



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

COORDINACIÓN GENERAL ACADÉMICA

Coordinación de Bibliotecas

Biblioteca Digital

La presente tesis es publicada a texto completo en virtud de que el autor ha dado su autorización por escrito para la incorporación del documento a la Biblioteca Digital y al Repositorio Institucional de la Universidad de Guadalajara, esto sin sufrir menoscabo sobre sus derechos como autor de la obra y los usos que posteriormente quiera darle a la misma.

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS DE LA SALUD
DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA
MOLECULAR EN MEDICINA



TESIS DE GRADO

**“EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LA FAMILIA DE
REPRESORES TRANSCRIPCIONALES *ZBTB* EN LINFOCITOS T CD4⁺
EN LA INFECCIÓN POR VIH-1”**

PRESENTA

Q. F. B. JUDITH CAROLINA DE ARCOS JIMÉNEZ

GUADALAJARA, JALISCO. SEPTIEMBRE, 2020



**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS DE LA SALUD
DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA
MOLECULAR EN MEDICINA**



TESIS DE GRADO

**“EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LA FAMILIA DE
REPRESORES TRANSCRIPCIONALES ZBTB EN LINFOCITOS T CD4⁺ EN
LA INFECCIÓN POR VIH-1”**

PRESENTA

Q. F. B. JUDITH CAROLINA DE ARCOS JIMÉNEZ

DIRECTOR DE TESIS
DR. EN C. MOISÉS RAMOS SOLANO

CODIRECTOR DE TESIS
DRA. EN C. CLAUDIA AZUCENA PALAFOX SÁNCHEZ

ASESOR DE TESIS
DR. JAIME F. ANDRADE VILLANUEVA

ASESOR DE TESIS
DRA. EN C. KARINA SÁNCHEZ REYES

GUADALAJARA, JALISCO. SEPTIEMBRE, 2020



SEDE DEL ESTUDIO

El presente trabajo de investigación se realizó en el Instituto de Investigación en Inmunodeficiencias y VIH (InIVIH) del Centro Universitario de Ciencias de la Salud de la Universidad de Guadalajara en colaboración con la Unidad de VIH del Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde” en Guadalajara, Jalisco, México.

Además, se contó con el apoyo del Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIENI) perteneciente al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) de la CDMX, y el Centro Ambulatorio para la Prevención y Atención en SIDA e Infecciones de Transmisión Sexual (CAPASITS) de Guanajuato, quienes proporcionaron muestras de pacientes controladores de élite para este estudio.

Este proyecto estuvo bajo la dirección del Dr. en C. Moisés Ramos Solano, la codirección de la Dra. en C. Claudia Azucena Palafox Sánchez, la asesoría del Dr. Jaime F. Andrade Villanueva y la Dra. en C. Karina Sánchez Reyes.

El Financiamiento fue obtenido a través de los programas institucionales de la Universidad de Guadalajara, PROSNI 2017-2019, PROINPEP 2017-2019 y PRODEP, NPTC (UDG-PTC-1276). Durante la realización de este proyecto fui becaria CONACyT (CVU 745171).



DIRECTORIO

Alumna:

Q. F. B. Judith Carolina De Arcos Jiménez

Doctorado en Ciencias en Biología Molecular en Medicina

Departamento de Biología Molecular y Genómica

Centro Universitario de Ciencias de la Salud-Universidad de Guadalajara

e-mail: jcdearcosj@gmail.com

Director de tesis:

Dr. en C. Moisés Ramos Solano

Profesor Investigador - Docente Asociado A

Laboratorio de Patología

Departamento de Clínicas Médicas

Centro Universitario de Ciencias de la Salud – Universidad de Guadalajara

SNI: nivel I

e-mail: biolog.moises@gmail.com

Codirector de tesis:

Dr. en C. Claudia Azucena Palafox Sánchez

Profesor Investigador - Docente Titular C

Instituto de Investigación en Ciencias Biomédicas (IICB)

Departamento de Biología Molecular y Genómica

Centro Universitario de Ciencias de la Salud – Universidad de Guadalajara

SNI: nivel II

e-mail: kklaumx@yahoo.com

Asesor de tesis:

Dr. Jaime F. Andrade Villanueva

Profesor Investigador – Docente titular C

Instituto de Investigación en Inmunodeficiencias y VIH (InIVIH)

Departamento de Clínicas Médicas

Centro Universitario de Ciencias de la Salud – Universidad de Guadalajara

SNI: nivel I

e-mail: drjandradev@cucs.udg.mx



Asesor de tesis:

Dr. en C. Karina Sánchez Reyes

Profesor Investigador - Docente Asociado B

Instituto de Investigación en Inmunodeficiencias y VIH (InIVIH)

Departamento de Clínicas Médicas

Centro Universitario de Ciencias de la Salud – Universidad de Guadalajara

SNI: nivel I

e-mail: karina_reyesqfb@hotmail.com

Comité Evaluador:

Dr. en C. Alfredo Corona Rivera

Profesor Investigador- Docente - Titular C

Instituto de Genética Humana “Dr. Enrique Corona Rivera”

Departamento de Biología Molecular y Genómica

Centro Universitario de Ciencias de la Salud – Universidad de Guadalajara

SNI: nivel II

e-mail: alcoronar@gmail.com

Dr. en C. Erika Martínez López

Profesor Investigador- Docente Titular C

Instituto de Nutrigenética y Nutrigenómica Traslacional

Departamento de Biología Molecular y Genómica

Centro Universitario de Ciencias de la Salud – Universidad de Guadalajara

SNI: nivel II

e-mail: erikamtz27@yahoo.com.mx

Dr. en C. Laura Verónica Sánchez Orozco

Profesor Investigador- Docente Titular C

Instituto de Biología Molecular en Medicina y Terapia Génica

Departamento de Biología Molecular y Genómica

Centro Universitario de Ciencias de la Salud – Universidad de Guadalajara

SNI: nivel I

e-mail: laura.sorozco@academicos.udg.mx



ÍNDICE

SEDE DEL ESTUDIO	III
DIRECTORIO	IV
ÍNDICE.....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
ÍNDICE DE TABLAS	IX
ABREVIATURAS	X
RESUMEN	XII
ABSTRACT	XIII
INTRODUCCIÓN	3
MARCO TEÓRICO	4
1. INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH).....	4
1.1 <i>La pandemia del VIH</i>	4
1.2 <i>Patogénesis del VIH</i>	6
2. GENERALIDADES DEL VIH	10
2.1 <i>Estructura y genoma del VIH-1</i>	10
2.2 <i>Ciclo biológico del VIH-1</i>	13
2.3 <i>Tratamiento Antirretroviral (TAR)</i>	14
2.4 <i>Regulación transcripcional del VIH</i>	16
3. EL VIH Y SUS PRINCIPALES CÉLULAS DIANA: LINFOCITOS T CD4 ⁺	21
3.1 <i>Linfocitos T CD4⁺</i>	21
3.2 <i>Modelo de infección por el VIH en los LT CD4⁺</i>	22
3.3 <i>Respuesta inmune en la infección por VIH</i>	24
3.4 <i>Linfocitos T CD4⁺ y el VIH</i>	25
4. FAMILIA DE REPRESORES TRANSCRIPCIONALES ZBTB	29
4.1 <i>Represores</i>	29
4.2 <i>Estructura</i>	29
4.3 <i>Mecanismo de acción</i>	30
4.4 <i>Función de genes ZBTB</i>	31
4.5 <i>Regulación de las proteínas ZBTB</i>	35
ANTECEDENTES DIRECTOS	36
JUSTIFICACIÓN	37
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	38
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	39
HIPÓTESIS.....	39
OBJETIVOS	40
MATERIALES Y MÉTODOS	41
1. <i>Diseño y universo del estudio</i>	42
2. <i>Tamaño de muestra</i>	42
3. <i>Criterios de selección:</i>	42
4. <i>Variables</i>	44
5. <i>Operacionalización de variables</i>	44
6. <i>Periodo de estudio, sede y financiamiento</i>	45
7. <i>Diagrama metodológico</i>	46
8. <i>Metodología</i>	47



a.	Reclutamiento de controles clínicamente sanos.....	47
b.	Reclutamiento de pacientes VIH ⁺	47
c.	Obtención y tipo de muestra	48
d.	Separación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)	48
e.	Aislamiento de Linfocitos T CD4 ⁺ a partir de PBMC.....	48
f.	Determinación de la pureza de linfocitos T CD4 ⁺ aislados.....	48
g.	Diseño de primers.....	49
h.	Estandarización de primers PCR punto final	49
i.	Electroforesis en gel de agarosa	49
j.	Extracción de RNA de linfocitos T CD4 ⁺	50
k.	Síntesis de cDNA.....	50
l.	PCR en tiempo real (qPCR).....	50
m.	Análisis de expresión génica	51
n.	Análisis <i>in silico</i> del genoma del VIH-1 HXB2 y los factores transcripcionales ZBTB	53
o.	Cuantificación de citocinas	54
ANÁLISIS ESTADÍSTICO		54
ASPECTOS ÉTICOS Y BIOSEGURIDAD		55
RESULTADOS		56
1.	POBLACIÓN DE ESTUDIO	57
2.	SELECCIÓN DE GENES ZBTB.....	59
2.1	<i>Análisis in silico</i> de bases de datos: GEO y SIDRA.....	59
3.	ANÁLISIS <i>IN SILICO</i> : FACTORES TRANSCRIPCIONALES ZBTB Y GENOMA DEL VIH-1 HXB2	67
4.	DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LOS GENES ZBTB.....	70
4.1	Gen ZBTB7A.....	70
4.2	Gen ZBTB29 (HIC1)	72
4.3	Gen ZBTB2	73
4.4	Gen ZBTB4.....	75
4.5	Gen ZBTB38.....	76
4.6	Gen ZBTB7B.....	78
4.7	Gen ZBTB17.....	79
4.8	Gen ZBTB5.....	81
4.9	Gen ZBTB16.....	82
4.10	Gen ZBTB27 (BCL6).....	83
5.	COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LOS GENES ZBTB ENTRE PACIENTES CON REPLICACIÓN VIRAL ACTIVA Y CONTROLADA.....	85
6.	DETERMINACIÓN DE CITOCINAS PROINFLAMATORIAS.....	86
7.	CORRELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN ZBTB, CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y CITOCINAS PROINFLAMATORIAS.....	89
DISCUSIÓN		93
CONCLUSIONES		111
LIMITACIONES		112
PERSPECTIVAS		113
REFERENCIAS		115
ANEXOS.....		123



