por lo tanto, la inhibición de la replicación viral. Por otra parte, en el dominio catalítico DC1 se encuentran los sitios de encapsidación, de unión al RNA viral y de multimerización.<sup>33</sup> El mecanismo por el cual Vif inhibe la acción de APOBEC3G involucra la degradación de ésta mediante una vía dependiente del proteosoma. Específicamente, Vif enlaza a ambos APOBEC3G y al complejo de ligasas de ubiquitina E3 que consiste de Cullin5, Rbx2 y las elonginas B y C, de tal forma que la proximidad de este complejo facilita la ubiquitinación y posterior degradación de APOBEC3G por el proteosoma celular. Otros motivos de interacción de la proteína viral son dos dominios de interacción con APOBEC3F y APOBEC3G: el D<sup>14</sup>RMR<sup>17</sup> y el Y<sup>40</sup>RHHY<sup>44</sup>, localizados en el extremo N-terminal. Mientras que hacia el extremo C-terminal se encuentran los sitios de interacción con el complejo de ubiquitinación, entre ellos, el motivo H<sup>108</sup>CCH<sup>139</sup> que interactúa con Cul5 y S<sup>144</sup>LQXLA<sup>149</sup> con EloC.<sup>34</sup>

La dualidad APOBEC3G-Vif es un tema de actualidad en el estudio de la patogénesis del VIH. El conocer los mecanismos celulares y moleculares por los cuales APOBEC3G inhibe a diferentes retroelementos incluyendo el VIH, son de suma importancia para proponer posibles alternativas terapéuticas. En este sentido uno de los temas más relevantes es conocer los procesos genéticos, epigenéticos y transcripcionales de la expresión de esta proteína. Al respecto, hasta ahora se conoce que la única citocina que estimula la expresión de APOBEC3G es IFN- $\alpha$ . En 2006 Chen, conociendo que el sistema interferón activa el mecanismo de defensa de la inmunidad innata, estimuló con éste células CD4<sup>+</sup> en reposo, mejorando la expresión de APOBEC3G sugiriendo que es un miembro del sistema de IFN.<sup>35</sup> Aunado a esto, en 2007 Biasin, *et al.*, encontraron que la sobreexpresión de APOBEC3G por medio de IFN- $\alpha$  está correlacionada con una menor susceptibilidad a la infección del VIH en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs, por sus siglas en inglés).<sup>36</sup>

Otro punto de interés es conocer qué tipo de células son las que presentan mayor expresión de APOBEC3G. En 2007 Stopak, *et al.*, estudiaron las diferentes citocinas que pudieran estimular la expresión de esta proteína, de este modo encontraron que IL-2 e IL-15 tienen un papel inductor de la expresión en células T CD4<sup>+</sup>. Del mismo modo, los IFNs también juegan un papel inductor en macrófagos y en células dendríticas. En células dendríticas maduras se induce la expresión de APOBEC3G de bajo

peso molecular (LMM), la forma activa de esta proteína, lo cual correlaciona con el decremento en la permisividad de estas células a la infección por el VIH.<sup>37</sup>

En nuestro grupo de investigación se ha evaluado la expresión del RNAm de esta familia de citidin deaminasas con estímulos como IFN- $\alpha$  y análogos del genoma viral tanto en PBMCs como en las diversas estirpes celulares en pacientes controladores de la infección e individuos expuestos seronegativos, encontrando únicamente un incremento importante en la expresión de APOBEC3A y APOBEC3B en ambas cohortes, sin encontrar datos concluyentes sobre el incremento en la expresión de los otros miembros de la familia aun en células estimuladas con IFN- $\alpha$ .<sup>38</sup> Con base en lo anterior y en los datos previamente publicados, se sugiere que son diversas las citocinas involucradas en el estímulo de la expresión de estos factores de restricción; asimismo, es posible que los diferentes miembros de la familia de citidin deaminasas puedan desempeñar un papel diferenciado en la restricción de la infección viral. La investigación de las moléculas que estimulen su expresión y su posible empleo en nuevas terapias antirretrovirales es fundamental para favorecer el funcionamiento de los factores celulares de restricción en la interacción virus-hospedero durante la infección por VIH.