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Epidemiología del VIH-1 en México.	5
Figura 2. Historia natural de la infección por VIH-1.	7
Figura 3. Estructura del VIH-1.	12
Figura 4. Organización del genoma del VIH-1.	12
Figura 5. Ciclo biológico del VIH-1/ Mecanismos de acción del TAR.	16
Figura 6. Estructura del LTR del VIH-1.	18
Figura 7. Organización de la región LTR del VIH-1 en los nucleosomas.	19
Figura 8. Modelo de infección por VIH en los LT CD4 ⁺	23
Figura 9. Estructura general de las proteínas ZBTB.	29
Figura 10. Función de los dominios de las proteínas ZBTB.	31
Figura 11. Participación de los factores transcripcionales ZBTB en la hematopoyesis.	32
Figura 12. Diagrama metodológico.	46
Figura 13. Histograma de la pureza de los LT CD4 ⁺	49
Figura 14. Representación esquemática del genoma del VIH-1 HXB2.	53
Figura 15. Análisis <i>in silico</i> de la expresión génica de GEO y SIDRA.	61
Figura 16. Niveles de expresión de los genes <i>ZBTB</i> de la base de datos 1.	62
Figura 17. Niveles de expresión de los genes <i>ZBTB</i> de la base de datos 2.	63
Figura 18. Niveles de expresión de los genes <i>ZBTB</i> de la base de datos 2.	64
Figura 19. Resumen de resultados de las bases de datos 1, 2, 3 y 4. analizados.	65
Figura 20. Esquema representativo de los genes <i>ZBTB</i> seleccionados.	66
Figura 21. Representación esquemática del genoma del VIH-1 HXB2.	69
Figura 22. Gráficas de los niveles de expresión del gen <i>ZBTB7A</i>	71
Figura 23. Gráficas de los niveles de expresión del gen <i>HIC1</i>	72
Figura 24. Gráficas de los niveles de expresión del gen <i>HIC1</i>	73
Figura 25. Gráficas de los niveles de expresión del gen <i>ZBTB2</i>	74
Figura 26. Gráficas de los niveles de expresión del gen <i>ZBTB4</i>	75
Figura 27. Gráficas de los niveles de expresión del gen <i>ZBTB4</i>	76
Figura 28. Gráficas de los niveles de expresión del gen <i>ZBTB38</i>	77
Figura 29. Gráficas de los niveles de expresión del gen <i>ZBTB7B</i>	78
Figura 30. Gráficas de los niveles de expresión del gen <i>ZBTB7B</i>	79
Figura 31. Gráficas de los niveles de expresión del gen <i>ZBTB17</i>	80
Figura 32. Gráficas de los niveles de expresión del gen <i>ZBTB5</i>	81
Figura 33. Gráficas de los niveles de expresión del gen <i>ZBTB16</i>	82
Figura 34. Gráficas de los niveles de expresión del gen <i>BCL6</i>	83
Figura 35. Citocinas y quimiocinas proinflamatorias.	87
Figura 36. Citocinas y quimiocinas proinflamatorias.	88
Figura 37. Heat map de citocinas proinflamatorias determinadas en suero.	88
Figura 38. Correlación entre el gen <i>ZBTB2</i> y el Nadir de LT CD4 ⁺	89
Figura 39. Correlación entre los niveles de expresión <i>ZBTB17</i> e IL-17.	91
Figura 40. Correlaciones entre los niveles de expresión del gen <i>ZBTB7B</i> e IL-23.	91
Figura 41. Correlaciones entre los niveles de expresión de <i>ZBTB38</i> y <i>ZBTB2</i> con IL-10.	92
Figura 42. Modelo propuesto para ilustrar la interacción de los represores ZBTB y el VIH-1 en LT CD4 ⁺	110



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Citocinas que modulan la replicación del VIH-1	26
Tabla 2. Criterios de selección: <i>Grupos de pacientes VIH⁺</i>	43
Tabla 3. Criterios de selección: <i>Grupo control</i>	44
Tabla 4. Operacionalización de variables.....	45
Tabla 5. Parámetros evaluados en cada uno de los controles sanos a través del laboratorio central del Hospital Civil “Fray Antonio Alcalde”.	47
Tabla 6. Información de los <i>primers</i>	52
Tabla 7. Características demográficas y clínicas	58
Tabla 8. Frecuencia del uso de antirretrovirales en los pacientes de estudio clasificados de acuerdo con su mecanismo de acción.....	58
Tabla 9. Secuencias consenso <i>Kaiso binding site</i> (KBS) y <i>CpG</i> metilados presentes en genoma del VIH-1 HXB2 y que son reconocidas por FT ZBTB.....	69
Tabla 10. Secuencias consenso dentro del genoma del VIH-1 HXB2 reconocidas por los FT ZBTB.	70
Tabla 11. Perfil de expresión de los genes <i>ZBTB</i> en los grupos VIH ⁺	84
Tabla 12. Correlaciones entre los niveles de expresión <i>ZBTB</i> y citocinas proinflamatorias	90



ABREVIATURAS

APC	Alofococianina	LSF-1	Del inglés: <i>Late SV40 Factor</i>
CD	Del inglés: <i>Cluster of Differentiation</i>	LT	Linfocitos T
BCL6	Del inglés: <i>B-Cell Lymphoma 6</i>	LT CD4⁺_E	Linfocitos T CD4 ⁺ efectores
BcoR	Correpresor de BCL6	LT CD4⁺_{MC}	Linfocitos T CD4 ⁺ de memoria central
BLAST	Del inglés: <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>	LT CD4⁺_N	Linfocitos T CD4 ⁺ naïve
CAPASITS	Centro Ambulatorio para la Prevención y Atención del SIDA e Infecciones de Transmisión Sexual	LTR	Del inglés: <i>Long Terminal Repeat</i>
CCR5	Del inglés: <i>C-C chemokine receptor type 5</i>	MCP-1	Del Inglés: <i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>
cDNA	Del inglés: <i>complementary DNA</i>	MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
CE	Controlador de Élite	Miz-1	Del inglés : <i>Myc interacting zinc finger protein 1</i>
CENSIDA	Centro Nacional para la Prevención y el Control del VIH y el SIDA	mRNA	RNA mensajero
CIENI	Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas	N-CoR	Correpresor del receptor nuclear
CXCR4	Del inglés: <i>C-X-C chemokine receptor type 4</i>	NF-kB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
DNA	Del inglés: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>	NFAT	Factor nuclear activado de células T
EDTA	Ácido etil diaminotetraacético	NK	Del inglés: <i>Natural Killer</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína	OMS	Organización Mundial de la Salud
FTs	Factores Transcripcionales	P-TEFb	Factor transcripcional de elongación positivo b
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	PBMCs	Células mononucleares de sangre periférica
GEO	Del inglés: <i>Gene Expression Omnibus</i>	PBS	Buffer fosfato-salino
HDAC	Deacetilasas de histonas	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
HIC1	Gen Hipermetilado en Cáncer 1	PCTx	Paciente Con Tratamiento
HLA	Del inglés: <i>Human Leukocyte Antigen</i>	PerCP	Peridinin clorofila
HMT	Histona metiltransferasas	PIC	Complejo de preintegración
IFN	Interferón	PLZF	Del inglés: <i>Promyelocytic leukemia zinc finger</i>
IL	Interleucina	PNTx	Paciente Naïve a Tratamiento
InIVIH	Instituto de Investigación en Inmunodeficiencias y VIH	RNA	Del inglés Ribonucleic Acid
INSTI	Inhibidores de Integrasa	RNAsa H	Ribonucleasa H
IP	Inhibidores de Proteasa	RP18S	Proteína ribosomal 18S
ITRAN	Inhibidores de la Transcriptasa Reversa Análogos Nucleósidos	RPL32	Proteína ribosomal L32
ITRNN	Inhibidores de la Transcriptasa Reversa Análogos No Nucleósidos	SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
ITS	Inductor de Transcritos Cortos	SIDRA	Del inglés: <i>Systems Immunology Toolkit</i>
JAK	Del inglés: <i>Janus kinase</i>	SMRT	Mediador silenciador para los receptores de ácido retinoico y de hormona tiroidea
KBS	Del inglés: <i>Kaiso Binding Site</i>	SNC	Sistema Nervioso Central
LRF	Factor Relacionado a Leucemia	SP	Proteína específica
		SSA	Secretaria de Salud
		ST2	Supresor de Tumorigenicidad 2
		STAT	Del inglés: <i>Signal transducer and activator of transcription</i>



TAE	Buffer Tris, acetato y EDTA	VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
TAR	Tratamiento Antirretroviral	VHB	Virus de la Hepatitis B
Tfh	Linfocitos T cooperadores foliculares	VHC	Virus de la Hepatitis C
Th	Células T <i>helper</i>	YY-1	Yin Yang-1
ThPOK	Del Inglés: <i>Th Inducing POZ-Kruppel Factor</i>	ZBTB	Del inglés: <i>Broad Complex, Tramtrack, Bric-a-Brac, and Zinc Finger</i>
TLR	Receptores Tipo Toll	ZF	Del inglés: <i>Zinc Finger</i>
TNF	Factor de necrosis tumoral		



RESUMEN

Introducción: En la infección por VIH, el virus integra su genoma al de la célula como DNA proviral, por lo que es sujeto a la regulación transcripcional. La acción de los represores transcripcionales favorece el silenciamiento génico y por ende la persistencia del VIH en su forma latente. La familia de genes *ZBTB* participan en el desarrollo y diferenciación de los linfocitos T CD4⁺, células diana y principales reservorios del VIH. El estudio de los factores celulares que intervienen en la regulación de estas células es fundamental, y de manera particular en los controladores de élite, los cuales representan una aproximación a la cura más cercana a la infección por VIH.

Objetivo general: Evaluar los niveles de expresión génica de la familia de represores transcripcionales *ZBTB* en linfocitos T CD4⁺ en la infección por VIH-1.

Métodos: Estudio transversal analítico. Se reclutaron 33 pacientes VIH⁺ mayores de 18 años, del sexo masculino y se agruparon en los siguientes grupos: 15 PNTx, 13 PCTx y 5 CE; así como 16 personas VIH⁻. A partir de sangre periférica se obtuvieron PBMCs y se aislaron linfocitos T CD4⁺ de donde se extrajo RNA total. Finalmente, se determinó la expresión relativa $-\Delta Cq$ y $2^{-\Delta\Delta Cq}$ por qPCR, utilizando primers específicos para los genes *ZBTB*. Adicionalmente, se cuantificaron los niveles de citocinas proinflamatorias séricas. El análisis estadístico se realizó con el software SPSS v.20.0 y GraphPad Prism 6, utilizando Kruskal-Wallis para la comparación entre grupos con corrección de Dunn.

Resultados: Se observaron mayores niveles de expresión de los genes *ZBTB4* ($p < 0.01$), *ZBTB7B* ($p < 0.001$) y *ZBTB38* ($p < 0.05$); y menores de *ZBTB16* ($p < 0.01$) en los sujetos VIH⁺ vs. los VIH⁻. Aunque los perfiles de expresión fueron heterogéneos, 6 de los 10 genes evaluados presentaron los mayores niveles en los CE (*ZBTB7A*, *ZBTB38*, *ZBTB2*, *HIC1*, *ZBTB7B* y *ZBTB4*), una elevación de estos genes podría sugerir su posible participación en la represión de la transcripción del VIH. Los genes *ZBTB7B* y *ZBTB17* se mostraron incrementados en los grupos VIH⁺ lo que sugiere podrían estar contribuyendo a la persistencia del reservorio viral. Finalmente, los CE y pacientes VIH⁺ con TAR tuvieron un incremento significativo de las citocinas proinflamatorias IL-1 β , IFN- γ , IL-23 e IL-33.

Conclusión: En la infección por VIH-1, se ven modificados los niveles de expresión de algunos miembros de la familia de genes *ZBTB*. El perfil de expresión de los genes evaluados en los diferentes grupos VIH⁺ es heterogéneo; sin embargo, el aumento en la expresión en los CE de 6 de los 10 genes evaluados sugiere un fenotipo celular transcripcionalmente represivo, que podría estar contribuyendo al silenciamiento génico tanto de la célula, así como del VIH y posiblemente, ser uno de los mecanismos por el cual estos pacientes controlan la replicación viral.



ABSTRACT

Introduction: During HIV infection, the virus integrates its genome into the host cell as an essential step in its replication cycle. As well as the cell genome, integrated HIV is also subject to transcriptional regulation. Transcriptional repressors promote gene silencing and consequently, HIV latent state and viral persistence. The *ZBTB* gene family is involved in the development and differentiation of the CD4⁺ T cells, who are the main targets and of HIV and its major HIV reservoirs. The study of the cellular factors involved in the regulation of these cells, is essential to have a deeper understanding of the molecular events that modulate the expression of HIV proviral DNA.

General objective: To evaluate the gene expression of the *ZBTB* family in CD4⁺ T cells in HIV-1 infection.

Methods: Cross-sectional study. 33 HIV⁺ male subjects over 18 years of age, were recruited and classified in the following groups: 15 PNTx; 13 PCTx y 5 EC, as well as 16 HIV⁻. A peripheral blood sample was drawn and PBMCs were obtained; subsequently CD4⁺ T cells were isolated and total RNA was extracted and cDNA was synthesized with oligo dT from them. Finally, the relative gene expression was determined by $-\Delta Cq$ y $2^{-\Delta\Delta Cq}$ qPCR method, using specific primers for the *ZBTB* gene family. Additionally, levels of proinflammatory cytokines in serum were quantified. Statistical analysis Kruskal-Wallis with Dunn test were performed with SPSS v.20.0 and GraphPad Prism 6 software.