### **Importancia en la patogenicidad del VIH *in vivo***

Los primeros trabajos dirigidos a conocer la importancia de APOBEC3G *in vivo* se realizaron en 2004; en éstos se estudió la relación entre las variantes genéticas de APOBEC3G con la progresión a SIDA en diferentes cohortes de pacientes. Min Wei y Hui Xing basaron su estudio en un paciente considerado lento progresor a largo plazo (LTNP, por sus siglas en inglés), analizaron la secuencia del DNA proviral en el paciente y encontraron cambios significativos en el número de hipermutaciones de G por A, que se atribuyeron a la actividad de APOBEC3G. Posteriormente, se analizaron los polimorfismos presentes en el gen de APOBEC3G en diferentes cohortes de pacientes; sin embargo, hasta ahora no se han encontrado datos concluyentes acerca de la importancia de la variación genética de esta proteína y el papel en su expresión.<sup>39</sup> Una excepción es el polimorfismo H186R que se encuentra en el exón 4 y que se ha asociado con una mayor progresión de la enfermedad en afroamericanos.<sup>40</sup>

Posteriormente, una cohorte francesa fue investigada por Do, *et al.* Este grupo de investigación estu-

dió 29 polimorfismos, de los cuales 14 no habían sido reportados, estos últimos se encontraron en alta frecuencia en su cohorte, la cual estaba conformada por pacientes de progresión rápida y otros pacientes que progresaron lentamente a SIDA. Contrariamente a lo observado en otras cohortes, no se encontró y relación entre la presencia de estos polimorfismos y la progresión de la enfermedad.<sup>41</sup>

Otra forma de conocer la importancia de APOBEC3G *in vivo* es correlacionar su expresión con marcadores de progresión de la enfermedad. Uno de los primeros reportes por Jin, *et al.*, encontró una correlación inversa entre los niveles del RNAm de APOBEC3G y la carga viral, así como una correlación positiva con el nivel de CD4<sup>+</sup>. Por otro lado, encontraron que los niveles de RNAm de APOBEC3G son mayores en los pacientes LTNP, con respecto a sujetos no infectados y a pacientes con progresión típica.<sup>42</sup> Sin embargo, Cho, *et al.*, no encontraron correlación alguna entre la cantidad de RNAm de APOBEC3G y APOBEC3F y las cargas virales o el recuento de linfocitos T CD4<sup>+</sup>.<sup>43</sup>

Biasin, *et al.*, en 2007, demostraron que la expresión de APOBEC3G es mayor en PBMCs y en tejido cervical de personas que, aunque se exponen al VIH por medio de relaciones sexuales de riesgo, no se infectan (expuestos seronegativos). Cabe destacar que este trabajo fue el primero en investigar cuál estirpe celular presenta mayor expresión de APOBEC3G *in vivo*, de modo que separaron células CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> y CD14<sup>+</sup>, siendo la célula CD14<sup>+</sup> la principal productora de APOBEC3G.<sup>44</sup>

Éste es un tema actual de alta controversia, por lo que nuestro grupo de investigación estudió también cohortes de pacientes mexicanos incluyendo expuestos seronegativos. También se estudiaron pacientes que cumplían criterios como controladores de la replicación viral y pacientes con progresión típica de la enfermedad. Nuestro estudio apoyó los datos de Xia Jin y Biasin, confirmando que las personas expuestas seronegativas y controladores de la replicación presentan mayor expresión de APOBEC3G comparadas con controles sanos y pacientes progresores típicos. De forma interesante se demostró que las personas expuestas seronegativas disminuyeron la expresión de la proteína después de un año de seguimiento, concordando con la disminución de la carga viral de sus parejas sexuales.<sup>45</sup>

Tomando estos datos en conjunto y datos recientemente publicados<sup>46-48</sup> apuntan a un significado biológico importante de APOBEC3G en la infección por VIH. Existen diferentes parámetros genéticos, inmunológicos y virológicos implicados en la protección y

en la progresión contra la infección por el VIH, APOBEC3G estaría contribuyendo dentro de la respuesta inmunológica innata impidiendo la replicación viral en estos pacientes.

## OTROS FACTORES CELULARES DE RESTRICCIÓN

Existen otros factores celulares que afectan la replicación del VIH y a otros elementos retrovirales, como son TRIM5 $\alpha$ , Teterina o BST-2 y SAMHD1. Aunque han sido menos estudiados tomando como referencia a APOBEC3G, se conoce básicamente aspectos celulares y moleculares de dichas proteínas. El impacto biológico aún queda por resolverse. A continuación se revisan algunos aspectos importantes de estos factores celulares.