Results: Higher expression levels of the *ZBTB4* ($p < 0.01$), *ZBTB7B* ($p < 0.001$) and *ZBTB38* ($p < 0.05$) genes were observed, and lower of *ZBTB16* ($p < 0.01$) in HIV⁺ vs. HIV⁻. Although, the expression profiles were heterogeneous, 6 of the 10 evaluated genes had the highest levels in EC group (*ZBTB38*, *ZBTB2*, *HIC1*, *ZBTB7B* and *ZBTB4* genes), an elevation of these genes could suggest their possible participation in the viral transcriptional repression. The *ZBTB7B* and *ZBTB17* genes showed an increase in HIV⁺ positive groups, this could suggest their possible role in the viral reservoir persistence. Finally, EC and ART- treated had a significant increase in the proinflammatory cytokines IL-1 β , IFN- γ , IL-23 and IL-33.

Conclusions: In HIV infection, the expression levels of some *ZBTB* gene repressor family members are modified. The profile of the genes evaluated in the CD4⁺ T cells of the HIV⁺ group of patients is heterogeneous. However, the increased expression in Elite controllers of 6 of the 10 genes evaluated suggests a transcriptionally repressive cellular phenotype, which could be contributing to gene silencing of both the host cell and HIV, and possibly, could be one of the mechanisms by which these patients control viral replication.



INTRODUCCIÓN



INTRODUCCIÓN

El VIH es un problema de salud pública a nivel mundial con 37.9 millones de personas que viven con la infección y cuya estimación anual de nuevas infecciones es de 1.8 millones. La prevalencia actual de VIH/SIDA en México es de 0.2-0.3%, cifra que equivale a 210,104 casos, ocupando Jalisco el 4^{to} lugar con mayor número de reportes en el país. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), el 62% de las personas diagnosticadas con el VIH reciben tratamiento antirretroviral (TAR), que lleva a la mejora de la calidad y esperanza de vida de quien lo recibe. A pesar de esto, el TAR no es una cura definitiva, ya que al dejar de administrarlo se presenta un repunte de la carga viral, que es atribuido a la reactivación de los reservorios virales que contienen al VIH transcripcionalmente inactivo (VIH latente), representando el principal obstáculo para erradicar el virus del organismo.

Los linfocitos T (LT) CD4⁺ son las células diana y principales reservorios del VIH. Al ser infectadas, el VIH integra su genoma en el de la célula, como un paso esencial en su ciclo de replicación; ya que necesita de la maquinaria transcripcional, así como de los factores transcripcionales celulares para poderse replicar. Por lo que, al igual que el genoma de la célula, el VIH integrado también está sujeto a la regulación transcripcional. Los represores transcripcionales favorecen el silenciamiento génico y como consecuencia la persistencia del VIH en su forma latente, estado que lo mantiene oculto de la acción inmune y del TAR.

En el ser humano se han descrito 1900 factores transcripcionales, de los cuales 49 son codificados por una familia de genes llamada *ZBTB*. Aunque sus funciones no han sido completamente dilucidadas, se ha demostrado que participan en el desarrollo, diferenciación y función del linaje linfoide, a donde pertenecen los LT CD4⁺. Este trabajo está enfocado en contribuir a una mejor comprensión de los eventos moleculares que modulan la expresión del DNA proviral del VIH, particularmente los genes de los represores transcripcionales *ZBTB*.



MARCO TEÓRICO

1. Infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH)

1.1 La pandemia del VIH

El Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) es el agente causal del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), que se caracteriza por generar una depleción progresiva de LT CD4⁺, que lleva una inmunodeficiencia profunda y a la presencia de enfermedades oportunistas. El SIDA fue reconocido como una nueva enfermedad en 1981 y su agente etiológico fue aislado en 1983 por el grupo de investigadores de Françoise Barré-Sinoussi y Luc Montagnier del Instituto Pasteur en París (Delgado, 2011).

El VIH es un virus de RNA que pertenece a la familia *Retroviridae*, subfamilia *Orthoretrovirinae*, género *Lentivirus* y se clasifica en dos especies: VIH-1 y VIH-2 con un 40-50% de homología genética, siendo el VIH-1 más virulento y el causante de la pandemia de SIDA (Delgado, 2011). El VIH-1 se ha clasificado en 4 grandes grupos según el grado de homología de sus secuencias, representando cada uno, la transmisión zoonótica independiente del Virus de Inmunodeficiencia Simiana a humanos (Sharp & Hahn, 2011): M (*Main* o principal), O (*Outlier* o externo), N (no-M, no-O) provenientes del chimpancé (*Pan troglodytes troglodytes*) y P (*Plantier*) procedente del gorila (*Gorilla gorilla gorilla*), (Plantier et al., 2009).

El grupo M es el responsable principal de la pandemia del SIDA (90% de las infecciones) y se ha dividido en 9 subtipos: A, B, C, D, F, G, H, J, K, siendo el subtipo B el que predomina en América y Europa (Delgado, 2011, Li et al., 2015)



1.1.1 Epidemiología

La infección por VIH, su diagnóstico y erradicación constituyen unos de los principales problemas de salud pública a nivel mundial. De acuerdo con la OMS, se estima que actualmente 37.9 millones de personas viven con la infección, de las cuales sólo el 62% reciben TAR (OMS, 2018). Según el Registro Nacional de Casos de SIDA realizado por la Secretaría de Salud en colaboración con el Centro Nacional para la Prevención y el Control del VIH y el SIDA (CENSIDA) y la Dirección General de Epidemiología, se han reportado 210,104 casos de VIH-SIDA en México; principalmente en CDMX, Edo. de México, Veracruz y Jalisco, ocupando este último el 4^{to} lugar con 6.6% del total de diagnósticos desde 1983-2019 (Fig. 1). Hasta el año 2017, la SSA atendió a 87,026 personas con diagnóstico de VIH-1, generándo un costo promedio anual por persona de 44,997 pesos, lo que representa un impacto en la economía nacional. Debido a esto, es necesario intensificar acciones como la detección oportuna y la atención integral al paciente, sin dejar de lado la investigación que lleve a encontrar una cura funcional o eliminación definitiva del VIH (CENSIDA, 2019).



Figura 1. Epidemiología del VIH-1 en México. Principales estados de México donde se concentra la mayor prevalencia de personas que viven con el VIH-1. Se enlista de manera decreciente según el número casos acumulados (1983-2019): CDMX, Edo. de México, Veracruz y Jalisco los cuales suman 47.4% de los casos totales. Tomado del reporte de CENSIDA, 2019.



1.2 Patogénesis del VIH

1.2.1 Vías de transmisión

Las principales vías de transmisión del VIH son:

- *Sexual (95.1%)*: principal mecanismo de transmisión a nivel mundial.
- *Fluidos corporales (2.9%)*: como sangre, semen, secreciones vaginales, líquido cefalorraquídeo y leche materna.
- *Vertical o perinatal (2%)*: transmisión del VIH de madre a hijo que puede ocurrir durante el embarazo, el parto o la lactancia (Altfeld et al., 2015)

1.2.2 Curso natural de la infección

La infección por el VIH-1 es con frecuencia diagnosticada muchos años después de adquirida la infección, ya que el síndrome retroviral agudo (primera manifestación), se caracteriza por ser autolimitado y presentar síntomas inespecíficos (fiebre, dolor de cabeza, diarrea, entre otros) con una duración no mayor a 4 semanas, lo que hace que pueda pasar inadvertido (Hoffmann-Rockstroh, 2015). Posteriormente, se presenta la fase aguda, con una duración de 4 a 12 semanas, en donde hay una rápida replicación viral como consecuencia de la activación y proliferación inmunológica. Es durante esta fase, que se producen procesos patogénicos importantes como el establecimiento de reservorios celulares (LT CD4⁺ principalmente, monocitos, macrófagos, células dendríticas) y tisulares (Sistema Nervioso Central y tracto genitourinario) (Whitney et al., 2014). Simultáneamente a la diseminación viral y a medida que avanza el tiempo de la infección, comienza la disminución progresiva de LT CD4⁺ periféricos, así como una sustancial depleción de los LT CD4⁺ de memoria (LT CD4⁺_M) (Le Saout, Lane, & Catalfamo, 2012).

La fase crónica, se presenta asintomática y dura en promedio de 8-10 años. Los niveles de viremia en plasma se reducen a menos del 1% de su valor máximo alcanzado, lo que indica que el huésped es capaz de generar una respuesta inmune que puede controlar la replicación



viral parcialmente; sin embargo, la depleción de LT CD4⁺ continúa, llevando al desarrollo del SIDA. En esta fase, se incrementa nuevamente la replicación viral y hay una disminución de los LT CD4⁺ por debajo de 200 cel/ μ L, presentándose enfermedades oportunistas que pueden llevar a la muerte en poco tiempo (Fig. 2) (An & Winkler, 2010; Michaela, 2013).

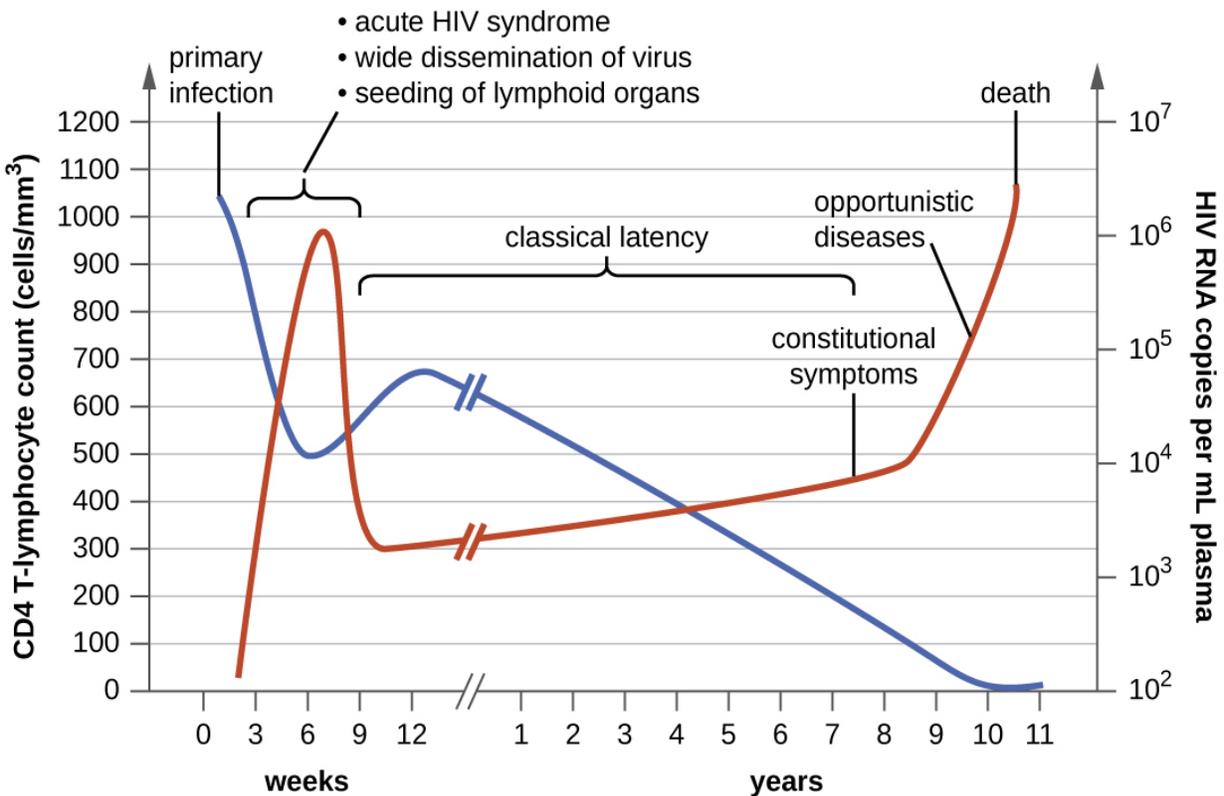


Figura 2. Historia natural de la infección por VIH-1. Se muestra la cinética de los diferentes marcadores en la progresión de la infección. Durante la fase aguda, la carga viral aumenta rápidamente debido a la activación inmunológica (línea roja), como consecuencia y de manera simultánea disminuyen los LT CD4⁺ (línea azul), en esta fase se establecen los primeros reservorios virales. En la fase crónica, el sistema inmune controla parcialmente la replicación viral y hay un aumento de LT CD4⁺ (línea azul), así como la generación de anticuerpos contra el VIH-1. Esta condición puede permanecer durante años, hasta que finalmente, el sistema inmune es incapaz de controlar la infección llevando a la fase del SIDA, caracterizada por altas cargas virales y una marcada disminución de los LT CD4⁺ (<200 cel/ μ L) (Kogan & Rappaport, 2011).