### TRIM5 $\alpha$ y TRIMCyp

La proteína TRIM5 $\alpha$  posee actividad antirretroviral al bloquear la infección en los pasos tempranos de la replicación viral. Se encuentran proteínas homólogas en múltiples linajes de primates, incluyendo al humano, simios, monos de América, de Asia y África, así como en otros mamíferos como vacas y conejos. Existe un alto grado de diversidad entre las proteínas en primates con evidencia de selección positiva sobre los dominios determinantes de especificidad de sustrato, mientras que en humanos presenta reducción de su diversidad. Siendo ésta una posible explicación de la baja actividad supresora de la proteína humana en la replicación del VIH.<sup>49</sup>

TRIM5 $\alpha$  es una proteína citoplásmica de aproximadamente 500 aminoácidos, está compuesta por los dominios RING y caja B en la parte amino terminal, el dominio central se conforma de espirales súper-enrolladas, y finalmente el dominio carboxilo terminal está formado por el dominio PRYSPRY. En el dominio SPRY se encuentran segmentos hipervariables (VI-V3) que determinan la selección del sustrato. Específicamente el segmento V1 ha mostrado ser clave para el reconocimiento de la proteína de la cápside del VIH.<sup>50</sup>

Debido a eventos de retrotransposición se genera un gen quimérico entre la proteína chaperona Ciclofilina A (CypA) y TRIM5 $\alpha$ , dando como resultado una proteína de fusión TRIMCypA con potente capacidad de inhibición del VIH-1 y de lentivirus cuyas proteínas de la cápside se unan a CypA.<sup>17</sup>

TRIMCypA se encuentra en estructuras dinámicas llamadas cuerpos citoplásmicos, que al encontrar un virus son reclutadas rápidamente y dirigen

su degradación proteosomal, acelerando la fragmentación de la proteína de la cápside poco tiempo después de la entrada viral,<sup>51</sup> alterando la arquitectura del complejo de retrotranscripción y bloqueando la transcripción reversa.<sup>52</sup>

### Teterita

El factor celular BST-2 o teterina fue descubierto al analizar las líneas celulares que no eran capaces de producir viriones cuando eran infectadas con virus de VIH deficientes de la proteína accesoria Vpu, como las células HeLa. Esto sugirió que existía un factor que potencialmente podía afectar la replicación viral en ausencia de Vpu. Los autores encontraron que este nuevo factor inhibía potentemente la liberación de los viriones y que esta acción era antagonizada por Vpu.<sup>53</sup>

Teterina es una proteína transmembranal tipo II de un solo paso. Tiene un anclaje a la membrana en su dominio amino terminal, y un glicofosfatidilinositol (GPI) anclado en su dominio carboxilo terminal. La parte extracelular forma una sola alfa-hélice, la cual adopta una estructura dimérica súper enrollada con ayuda de enlaces disulfuro entre cisteína y cisteína de cada teterita.<sup>50</sup>

Uno de los modelos de acción de la proteína teterina indica que el par de dominios transmembranales se infiltran en la envoltura lipídica del virión ensamblado, mientras las dos anclas con el lípido GPI permanecen en la membrana celular. De esta forma el dímero de teterinas promueve que los virus permanezcan atrapados en la superficie de la célula infectada acumulándose en endosomas. Teterina es inducida mediante IFN- $\alpha$  y hay evidencia que sugiere que el reconocimiento de los viriones por parte de teterina no es específica.<sup>53</sup>

Sin embargo, la proteína viral Vpu, proteína antagonista de teterina, colocaliza y coimmunoprecipita con teterina y con uno de los componentes del complejo de ligasas de ubiquitina: TRCP2. Esta interacción parecería la culpable de la degradación proteosomal de teterina,<sup>54</sup> así como de la disminución de su expresión en la superficie celular, ya sea por retrasar su producción a través de la vía secretora o causando su internalización.<sup>50</sup>

### PERSPECTIVA DE EMPLEO COMO TERAPIA O VACUNA

Uno de los primeros investigadores en proponer una nueva estrategia de vacunación empleando la interacción Vif-APOBEC3G fue Stopak en 2007.<sup>37</sup>

La propuesta fue conocer y controlar la expresión de APOBEC3G en las células blanco del VIH, es decir, en células T CD4<sup>+</sup> para contrarrestar el efecto de Vif y de esta forma desplazar el balance hacia el efecto de hipermutación debida a APOBEC3G y, por lo tanto, hacia la inhibición de la replicación viral con un posible beneficio terapéutico.<sup>37</sup> Posteriormente, los estudios de Huthoff, *et al.*, al encontrar los residuos de aminoácidos involucrados en la interacción de APOBEC3G con Vif, permitieron el comienzo de diversos trabajos que se enfocaron en proponer compuestos que se unieran a Vif impidiendo su interacción con APOBEC3G.<sup>55</sup>

La existencia de diversas interacciones entre las proteínas accesorias del VIH y distintas proteínas del hospedero demuestran la importancia de los factores celulares de restricción en el establecimiento de una respuesta inmune eficiente contra el virus, señalándolos como un elemento fundamental en el estudio de la patogénesis viral y reafirmando la trascendencia de la investigación de estas proteínas para la búsqueda de novedosas terapias antivirales.

Asimismo, en los últimos dos años se han identificado otros factores con actividad antiviral, el factor descubierto recientemente es SAMHD1, se encuentra altamente expresado y es funcional en células mieloides,<sup>56</sup> se ha observado que actúa en los pasos tempranos de la replicación del VIH, pero aún no se conoce a fondo su mecanismo de acción. Todos los factores de restricción viral previamente menciona-

dos parecerían estar regulados transcripcionalmente por medio de IFN  $\alpha$ .<sup>57</sup> Esta primera línea de defensa está constituida, entre otros componentes, por los receptores de reconocimiento de patrones, o PRRs por sus siglas en inglés. Estos receptores (TLR 3, 7, 8, RIG-I) reconocen el genoma del VIH, principalmente en la parte citosólica de la célula, y activan una respuesta protectora para las células no infectadas, primordialmente mediada por los elementos de respuesta a interferón, o ISGs por sus siglas en inglés. Los factores celulares de restricción viral podrían ya incluirse junto con los ISGs con actividad antiviral ya conocidos como MX1, OAS e ISG15 en una primera línea de defensa antiviral (Figura 4). Por un lado los genomas virales podrían disparar la respuesta antiviral y en contraparte las proteínas del VIH como Vif para APOBEC3G o Vpu en el caso de Teterina contrarrestarían esta actividad.

Por lo tanto, el estudio de los factores de restricción y su contraparte, las proteínas virales, podría contribuir al entendimiento de cómo nuestro sistema inmunológico enfrenta las infecciones virales y cómo estos podrían evadir dicha respuesta.

## CONCLUSIONES

Investigaciones recientes han resaltado la participación de factores celulares innatos en la restricción de infecciones virales exógenas y la protección de la célula ante retroelementos endógenos. La identifica-