1.2.3 Clasificación de los pacientes según su respuesta a la infección por VIH-1

Las personas que viven con el VIH-1, pueden cursar la infección de forma distinta. De acuerdo con su comportamiento ante la infección se clasifican en:

- *Progresores rápidos*: no controlan la viremia en ausencia de TAR y desarrollan el SIDA dentro de los 3 primeros años de la infección.
- *Progresores crónicos*: representan el 80% de las personas VIH-1 positivas, no controlan la viremia en ausencia de TAR y desarrollan el SIDA dentro de 8 a 10 años después de la infección.
- *No progresores a largo plazo o progresores lentos*: representan del 1-5%, mantienen niveles de LT CD4⁺ estables y cargas virales bajas por tiempos prolongados (> 8 años), sin embargo, esta condición no es permanente, ya que hay una replicación viral lenta pero constante durante este periodo (Madec et al., 2009).
- *Controladores*: controlan la viremia espontáneamente en ausencia de TAR, tienen conteos relativamente estables de LT CD4⁺ por un tiempo prolongado. Con base en el nivel de carga viral estos pueden ser:
 - *Controladores virémicos*: tienen niveles entre 51-2000 copias del RNA del VIH-1/mL de plasma y presentan una depleción lenta de LT CD4⁺.
 - *Controladores de Élite (CE)*: representan menos del 1%, mantienen niveles indetectables del VIH-1 (< 50 copias/mL; en promedio 2 copias/mL). Debido al control excepcional de la viremia, estos son considerados posibles modelos naturales para investigar la cura funcional del VIH o el desarrollo de vacunas (Pereyra et al., 2013).

1.2.3.1 Controladores de Élite (CE)

Los controladores de élite (CE) son un grupo demográficamente heterogéneo, con una diversidad tanto racial, como de vías de transmisión, y aunque se ha observado una mayor prevalencia en mujeres (49%) que en hombres (46%) y en raza negra (62%) con respecto a la raza blanca (32%) los pocos estudios realizados, debido a la baja prevalencia de este grupo, no son definitorios (Okulicz & Lambotte, 2011). Los mecanismos por los que los CE controlan espontáneamente la replicación del VIH-1 no han sido completamente dilucidados, ya que el



control viral es un fenómeno complejo que combina tanto factores virales como factores intrínsecos de la célula hospedera.

Estos son algunos mecanismos propuestos:

- **Baja susceptibilidad de células blanco del VIH**
 - Células con la mutación CCR5-Δ32 (heterocigotos) lleva a una reducción de la entrada viral a la célula y una progresión más lenta de la infección.
 - La presencia de polimorfismos de un solo nucleótido en genes de la familia de *HLA* que modifica la interacción con el VIH, considerándose HLA protectores están el HLA-B*57 (más prevalente en CE 44-85%) y B*27 (Gaardbo, Hartling, Gerstoft, & Nielsen, 2012)
- **Inmunidad celular más eficiente**
 - Mejor reconocimiento de LT CD4⁺ infectados activados y en reposo por los LT CD8⁺ llevando a la degranulación y producción de citocinas para eliminar a la célula infectada (Monel et al., 2019).
 - LT CD8⁺ específicos contra Gag y polifuncionales, con una fuerte actividad antiviral al secretar una mayor cantidad de citocinas inflamatorias y quimiocinas (TNF-α, MIP-1β, perforinas y granzima B) (Gonzalo-gil, Ikediobi, & Sutton, 2017).
 - Mayor preservación de células T CD4⁺ de memoria central (LT CD4⁺_{MC}) y mantenimiento de la capacidad de producción de IL-2 e IL-7 (Okulicz & Lambotte, 2011).
- **Modificaciones epigenéticas.**
 - Un mayor grado de metilación en la región 5´LTR del DNA proviral en los controladores de élite restringe la transcripción del VIH y genera una resistencia mayor a la reactivación de las células infectadas latentemente, favoreciendo el control de la viremia en estos pacientes (Blazkova et al., 2009).



2. Generalidades del VIH

2.1 Estructura y genoma del VIH-1

La partícula viral del VIH-1 tiene forma esférica y mide 100-120 nm de diámetro. Consta de una bicapa lipídica de origen celular que contiene proteínas de la célula hospedera (CD44) y glicoproteínas virales como gp41 transmembranal y gp120 de la superficie. Internamente, está compuesta por las proteínas: p24 de la cápside, p7 de la nucleocápside que envuelve al genoma viral y de las enzimas transcriptasa reversa, integrasa y proteasa (Fig. 3), (Delgado, 2011). El genoma viral está formado por dos copias de RNA de cadena sencilla de 9.8Kb de longitud, contiene tres genes principales (*gag*, *pol*, *env*), dos genes reguladores (*tat*, *rev*) y cuatro genes accesorios (*nef*, *vif*, *vpu* y *vpr*), que se encuentran flanqueados por las regiones repetidas largas (del inglés: *Long Terminal Repeat* o LTR) (Delgado, 2011; Hope, 2000).

Genes principales: *gag*, *pol*, *env*

Los genes principales codifican a la mayoría de las proteínas estructurales Gag, Pol y Env. La proteína Gag se traduce inicialmente en grandes como un precursor llamado p55 cantidades (20 moléculas de Gag por cada Gag-Pol), el cual, por medio de cortes proteolíticos en el proceso de maduración, da origen a las proteínas de matriz (p17), de la cápside (p24) y nucleocápside (p9). Por un cambio en el marco de lectura, se transcribe y traduce el precursor Gag-Pol (p160); la poliproteína Gag, así como en su forma de Gag-Pol permite que estas proteínas se dirijan al sitio de ensamblaje del virión. También como parte de la maduración viral, se realiza un corte proteolítico que separa a Pol de Gag; la escisión de la proteína Gag continúa como ya se mencionó previamente, mientras que la escisión de Pol da origen a proteasa (p15), la retrotranscriptasa (p51) y la integrasa (p31). Por su parte, el gen *env* traduce la proteína gp160, la cual es escindida en las glicoproteínas de membrana gp41 y gp120; estas proteínas se transportan a la superficie de la célula en donde permanecen hasta la gemación viral, proceso en el que la partícula viral toma parte de la membrana celular del hospedero llevándose consigo estas glicoproteínas, que servirán como proteínas de anclaje para infectar nuevas células (Delgado, 2011; Hope, 2000).



Genes reguladores: *tat* y *rev*

El gen *tat*, codifica para la proteína transactivadora de la transcripción Tat, que es esencial para la replicación viral, ya que se une a una estructura en forma de horquilla, denominada elemento de respuesta a la transactivación; la unión de Tat activa la transcripción al menos 1000 veces. Por su parte, la proteína Rev facilita el transporte del mRNA del núcleo hacia el citoplasma (Delgado, 2011; Hope, 2000).

Genes accesorios: *vpr*, *vpu*, *nef*, *vif*

Las proteínas accesorias, no son necesarias para la replicación *in vitro*, pero representan factores de virulencia críticos *in vivo*. La proteína Vpr facilita la localización nuclear del complejo de preintegración (PIC). También se ha demostrado que bloquea la división celular en la fase G2. Nef, es la primera proteína viral que se acumula hasta niveles detectables después de la infección por el VIH-1. Su actividad se ha asociado a la regulación negativa de la expresión de CD4 en la superficie celular, aumentando la tasa de endocitosis y degradación lisosómica de CD4. También disminuye la expresión del MHC clase I aunque en menor grado, llevando a un ineficiente reconocimiento de las células infectadas por las células T citotóxicas (Hope, 2000). La proteína Vif, es esencial para la replicación del VIH en linfocitos y macrófagos, pero no es necesaria en otras células, sugiriendo que estas células pueden expresar alguna proteína que complementa la función de Vif. Su principal función consiste en interrumpir y llevar a la degradación proteosomal a la enzima antiviral APOBEC3G, la cual edita el DNA viral, generando una hipermutación e inactivación del VIH (Hope, 2000; Stopak, De Noronha, Yonemoto, & Greene, 2003).

Regiones *Long Terminal Repeat* (LTR)

Las regiones LTR, actúan como reguladoras y han sido implicadas en la integración del genoma viral al DNA de la célula hospedera (Delgado, 2011; Hope, 2000). Cada LTR se divide en 3 regiones diferentes (Fig. 4): una región no traducida 3 (U3), una repetida (R) y una región no traducida 5 (U5). En estas regiones se encuentran diversos sitios de unión a factores transcripcionales que regulan la expresión del VIH (Cary, Fujinaga, & Peterlin, 2016).

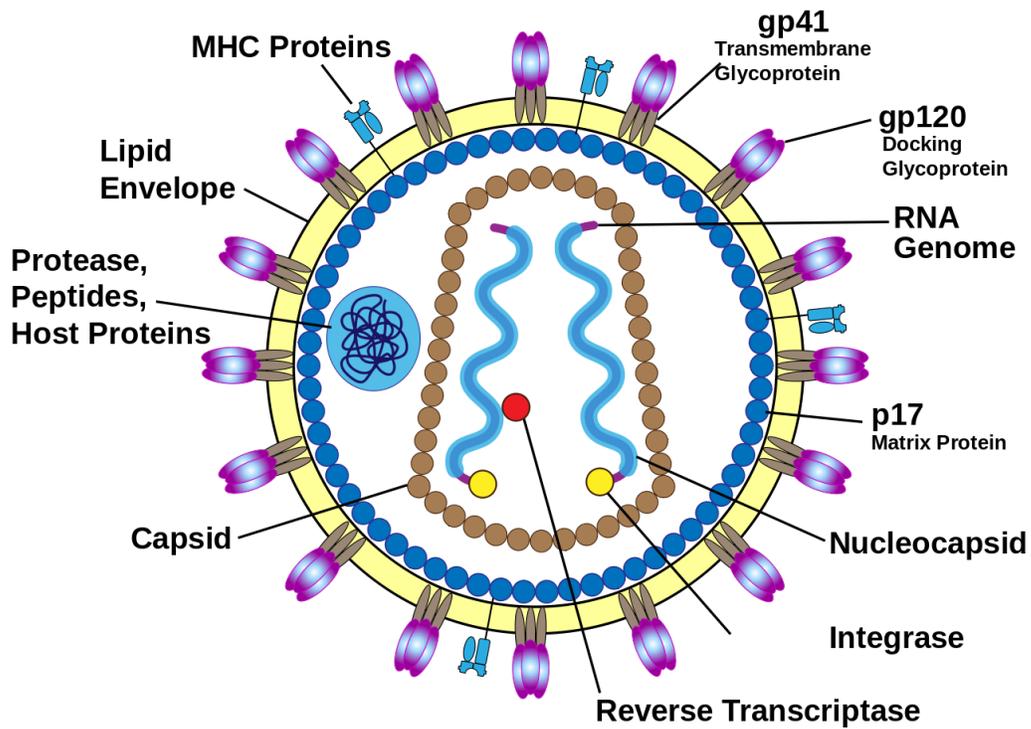


Figura 3. Estructura del VIH-1. Morfología y organización de una partícula viral madura del VIH-1. Estructura cónica (cápside) formada por la p24 que delimita a las dos copias de RNA de cadena sencilla y enzimas (retrotranscriptasa, integrasa, proteasa), la proteína de matriz p17 y finalmente, la membrana lipídica en donde se encuentran proteínas de envoltura gp120 y gp41, además de otras proteínas adquiridas de la célula tras la liberación del virión. Tomado de Baltimore group.

I-5 Genome maps

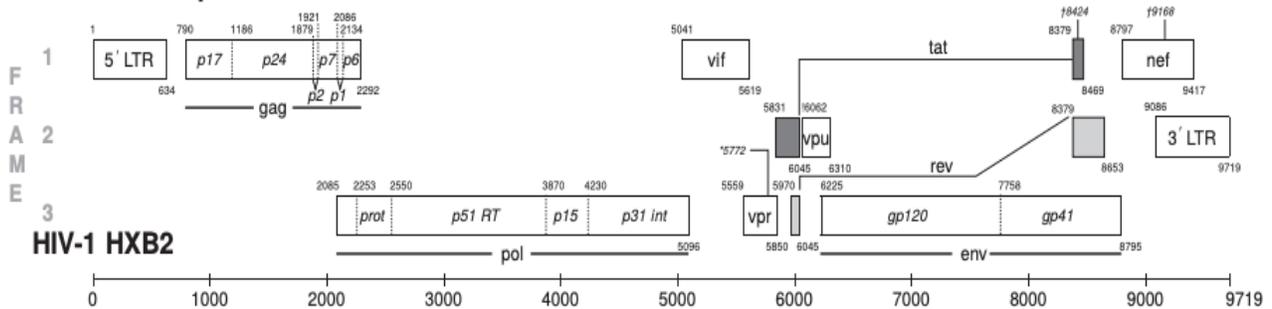


Figura 4. Organización del genoma del VIH-1. El genoma del VIH-1 mide 9.8Kb y está compuesto por 3 genes principales: *gag*, *pol* y *env*; 2 genes reguladores: *tat* y *rev* y 4 genes accesorios: *nef*, *vif*, *vpu* y *vpr* que codifican para las diferentes proteínas que favorecen la infectividad del nuevo virión. Además, cuenta con 2 regiones LTR idénticas que flanquean y regulan el genoma del virus. Tomado de HIV Sequence Compendium.



2.2 Ciclo biológico del VIH-1

2.2.1 Pasos de entrada a la integración del VIH

La entrada del VIH en las células diana se produce mediante la interacción secuencial con dos receptores celulares: el receptor CD4 y los receptores de quimiocinas CCR5 (en las primeras fases de la infección) y CXCR4 (en fases avanzadas, este cambio en el correceptor es denominado cambio de tropismo). La interacción inicial se produce entre la región V2 de la glicoproteína gp120 y el CD4 que induce cambios conformacionales que exponen la región V3 y regiones adyacentes, formando el dominio de unión de la gp120 a los correceptores CCR5/CXCR4 (Wen, Chen, Cao, Zhu, & Yamamoto, 2005). En una segunda interacción, se inducen nuevos cambios en la estructura de la gp41 que expone en la región N-terminal, un dominio altamente hidrofóbico que se ancla en la membrana plasmática realizando un plegamiento, para permitir la aproximación y fusión de las membranas viral y celular; así se produce la internalización de la nucleocápside, decapsidación y liberación del genoma vírico. (Fig. 5: paso 1) (Alcamí & Coiras, 2011).

La retrotranscripción, es decir, la síntesis de DNA a partir del RNA viral es realizada por la transcriptasa reversa en el citoplasma. Una vez sintetizado, el DNA del VIH se acopla a una serie de factores celulares y virales formando el PIC, que se transloca al núcleo y por medio de la integrasa, el genoma viral es insertado en el genoma de la célula hospedera, constituyendo la forma proviral del VIH (Fig. 5:paso 2 y 3) (Alcamí & Coiras, 2011). Esta integración se realiza preferentemente cerca de genes transcripcionalmente activos proporcionando las condiciones para una transcripción viral continua (Liszewski, Yu, & Doherty, 2009).



2.2.1.1 Expresión génica

2.2.1.1.1 Transcripción del VIH

La transcripción del VIH-1 ocurre en dos fases: una fase temprana independiente de Tat en donde, por medio de *splicing* se producen solo mRNAs cortos que codifican para las proteínas reguladoras Tat y Rev (Fig. 5: paso 4). A medida que la infección sigue, la transcripción continúa en una segunda fase dependiente de Tat, en la que se generan mRNAs que serán traducidas en las proteínas Env, Vif, Vpr y Vpu; también en esta fase más tardíamente, se sintetizan transcritos de longitud completa que funcionan como RNA genómico del virión y el mRNA de la poliproteína Gag-Pol. (Karn, J. and Stoltzfus, CM., 2012).

2.2.1.2 Exportación nuclear, ensamblaje y liberación

El transporte fuera del núcleo de los mRNAs es regulados por Rev, al igual que su acoplamiento a los ribosomas que sintetizan las proteínas virales. Estas proteínas maduran por acción de Vif, Vpu y de la proteasa viral, posteriormente se ensamblan en lo que constituirán las partículas virales maduras (Fig. 5: paso 5) (Alcamí & Coiras, 2011; Engelman & Cherepanov, 2012). El ensamblaje correcto de las proteínas virales y la maduración del virión se produce tras el proceso de gemación mediante la acción de la proteasa viral, que realiza cortes proteolíticos sobre las proteínas Gag y Gag-Pol, así como Env. Terminada la gemación, los viriones son liberados al espacio extracelular por la acción de Vpu que inhibe a la teterina (factor de restricción celular) (Fig. 5: paso 6) (Alcamí & Coiras, 2011).

2.3 Tratamiento Antirretroviral (TAR)

Con base a los diferentes pasos del ciclo biológico del VIH se diseñaron medicamentos antirretrovirales cuyo objetivo es reducir los niveles de carga viral, que a su vez lleva a una reconstitución de los niveles de LT CD4⁺. La introducción del TAR ha disminuido notablemente la tasa de mortalidad por el SIDA y mejorado la calidad de vida de las personas que viven con el VIH, a la vez que disminuye el riesgo de transmisión y diseminación de la infección (Deeks,



Overbaugh, Phillips, & Buchbinder, 2015)

Actualmente existen 5 clases de medicamentos utilizados como esquema de tratamiento, los cuales se clasifican de acuerdo a la fase del ciclo biológico del VIH sobre el que actúan (Fig. 5) (Kemnic & Gulick, 2019):

- *Inhibidores de entrada (2 tipos)*
 - Inhibidores de fusión: No permiten la unión, fusión y entrada del VIH a la célula diana, al bloquear las proteínas de envoltura gp120 y gp41
 - Antagonistas de CCR5: bloquea el correceptor y previene la unión de gp41

- *Inhibidores de la Transcriptasa Reversa Análogos de Nucleósidos (ITRAN):* Presentan similitud estructural con los 2'- desoxinucleósidos naturales, sin embargo, carecen del grupo 3'-OH y, por tanto, inhiben competitivamente la formación del DNA proviral terminando la cadena prematuramente.

- *Inhibidores de la Transcriptasa Reversa Análogos No Nucleósidos (ITRNN):* Se unen directamente a la transcriptasa reversa, cerca del sitio catalítico e inhiben el movimiento de dominios necesarios para la síntesis de DNA.

- *Inhibidores de Integrasa (INSTI):* Previene la integración del genoma del VIH en el genoma del hospedero.

- *Inhibidores de Proteasa (IP):* Se unen al sitio activo de la proteasa y evitan el corte proteolítico de los precursores proteicos Gag y Gag-Pol, proceso necesario para formar las partículas virales maduras e infectivas.

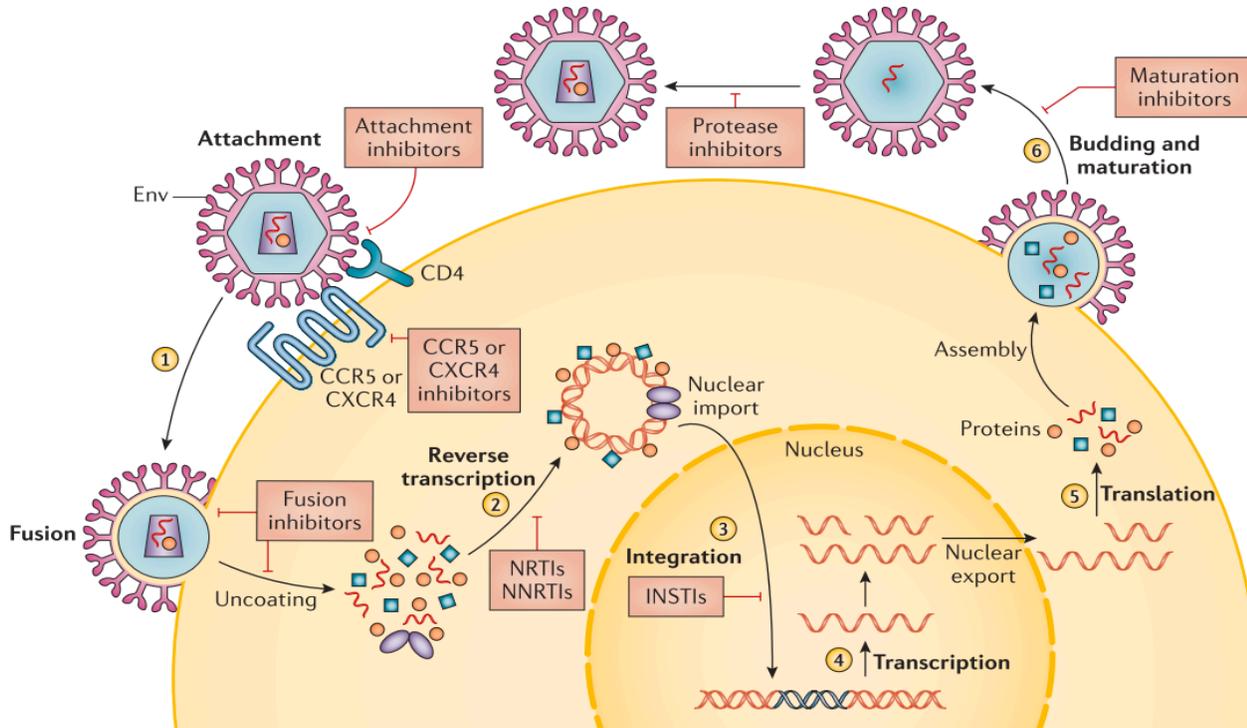


Figura 5. Ciclo biológico del VIH-1/ Mecanismos de acción del TAR. Las etapas por las que pasa el virus para infectar a la célula hospedera, replicarse y liberar nuevos viriones se pueden resumir en: entrada, retrotranscripción, integración, transcripción, transporte del mRNA, traducción, ensamblaje y gemación. Mecanismos de acción de los diferentes antirretrovirales que actúan en las diferentes fases del ciclo viral (Deeks et al., 2015).

2.4 Regulación transcripcional del VIH

Un paso crítico en el ciclo de replicación del VIH es la regulación transcripcional del provirus integrado, ya que una transcripción eficiente asegura que se produzcan suficiente mRNA y RNA genómico para el ensamblaje del virus. La transcripción proviral del VIH está regulada en múltiples niveles, incluido el inicio de la transcripción, el reclutamiento de la polimerasa, la elongación y la organización de la cromatina (Schiralli Lester & Henderson, 2012).



2.4.1 Factores transcripcionales y la región LTR

El elemento regulador transcripcional predominante del VIH es la región 5´LTR, aunque la transcripción por 3´LTR puede activarse por la inactivación del promotor 5´LTR (Klaver & Berkhout, 1994). El LTR recluta una gran cantidad de factores de transcripción del hospedero que funcionan como activadores, represores o proteínas adaptadoras. Diversos factores transcripcionales inducibles, se han identificado en las células T que activan la transcripción del VIH. El factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF-κB) representa el principal activador de la transcripción del VIH, y aunque solo cuenta con dos sitios de unión en su genoma, la unión de NF-κB en uno solo de ellos es suficiente para realizar su función estimuladora (Fig.6). Se han identificado sitios en donde se unen otros factores con función activadora, como el Factor nuclear activado de células T (NFAT), la proteína específica 1 (SP1) (Cary et al., 2016), además de las proteínas activadoras (AP), que se unen a los sitios del LTR AP-1 y AP-3 y potencian la actividad transcripcional (Colin et al., 2011)

Adicionalmente, han sido reportados algunos factores transcripcionales como el *Late SV40 Factor* (LSF-1), Yin Yang 1 (YY-1) y FBI-1 (ZBTB7A) que tienen sitios de unión en el genoma del VIH y reprimen su transcripción (Schiralli Lester & Henderson, 2012). Este último, es miembro de la familia ZBTB y se une a la región del LTR (-5 y +26) denominada inductor de transcritos cortos (IST), que lleva a la finalización prematura de la transcripción en la posición +59, generando transcritos cortos del VIH (Sheldon, Ratnasabapathy, & Hernandez, 1993). También se ha descrito de manera *in vitro*, que el FT BCL6 se une en las posiciones (350-384) en el LTR y lleva a una represión transcripcional por compactación de la cromatina (Baron et al., 1997). (Fig. 6).