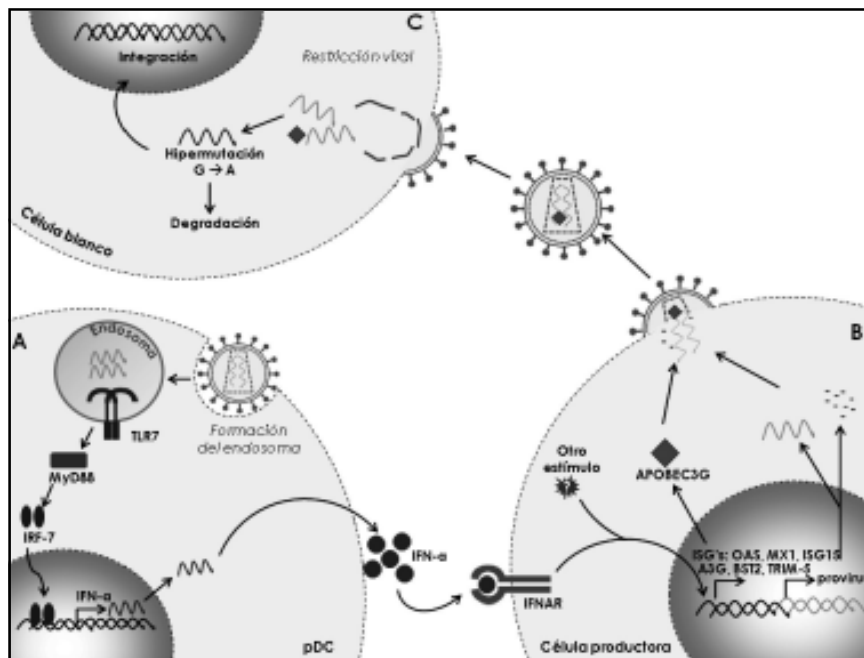


Figura 4. Estimulación de los factores de restricción por medio de interferón. A. Células dendríticas endocitan el virus del VIH y el ARN viral es detectado por medio de TLR7. A través de MyD88 e IRF-7 el gen de IFN- $\alpha$  es estimulado. B. Esta citocina es capaz de establecer un estado antiviral a una célula susceptible a la infección, mediante la producción de proteínas con actividad antiviral como los ISG's y los factores de restricción. Muy probablemente la expresión de APOBEC3G necesita otro estímulo adicional al de interferón; sin embargo, cuando la proteína es producida en suficiente cantidad es incorporada en los nuevos virus para posteriormente realizar su actividad anti-retroviral (C) en otra célula donde se establezca una nueva infección.



ción de nuevas proteínas con actividad de restricción, la elucidación de sus mecanismos de acción y el reconocimiento de los mecanismos de evasión de estas proteínas por parte del virus son un novedoso escenario que invita al descubrimiento de otros elementos celulares que obstaculicen las diversas etapas en la replicación viral y a la profunda caracterización de los ya identificados, así como su aplicación en el desarrollo de novedosas terapias antivirales.

Debido al posible papel de Vif en la evasión de los mecanismos inmunes del hospedero, ésta es uno de los blancos más promisorios para el desarrollo de nuevas terapias antivirales. Esto mediante el empleo de moléculas que impidan la interacción de Vif con APOBEC3G o con las proteínas celulares que participen en su ubiquitinación y posterior degradación, favoreciendo el empacamiento de más de estas moléculas dentro de la progenie viral y el incremento o sobreexpresión de la proteína en las células del sistema inmune.

Por otro lado, aún falta conocer cuál es la actividad suficiente o necesaria para que APOBEC3G pueda realizar su actividad tanto la dependiente de deaminasa como la independiente, además de la identificación de las moléculas que puedan incrementar su actividad contra el VIH.

El pleno conocimiento de los mecanismos involucrados en la inmunidad innata posteriores a la exposición a VIH permitirá un conocimiento más profundo de la patogénesis del VIH que finalmente contribuirá al desarrollo de nuevas vacunas o estrategias terapéuticas para esta enfermedad. Por ejemplo, el uso de agonistas de TLRs como adyuvantes en la inmunización con antígenos del VIH es una posible vía para el desarrollo de moléculas que estimulen de manera específica una respuesta antiviral.

#### REFERENCIAS

1. Publicaciones de ONUSIDA - 2012 - Informe mundial: informe de ONUSIDA sobre la epidemia mundial de SIDA 2012. Disponible en: <http://www.unaids.org/es/resources/publications/2012/name,76121,es.asp>
2. Barré-Sinoussi F, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983; 220: 868-71.
3. Shaw GM, et al. Molecular characterization of human T-cell leukemia (lymphotropic) virus type III in the acquired immune deficiency syndrome. *Science* 1984; 226: 1165-71.
4. Dalglish AG, et al. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 1984; 312: 763-7.
5. Nakashima H, et al. Inhibition of replication and cytopathic effect of human T cell lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus by 3'-azido-3'-deoxythymidine in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother* 1986; 30: 933-7.

6. Larder BA, Kemp SD. Multiple mutations in HIV-1 reverse transcriptase confer high-level resistance to zidovudine (AZT). *Science* 1989; 246: 1155-8.
7. Arts EJ, Hazuda DJ. HIV-1 antiretroviral drug therapy. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012; 2, a007161.
8. Gakhar H, Kamali A, Holodniy M. Health-related quality of life assessment after antiretroviral therapy: a review of the literature. *Drugs* 2013; 73: 651-72.
9. Santoro MM, Perno CF. HIV-1 Genetic Variability and Clinical Implications. *ISRN Microbiol* 2013; 2013: 481314.
10. Benjamin LA, et al. HIV infection and stroke: current perspectives and future directions. *Lancet Neurol* 2012; 11: 878-90.
11. Stephenson KE, Barouch DH. A global approach to HIV-1 vaccine development. *Immunol Rev* 2013; 254: 295-304.
12. Rerks-Ngarm S, et al. Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. *N Engl J Med* 2009; 361: 2209-20.
13. Malim MH, Bieniasz PD. HIV Restriction Factors and Mechanisms of Evasion. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2012; 2: a006940-a006940.
14. Sheehy AM, Gaddis NC, Choi JD, Malim MH. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* 2002; 418: 646-50.
15. Goila-Gaur R, Strebel K. HIV-1 Vif, APOBEC, and Intrinsic Immunity. *Retrovirology* 2008; 5: 51.
16. Lever RA, Lever AM. L. Intracellular defenses against HIV, viral evasion and novel therapeutic approaches. *J Formos Med Assoc* 2011; 110: 350-62.
17. Strebel K, Luban J, Jeang K-T. Human cellular restriction factors that target HIV-1 replication. *BMC Med* 2009; 7: 48.
18. Chang MO, Suzuki T, Yamamoto N, Watanabe M, Takaku H. HIV-1 Gag-Virus-Like Particles Inhibit HIV-1 Replication in Dendritic Cells and T Cells through IFN- $\alpha$ -Dependent Upregulation of APOBEC3G and 3F. *J Innate Immunity* 2012; 4: 579-90.
19. Chester A, Scott J, Anant S, Navaratnam N. RNA editing: cytidine to uridine conversion in apolipoprotein B mRNA. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1494: 1-13.
20. Muramatsu M, et al. Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. *J Biol Chem* 1999; 274: 18470-6.
21. Liao W, et al. APOBEC-2, a cardiac- and skeletal muscle-specific member of the cytidine deaminase supergene family. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 260: 398-404.
22. Bishop KN, Verma M, Kim E-Y, Wolinsky SM, Malim MH. APOBEC3G inhibits elongation of HIV-1 reverse transcripts. *PLoS Pathog* 2008; 4: e1000231.
23. Vieira VC, Soares MA. The role of cytidine deaminases on innate immune responses against human viral infections. *Biomed Res Int* 2013; 683095 (2013).
24. Holden LG, et al. Crystal structure of the anti-viral APOBEC3G catalytic domain and functional implications. *Nature* 2008; 456: 121-4.
25. Chiu Y-L, et al. Cellular APOBEC3G restricts HIV-1 infection in resting CD4<sup>+</sup> T cells. *Nature* 2005; 435: 108-14.
26. Hultquist JF, et al. Human and Rhesus APOBEC3D, APOBEC3F, APOBEC3G, and APOBEC3H Demonstrate a Conserved Capacity To Restrict Vif-Deficient HIV-1. *J Virol* 2011; 85: 11220-34.
27. Yu Q, et al. Single-strand specificity of APOBEC3G accounts for minus-strand deamination of the HIV genome. *Nat Struct Mol Biol* 2004; 11: 435-42.
28. Sheehy AM, Gaddis NC, Malim MH. The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif. *Nat Med* 2003; 9: 1404-07.