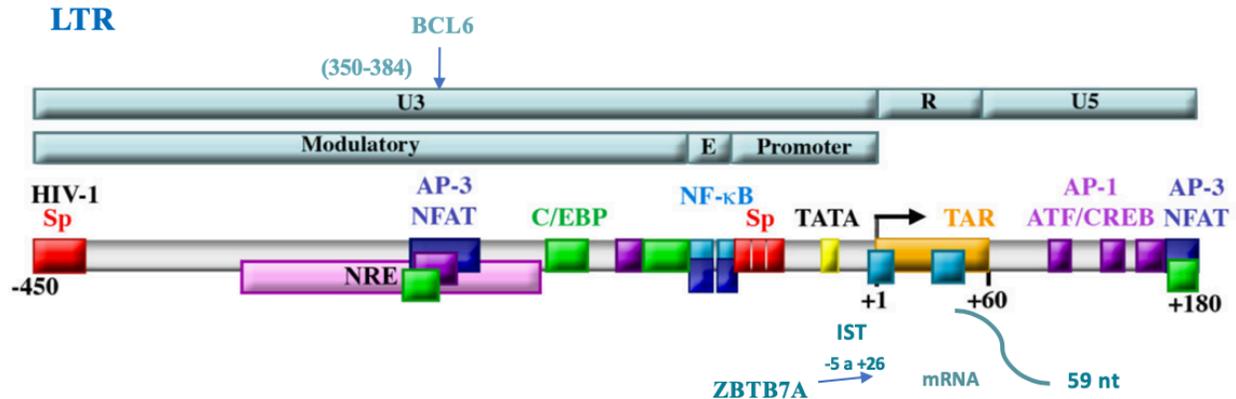


Figura 6. Estructura del LTR del VIH-1. El LTR está dividido en 3 regiones: U3, R y U5. La región U3 se divide a su vez en el núcleo del promotor, una región potenciadora y una región reguladora (derecha a izquierda). El LTR contiene sitios de unión a diferentes proteínas que regulan la transcripción del VIH-1. Activadores: NFAT, NF- κ B, SP-1, AP-1 y AP-3. Represores: ZBTB7A y BCL6. Modificado de Kilaeski et al., 2009. LTR: Long Terminal Repeat; NFAT: Factor Nuclear de Células T; NF- κ B: Factor Nuclear potenciador de cadenas ligeras kappa de las células B activadas; Sp: Proteína específica; AP-1 y 3: Proteína Activadora 1 y 3; BCL6: proteína 6 del linfoma de células B.

2.4.2 Regulación epigenética de la transcripción del VIH-1

Una de las funciones de los factores transcripcionales es reclutar complejos que modifican la organización de la cromatina; así es como, los activadores como NF- κ B y NFAT reclutan acetiltransferasas (HAT) que llevan a una conformación relajada de la cromatina, permitiendo un DNA accesible para la transcripción. Por otro lado, los represores transcripcionales como YY1 y ZBTB7A reclutan complejos que contienen deacetilasas de histonas (HDAC) que eliminan los grupos acetilo de las lisinas en las histonas y favorecen la compactación de la cromatina, lo cual está asociada al silenciamiento génico (Schiralli Lester & Henderson, 2012). Esta regulación epigenética juega un papel muy importante en la transcripción del VIH, ya que su región LTR está flanqueada por 2 nucleosomas: nuc-0 en 5' y nuc-1 que se yuxtapone al sitio de inicio de la transcripción (Fig. 7). La inducción de la transcripción correlaciona con la acetilación de histonas y el desplazamiento de nuc-1. Mientras que, la presencia de altos niveles de deacetilasas de histonas (HDAC) y metiltransferasas (HMT) con capacidad de metilar histonas y DNA, contribuyen a una estructura condensada de la cromatina que impide



la procesividad de la RNAPol II y la elongación (Cary et al., 2016; Schiralli Lester & Henderson, 2012).

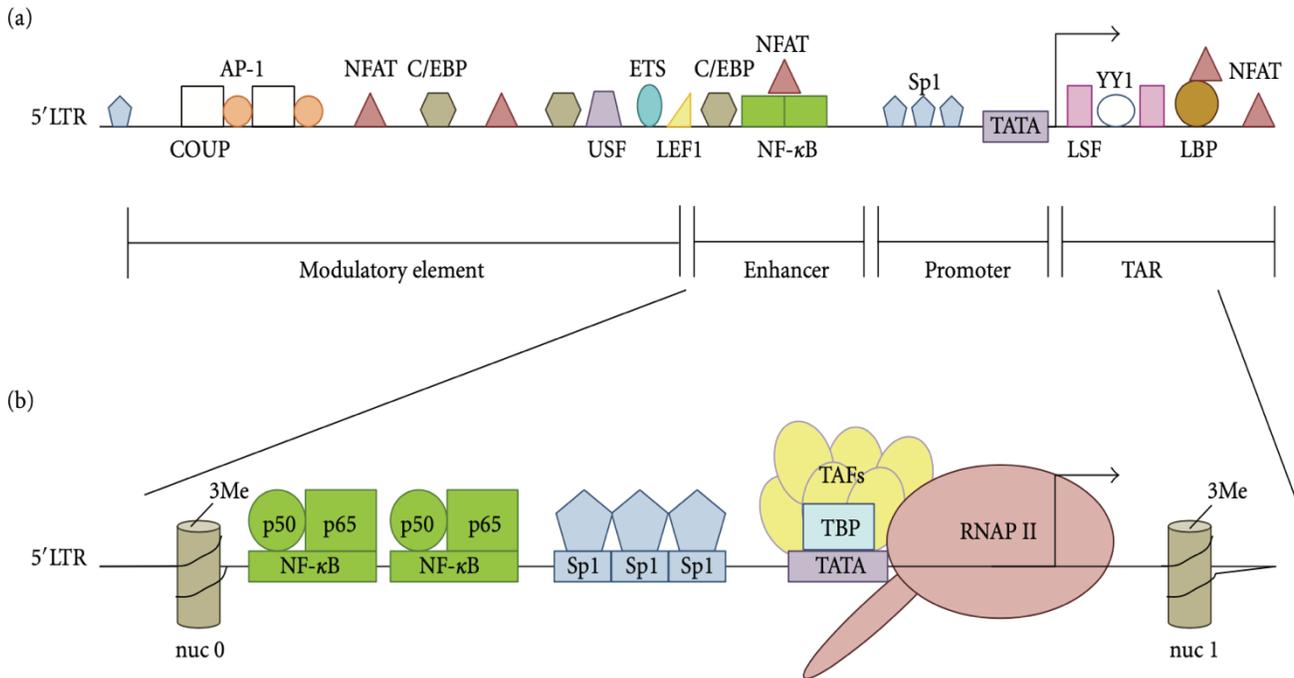


Figura 7. Organización de la región LTR del VIH-1 en los nucleosomas. a) Representación de la organización del LTR en los nucleosomas nuc-0 y nuc-1. b) En la región comprendida entre estos dos nucleosomas, se reclutan diferentes factores transcripcionales que activan (NF-κB, NFAT o SP1) o reprimen la transcripción (YY1 y ZBTB7A), (Schiralli Lester & Henderson, 2012).

2.4.3 Interferencia de la transcripción

El VIH se integra en genes preferencialmente activos, y los promotores de estos genes pueden interferir con el LTR del VIH. La interferencia transcripcional se define como la supresión de una unidad de transcripción por un elemento vecino. Los mecanismos sugeridos que conducen a la interferencia de la transcripción del VIH incluyen a los promotores adyacentes que compiten o desplazan a los componentes del PIC que se unen a la región LTR. Bajo este contexto los factores transcripcionales asociados con el remodelamiento de la cromatina tienen un impacto en el control de la replicación del VIH, por lo que, este es un campo que se encuentra en investigación activa. La comprensión actual de cómo la actividad proviral está epigenéticamente regulada, se basa en análisis de modelos de infección celular por VIH-1, debido a la falta de marcadores moleculares para distinguir las células latentemente infectadas,



lo que impide el análisis de mecanismo de mecanismos reguladores *in vivo* o en materiales derivados de pacientes (Lange, Verdikt, Ait-Ammar, & Van Lint, 2020; Schiralli Lester & Henderson, 2012). Algunos estudios relacionados a factores transcripcionales represores que reclutan correpresores e inducen el silenciamiento génico, como el observado con homodímero p50-p50 que recluta a la HDAC1 y establece un ambiente de compactación de la cromatina del promotor viral (Turner & Margolis, 2017; Williams & Greene, 2005).

2.4.4 Interferencia en la elongación

La regulación de la elongación es un punto de control crítico, que depende de la coordinación de la actividad de la RNA Pol II y la estructura de la cromatina. Se ha descrito que la elongación y la remodelación de la cromatina pueden ser procesos acoplados (Schiralli Lester & Henderson, 2012). Una de las proteínas virales que regula esta fase, es la proteína Tat que actúa como un regulador positivo, estimulando la etapa de elongación. Tat se une a la horquilla formada por el elemento de respuesta a la transactivación por Tat situado en el LTR, formando un complejo Tat-TAR que posteriormente se une e incrementa la permanencia de P-TEFb, el cual media la fosforilación en serina 2 del CTD de la Pol II y la fosforilación de Spt5, factor que evita la liberación prematura de la RNA Pol II. Sin la presencia de Tat, la elongación es naturalmente pausada por la unión de 2 factores: el factor de elongación negativa (NELF) y el inductor de sensibilidad a DRB, esta obstrucción resulta en la producción de transcritos cortos de 60 nt. La fosforilación de NELF por P-TEFb y la acción de la liberación del promotor por TFIIH/CDK7 remueve estos inhibidores y cuando se combina con los efectos positivos de la RNA Pol II y Spt5 fosforilada, se favorece una elongación de alto nivel sin obstáculos (Karn, J. and Stoltzfus, CM., 2012; Mbonye & Karn, 2017). A su vez, la producción de Tat también está regulada por los activadores y/o represores transcripcionales; de este modo, si la transcripción de Tat no es eficiente favorecerá un estado de latencia viral (Schiralli Lester & Henderson, 2012).



3. El VIH y sus principales células diana: Linfocitos T CD4⁺

3.1 Linfocitos T CD4⁺

Los linfocitos T CD4⁺ son las principales células diana del VIH. Estas células regulan la respuesta inmune protectora y la memoria inmunológica de larga duración; es decir, dan las señales que requieren los LT CD8⁺ para realizar su actividad citotóxica durante la primoinfección y a los linfocitos B para la producción de anticuerpos. Además, producen citocinas que potencian la respuesta efectora de las principales células de la inmunidad innata como los macrófagos, células *natural killer* (NK), células dendríticas y neutrófilos (Montoya Guarín, Moreno Fernandez, & Rugeles López, 2006).

Los LT CD4⁺ son considerados una población heterogénea con diversos fenotipos, función y distribución anatómica. Basado en su función efectora, condicionada por citocinas del microambiente los LT CD4⁺ pueden clasificarse en Th1, Th2, Th17, T reguladoras y Tfh principalmente (Zhu & Paul, 2008).

Linfocitos Th1. Se caracterizan por generar la respuesta inmune contra microorganismos intracelulares. Su diferenciación se realiza en presencia de IL-12 e IFN- γ . IL-12 es secretada por las células presentadoras de antígenos después de ser activadas y estimula a que las células NK secreten IFN- γ . El regulador maestro para su diferenciación es el factor de transcripción T-bet, el cual reprime el gen de la IL-4, citocina determinante para la diferenciación hacia Th2 (Luckheeram, Zhou, Verma, & Xia, 2012)

Linfocitos Th2. Poseen funciones de defensa contra parásitos extracelulares y están relacionadas con procesos de alergia y asma. Su diferenciación está mediada por la citocina IL-4 y el factor transcripcional GATA3. Sus citocinas producidas son IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13 e IL-25. La IL-4 realiza una retroalimentación positiva que induce mayor diferenciación de esta subpoblación; mientras que IL-5 es quimiotáctica para eosinófilos; IL-9 se encarga de la producción de mucina en células epiteliales, siendo IL-5 e IL-9 esenciales en la respuesta alérgica. IL-10 suprime la proliferación de Th1 así como la funcionalidad de las células dendríticas; IL-25 se encarga de estimular la producción de la respuesta Th2; IL-4, IL-5 e IL-



13, pueden inducir la producción de otras citocinas, como el ligando de CCR5, RANTES (Zhu & Paul, 2008).

Linfocitos Th17. Está subpoblación, media la respuesta en procesos autoinmunes y defensa contra patógenos como bacterias extracelulares y hongos. Su diferenciación está dada por TGF- β , IL-6, IL-21 e IL-23. Su regulador maestro, es el factor transcripcional ROR γ t. Las citocinas que produce son IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22. IL-21 induce proliferación de linfocitos CD8, B y NK, así como de células dendríticas; IL-17A e IL-17F son similares estructural y funcionalmente. En particular, IL-17A tiene la capacidad de inducir citocinas proinflamatorias como IL-6 que junto con IL-23 inducen la producción de IL-22. (Zhu & Paul, 2008).

Linfocitos T reguladores. Las T reguladoras inducidas o iTreg, están involucradas en procesos de tolerancia inmunológica y la homeostasis de linfocitos. Su diferenciación se da en presencia del Factor de Crecimiento Transformante β (TGF- β) e IL-2 y ausencia de citocinas proinflamatorias. Secretan preferencialmente TGF- β , e IL-10 que tienen efectos antiinflamatorios y reguladores de la respuesta inmune (Zhu & Paul, 2008).

Linfocitos T foliculares (Tfh). Están localizadas en las áreas foliculares de órganos linfáticos secundarios, y participan en el desarrollo de la inmunidad antígeno-específica de los linfocitos B. IL-6 e IL-21 son necesarias para su diferenciación, así como el factor transcripcional BCL6 (Luckheeram et al., 2012).

3.2 Modelo de infección por el VIH en los LT CD4⁺

Tras la invasión patogénica, los LT CD4⁺ naïve (LT CD4⁺_N) se activan después de la presentación antigénica realizada por las células presentadoras de antígenos. Después de la estimulación, los LT CD4⁺_N experimentan una expansión clonal masiva para generar un gran número de células T efectoras (LT CD4⁺_E) cambiando su patrón transcripcional para facilitar su tráfico a la periferia; esto incluye un incremento en la expresión del receptor de quimiocinas CCR5, correceptor utilizado por el VIH para entrar a las células, haciendo a los linfocitos susceptibles a la infección. Una vez controlada la infección, se inicia una fase de contracción donde la mayoría de los LT CD4⁺_E (90-95%) generados en la expansión se van a apoptosis como un mecanismo de homeostasis, mientras que el resto de las células (infectadas y no infectadas), tendrán una transición a linfocitos T CD4⁺ de memoria (LT CD4⁺_M), los cuales



pasan de ser altamente proliferativos y activos funcionalmente, a un estado de reposo (Fig. 8). Estas células persisten durante largos períodos de tiempo, son altamente específicas al antígeno y vitales para preservar la memoria inmunológica del sistema inmune, ya que permite montar una respuesta inmune más rápida y eficiente en un posterior encuentro con el mismo antígeno. Sin embargo, debido a su naturaleza inactiva, el VIH integrado estará transcripcionalmente silenciado en estos LT CD4⁺_M, es decir, en un estado latente (Dunn, McCuaig, Tu, Hardy, & Rao, 2015; Hokello, Sharma, Dimri, & Tyagi, 2019; Murray, Kwon, Farber, & Siliciano, 2016).

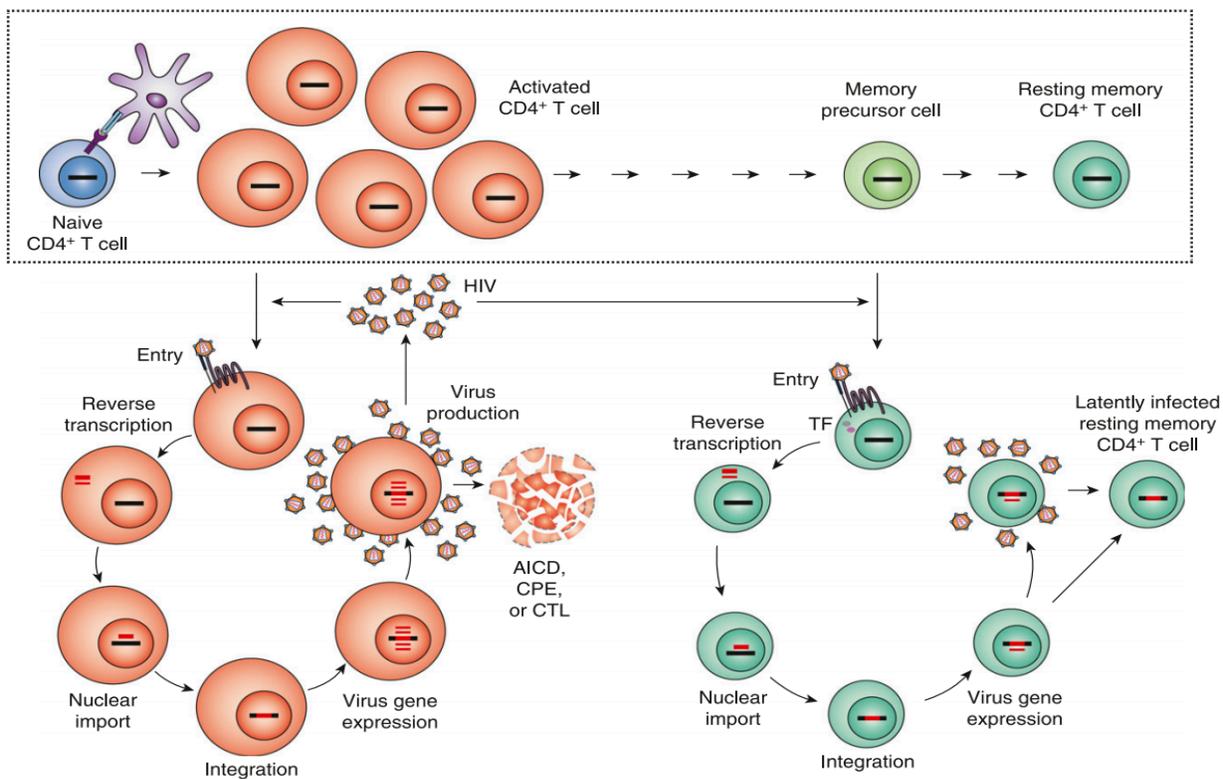


Figura 8. Modelo de infección por VIH en los LT CD4⁺. La respuesta inmunológica normal contra el antígeno (VIH), activa a los LT CD4⁺naïve (LT CD4⁺_N) aumentando su proliferación y diferenciación hacia células efectoras (LT CD4⁺_E). Durante el proceso de activación los LT CD4⁺_E aumentan la expresión CCR5 por lo que, son fácilmente susceptibles a la infección. Tras realizar su función efectora, la mayor parte de los LT CD4⁺_E sufren apoptosis, mientras que una pequeña fracción, revierte a un estado de reposo como LT CD4⁺ de memoria (LT CD4⁺_M), algunos de los cuales ya han sido infectados por el VIH. Los LT CD4⁺_M mediarán una respuesta inmunológica más eficiente ante futuras exposiciones al antígeno. Sin embargo, debido a la naturaleza inactiva de los LT CD4⁺_M, el VIH integrado se vuelve transcripcionalmente silencioso, permaneciendo en un estado latente (Murray et al., 2016).



3.3 Respuesta inmune en la infección por VIH-1

La patogénesis de la infección por el VIH-1 se fundamenta en la interacción de este virus con los componentes del sistema inmune del hospedero. Este virus afecta a diferentes células de la respuesta inmune, ya sea como consecuencia directa de la infección o indirectamente por múltiples mecanismos que incluyen la inducción de apoptosis mediada por varias proteínas virales solubles (Nef, Tat, Vpu, Vif), la muerte celular secundaria al estado de hiperactivación inmunológica inducido y el daño progresivo de los órganos linfoides primarios y secundarios, entre otros (Montoya Guarín et al., 2006).

La respuesta inmune innata, es la primera línea de defensa que el VIH encuentra al ingresar al cuerpo. Entre las células que participan, se encuentran las células NK, el linaje monocito macrófago, neutrófilos, así como las células dendríticas que son el puente entre la inmunidad innata y adaptativa. Las células NK constituyen una de las primeras líneas efectoras de la respuesta innata contra el VIH, debido a su rápida movilización y actividad citotóxica constitutiva, se considera que son responsables del control inicial de la replicación viral, dando tiempo para que la respuesta inmune adaptativa se desarrolle y continúe con la respuesta a la infección. Las células NK normalmente atacan aquellas células que tienen una baja expresión de las moléculas del MHC clase I, que en el caso de la infección por VIH, su expresión es regulada negativamente por la proteína Nef, lo que dificulta el reconocimiento de las células infectadas (Montoya Guarín et al., 2006). Las células dendríticas por su parte son las principales células presentadoras de antígeno y activan la respuesta inmune innata y adaptativa por medio de la expresión de moléculas co-estimuladoras y la secreción de citocinas como IL-12, TNF- α , IFN- α , IL-7 e IL-1. Aunque las células dendríticas son blanco de la infección por el VIH-1 ya que expresan diversos receptores para quimiocinas, en particular, CCR5 y CXCR4, además de la molécula CD4, también ayudan a controlar la infección por el VIH-1 por medio de la producción de quimiocinas e IFN tipo I (Montoya Guarín et al., 2006).



3.4 Linfocitos T CD4⁺ y el VIH

Al inicio de la infección, las células que más se depletan son los LT CD4^{M+}, que se encuentran circulantes. Conforme progresa la enfermedad, también los LT CD4^{N+} van perdiéndose de la circulación. En estadios más avanzados de la enfermedad, las células residentes de tejido linfoide son eliminadas, llegando a una depleción total de los LT CD4⁺.

Las células infectadas tienen una capacidad reducida de producir IL-2, lo que conlleva a la disminución en la proliferación celular. La disminución de los niveles de IL-2 se correlaciona de manera directa con el conteo de LT CD4⁺ en pacientes con <200 células/μL (Katherine Kedzierska & Crowe, 2001). Además, al progresar la infección se observa una disminución de IL-21, impactando negativamente en la proliferación de Linfocitos B, células NK, células dendríticas y Th17, lo que favorece la aparición de infecciones oportunistas por bacterias extracelulares y hongos (McKinney & Smith, 2016).

3.4.1 Citocinas en la infección por VIH

Los LT CD4⁺ son una importante fuente de citocinas que ayudan a orquestar la respuesta adaptativa en diversas infecciones, como el VIH en donde se observa una desregulación del perfil de citocinas que contribuyen a la progresión de la inmunodeficiencia. Se ha observado que durante el curso de la infección por VIH-1, la secreción de citocinas Th1, como la interleucina IL-2 y el IFN -γ, disminuye, mientras que aumenta la producción de citocinas Th2 (IL-4, IL-10), citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-6, IL-8) y TNF-α. Esta producción anormal de citocinas contribuye a la patogenia de la enfermedad al alterar la inmunidad mediada por células, además de ejercer efectos estimulantes e inhibidores sobre la replicación del VIH-1, tanto el LT CD4⁺ como en macrófagos (K. Kedzierska & Crowe, 2001).