29. Guo F, et al. The interaction of APOBEC3G with human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid inhibits tRNA<sup>3</sup>Lys annealing to viral RNA. *J Virol* 2007; 81: 11322-31.
30. Santiago ML, et al. Apobec3 encodes Rfv3, a gene influencing neutralizing antibody control of retrovirus infection. *Science* 2008; 321; 1343-6.
31. Münk C, Willemsen A, Bravo IG. An ancient history of gene duplications, fusions and losses in the evolution of APOBEC3 mutators in mammals. *BMC Evol Biol* 2012; 12: 71.
32. Jónsson SR, et al. Evolutionarily conserved and non-conserved retrovirus restriction activities of artiodactyl APOBEC3F proteins. *Nucleic Acids Res* 2006; 34: 5683-94.
33. Huthoff H, Malim MH. Cytidine deamination and resistance to retroviral infection: towards a structural understanding of the APOBEC proteins. *Virology* 2005; 334: 147-53.
34. Russell RA, Pathak VK. Identification of two distinct human immunodeficiency virus type 1 Vif determinants critical for interactions with human APOBEC3G and APOBEC3F. *J Virol* 2007; 81: 8201-10.
35. Chen K, et al. Alpha interferon potently enhances the anti-human immunodeficiency virus type 1 activity of APOBEC3G in resting primary CD4 T cells. *J Virol* 2006; 80: 7645-57.
36. Biasin M, et al. Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G: a possible role in the resistance to HIV of HIV-exposed seronegative individuals. *J Infect Dis* 2007; 195: 960-4.
37. Stopak KS, Chiu Y-L, Kropp J, Grant RM, Greene WC. Distinct patterns of cytokine regulation of APOBEC3G expression and activity in primary lymphocytes, macrophages, and dendritic cells. *J Biol Chem* 2007; 282: 3539-46.
38. Vazquez-Perez JA. International AIDS Society - Poster Exhibition. Disponible en: <http://www.iasociety.org/Default.aspx?pageId=735>
39. Valcke HS, et al. APOBEC3G genetic variants and their association with risk of HIV infection in highly exposed Caucasians. *AIDS* 2006; 20, 1984-6.
40. An P, et al. APOBEC3G genetic variants and their influence on the progression to AIDS. *J Virol* 2004; 78: 11070-6.
41. Do H, et al. Exhaustive genotyping of the CEM15 (APOBEC3G) gene and absence of association with AIDS progression in a French cohort. *J Infect Dis* 2005; 191: 159-63.
42. Jin X, et al. APOBEC3G/CEM15 (hA3G) mRNA levels associate inversely with human immunodeficiency virus viremia. *J Virol* 2005; 79: 11513-6.
43. Cho S-J, et al. APOBEC3F and APOBEC3G mRNA levels do not correlate with human immunodeficiency virus type 1 plasma viremia or CD4<sup>+</sup> T-cell count. *J Virol* 2006; 80: 2069-72.
44. Biasin M, et al. Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G: a possible role in the resistance to HIV of HIV-exposed seronegative individuals. *J Infect Dis* 2007; 195: 960-4.
45. Vázquez-Pérez JA, Ormsby CE, Hernández-Juan R, Torres KJ, Reyes-Terán G. APOBEC3G mRNA expression in exposed seronegative and early stage HIV infected individuals decreases with removal of exposure and with disease progression. *Retrovirology* 2009; 6: 23.
46. Jin X, et al. APOBEC3G/CEM15 (hA3G) mRNA levels associate inversely with human immunodeficiency virus viremia. *J Virol* 2005; 79: 11513-6.
47. Farrow MA, et al. Nuclear localization of HIV type 1 Vif isolated from a long-term asymptomatic individual and potential role in virus attenuation. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2005; 21: 565-74.
48. Wang B, et al. First demonstration of a lack of viral sequence evolution in a nonprogressor, defining replication-incompetent HIV-1 infection. *Virology* 2003; 312: 135-50.
49. Newman RM, et al. Evolution of a TRIM5-CypA splice isoform in old world monkeys. *PLoS Pathog* 2008; 4: e1000003.
50. Malim MH, Bieniasz PD. HIV Restriction Factors and Mechanisms of Evasion. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012; 2: a006940.
51. Huthoff H, Towers GJ. Restriction of retroviral replication by APOBEC3G/F and TRIM5alpha. *Trends Microbiol* 2008; 16: 612-9.
52. Newman RM, Johnson WE. A brief history of TRIM5alpha. *AIDS Rev* 2007; 9: 114-25.
53. Neil SJD, Zang T, Bieniasz PD. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature* 2008; 451: 425-30.
54. Mangeat B, et al. HIV-1 Vpu neutralizes the antiviral factor Tetherin/BST-2 by binding it and directing its beta-TrCP2-dependent degradation. *PLoS Pathog* 2009; 5: e1000574.
55. Ali A, et al. Synthesis and structure-activity relationship studies of HIV-1 virion infectivity factor (Vif) inhibitors that block viral replication. *Chem Med Chem* 2012; 7, 1217-29.
56. Laguette N, et al. SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature* 2011; 474: 654-7.
57. Rice GI, et al. Mutations involved in Aicardi-Goutières syndrome implicate SAMHD1 as regulator of the innate immune response. *Nat Genet* 2009; 41: 829-32.
58. Hultquist JF, et al. Human and rhesus APOBEC3D, APOBEC3F, APOBEC3G, and APOBEC3H demonstrate a conserved capacity to restrict Vif-deficient HIV-1. *J Virol* 2011; 85: 11220-34.

Reimpresos:

**Dr. Joel Armando Vázquez-Pérez**

Laboratorio de Investigación en Virología y  
Micología

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias  
Clzd. de Tlalpan, Núm. 4502

Col. Sección XVI  
14080, México, D.F.

Tel.: 5487-1700, Ext. 5123.

Correo electrónico:

joevazpe@gmail.com, joevazpe@yahoo.com.mx

Recibido el 16 de diciembre 2013.

Aceptado el 30 de junio 2014.