3.4.2 Citocinas que modulan de la replicación del VIH-1 y mantienen los reservorios virales

Las citocinas no sólo tienen influencia en la defensa de la célula, sino que también, la liberación de algunas citocinas regula la replicación del VIH como un efecto colateral. Se ha demostrado que, IL-1 potencia la replicación del VIH-1 en PBMC estimulados con IL-2. A su vez, IL-2 es una de las citocinas inductoras del VIH más potentes en células activadas. La IL-4 por su parte, muestra efectos tanto estimulantes como inhibidores sobre la replicación del VIH-1, este modula a la baja la entrada del VIH, posiblemente por una disminución en la expresión de CCR5. Otras citocinas que estimulan la replicación del VIH en linfocitos T y macrófagos derivados de monocitos son TNF- α , TNF- β , e IL-6. Adicionalmente, IL-7 e IL-15 han mostrado incrementar la replicación del VIH en linfocitos T, mientras que el INF- α , INF- β e IL-16 reprimen la replicación del VIH en células T. A medida que la enfermedad progresa, las citocinas TNF- α , IL-2 e IL-6 regulan y reponen el reservorio del VIH latente (tabla 1), (Osuji, Onyenekwe, Ahaneku, & Ukibe, 2018).

Tabla 1. Citocinas que modulan la replicación del VIH-1

Impacto en la replicación del VIH	Citocinas
Potencia la replicación del VIH en la mayoría de las células	IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-15, IL-18, TNF- α , TNF- β , M-CSF
Reprime la replicación en la mayoría de las células	IL-10, IL-13, IL-16, INF- α , INF- β , SDF-1, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES
Potencia/reduce la replicación del VIH dependiendo el tipo de célula	IL-4, IL-12, INF- γ , GM-CSF

IL: Interleucina; SDF: Factores Derivados del Estroma; MIP: Proteína Inflamatoria de Macrófagos; TNF: Tumor de Necrosis Tumoral; INF: Interferones; GM-CSF: Factor Estimulantes de Colonias de Granulocitos y Macrófagos. Tabla tomada de (Hokello et al., 2019)



3.4.3 Regulación de las citocinas

La vía de transducción de señales JAK-STAT es responsable de mediar las señales de más de cincuenta citocinas, factores de crecimiento y hormonas. A través de tres principales vías se regula negativamente la vía JAK-STAT y se determina el inicio y duración de la cascadas de señalización:

- Los supresores de la señalización de citocinas (SOCS): familia de al menos ocho miembros que contienen un dominio SH2 y una caja SOCS-1 en el extremo C-terminal. Las proteínas SOCS interactúan con los receptores de citocinas, por lo que regulan la magnitud y duración de las respuestas de estas; además de tener un papel importante en la polarización de los LT CD4⁺ (Knosp & Johnston, 2012). Estos reguladores son inducidos por citocinas y posteriormente inhiben su función a través de cuatro mecanismos principales: (1) bloqueando el reclutamiento de STAT al receptor de citocinas; (2) al dirigirse al receptor para su degradación por parte del proteasoma; (3) al unirse a las JAK e inhibir directamente su actividad cinasa; (4) dirigiéndose a las JAK para su degradación por parte del proteasoma (Palmer & Restifo, 2009).
- Los inhibidores de las proteínas de STATs activados (PIAS): Estas proteínas se unen a los dominios STAT activados y evitan que se unan al DNA. El mecanismo por el cual actúan sigue sin estar claro.
- Las proteínas tirosina fosfatasa (PTP), que revierten la actividad de las JAK al desfosforilar a estas u otras moléculas de señalización activadas (Rawlings, Rosler, & Harrison, 2004).



3.4.4 Citocinas en los diferentes pacientes VIH⁺

La infección por el VIH lleva a una desregulación a nivel de citocinas que incluyen interleucinas, interferones y quimiocinas que regulan la homeóstasis del sistema inmune, así como la replicación del VIH. Durante el transcurso de la infección tiende a incrementar la producción de citocinas tipo Th2 (IL-4 e IL-10) y citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-6, IL-18 y TNF- α); además de la disminución de citocinas tipo Th1 como IL-2 e IFN- α (Hokello et al., 2019).

Citocinas en la infección aguda por VIH. Durante la etapa aguda de la infección, se liberan una tormenta de citocinas sistémicas, ya que los niveles plasmáticos son característicamente elevados. A medida que se resuelven los síntomas de la primoinfección, las citocinas disminuyen, sin llegar a normalizarse. Los pacientes VIH⁺ naïve a TAR muestran niveles elevados de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-6), citocinas antiinflamatorias (IL-4, IL-10), TGF- β comparados con personas VIH⁻. Incluso, TNF- α y TGF- β permanecen significativamente elevados 12 meses después del inicio del TAR (Osuji et al., 2018).

Citocinas en la infección crónica no tratada. En esta etapa, los niveles de mediadores inflamatorios como interferones (IFNs), IL-6 y el receptor de TNF (TNFR1) son típicamente elevados, aunque sus fuentes de liberación no se encuentran totalmente claras (Osuji et al., 2018).

Citocinas en la infección bajo TAR. Con el tratamiento antirretroviral, el conteo de LT CD4⁺ se recupera, mientras que los LT CD8⁺ permanecen elevados. Los niveles de citocinas inflamatorias disminuyen; sin embargo, el grado de disminución parece variar entre diversos estudios y entre regímenes de tratamiento. A pesar de la supresión virológica mediada por el TAR, la inflamación es persistente (Freeman et al., 2016).



4. Familia de represores transcripcionales ZBTB

4.1 Represores

Los represores transcripcionales son proteínas que contrarrestan la actividad positiva de los activadores de la transcripción, interactuando con componentes del PIC en el promotor o reclutando proteínas remodeladoras de la cromatina. Pueden unirse directa o indirectamente al DNA, así como regular la transcripción de sitios proximales o distantes del promotor (Cary et al., 2016). En el genoma humano, alrededor de 1900 factores transcripcionales son codificados, de los cuales, 49 son clasificados como una familia de represores transcripcionales denominada ZBTB, también conocidos como Poxvirus-dedos de zinc (POZ) y Poxvirus-Krüppel (POK) (Lee & Maeda, 2012; Maeda, 2016a).

4.2 Estructura

Los factores de transcripción ZBTB están formados por 90-120 aminoácidos y tienen un dominio funcional evolutivamente bien conservado llamado BTB (*broad-complex*, *tramtrack*, and *bric-a-brac*) de interacción proteína-proteína ubicado en la región N-terminal; mientras que en la región C-terminal, se encuentran los C2H2/Krüppel dedos de zinc (ZF) que se unen al DNA, ambas regiones están unidas por una región ligadora. Estos factores tienen homología estructural, sin embargo, varían en el número de dedos de zinc y en el espacio presente entre ellos como se muestra en la Fig. 9 (Maeda, 2016a).

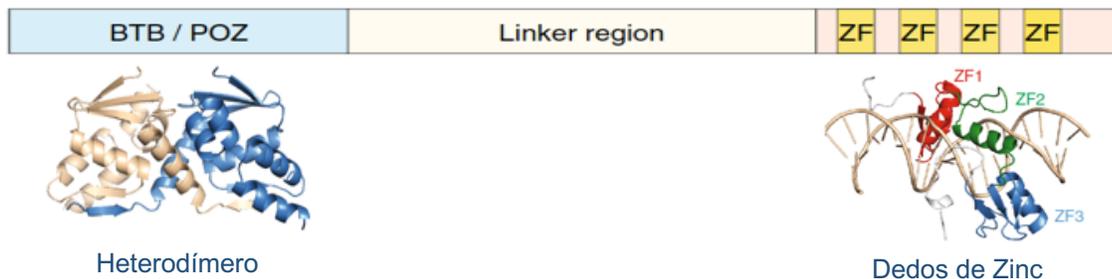


Figura 9. Estructura general de las proteínas ZBTB. En la región N-terminal (izquierda) se encuentra el dominio BTB de interacción proteína-proteína, seguido de una región ligadora que le da flexibilidad y finalmente, 1 a 14 dedos de zinc (ZF) dominio que le da especificidad de unión al DNA. Tomado de (Maeda, 2016a).



El dominio BTB tiene dos principales funciones:

- Formación de homodímeros o heterodímeros, esencial para la estabilidad y funcionalidad de la proteína (Fig.10)
- Reclutamiento de correpresores transcripcionales como N-CoR (Correpressor del receptor nuclear) y SMRT (Mediador silenciador para los receptores de ácido retinoico y de hormona tiroidea, llamado también N-CoR2).

Dominio C2H2- tipo dedos de Zinc:

Las proteínas ZBTB contienen múltiples dedos de zinc C2H2 en la región C-terminal, estas estructuras están formadas por histidinas próximas a cisteínas, este dominio se encarga de dar la especificidad de unión al DNA; el número y la posición de los dedos permiten su unión específica en distintas regiones del DNA.

Región ligadora:

Es la región que se encuentra entre los dominios BTB y los dedos de zinc, la cual le confiere una flexibilidad de unión al DNA en términos de espacio y orientación. Funciona como plataforma para reclutar enzimas y complejos que inducen modificaciones postraduccionales, que regulan su estabilidad y actividad transcripcional. Además, esta región no está estructurada y es pobremente conservada entre las proteínas ZBTB por lo que permite múltiples formas de unión al DNA (Maeda, 2016a).

4.3 Mecanismo de acción

Gran parte de las proteínas ZBTB, han sido implicadas como represores transcripcionales al unirse al DNA metilado y a secuencias consenso no metiladas e interactuar con correpresores como NCoR1, SMRT y BcoR que forman parte de un complejo que contienen enzimas (HDACs), específicamente la HDAC3 cuya función es deacetilar las lisinas terminales de las histonas que adquieren una carga positiva y atraen al DNA cargado negativamente, esto



modifica el estado de compactación de la cromatina induciendo el silenciamiento génico (Fig.10). También se les ha asociado con otros correpresores como, el correpresor de BCL6 (BCOR), SIN3A/B y NuRD (Leimbach, Hacker, & Dobrindt, 2013).

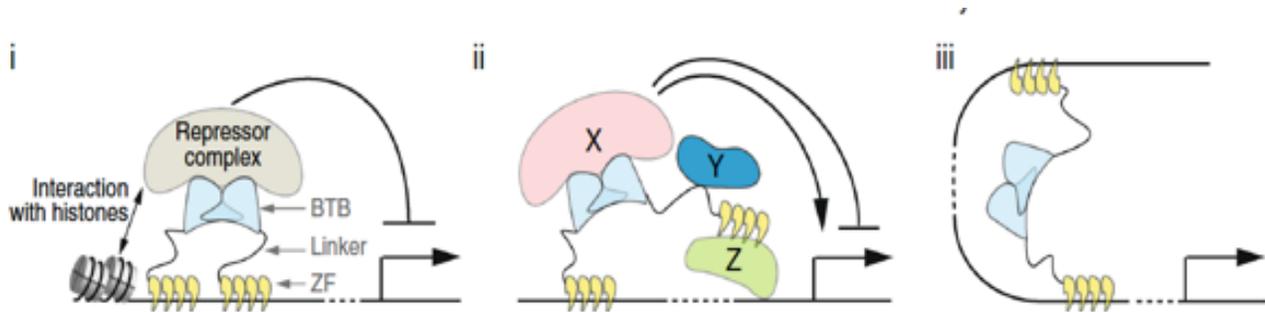


Figura 10. Función de los dominios de las proteínas ZBTB. (i): Modelo clásico de la interacción ZBTB/DNA. (ii) El dímero ZBTB puede unirse al DNA a través de una cadena e interactuar con otras proteínas por la vía de la región ligadora y/o de los motivos de dedos de zinc. (iii): la proteína ZBTB puede facilitar interacciones de largo rango con regiones regulatorias como promotor o potenciadores (Maeda, 2016).

4.4 Función de genes ZBTB

A inicios de los 90s se estableció una relación importante entre las proteínas ZBTB y el sistema hematopoyético, cuando se observó la relación de ZBTB16 en la translocación cromosómica t (11;17) (q23;q21) en la leucemia promielocítica aguda, por lo que también es llamado *Promyelocytic leukemia zinc finger* (PLZF), (Siggs & Beutler, 2012). Aunque todavía se desconoce la función de la mayoría de los miembros de la familia de represores ZBTB, muchas de sus proteínas tienen funciones esenciales durante el desarrollo y diferenciación del sistema hematopoyético, identificando a algunos de sus miembros como reguladores de vías de diferenciación únicas en los linfocitos (Fig. 11). También se han asociado en el desarrollo neurológico, así como en algunas enfermedades hematopoyéticas malignas (Lin et al., 2019; Maeda, 2016b).

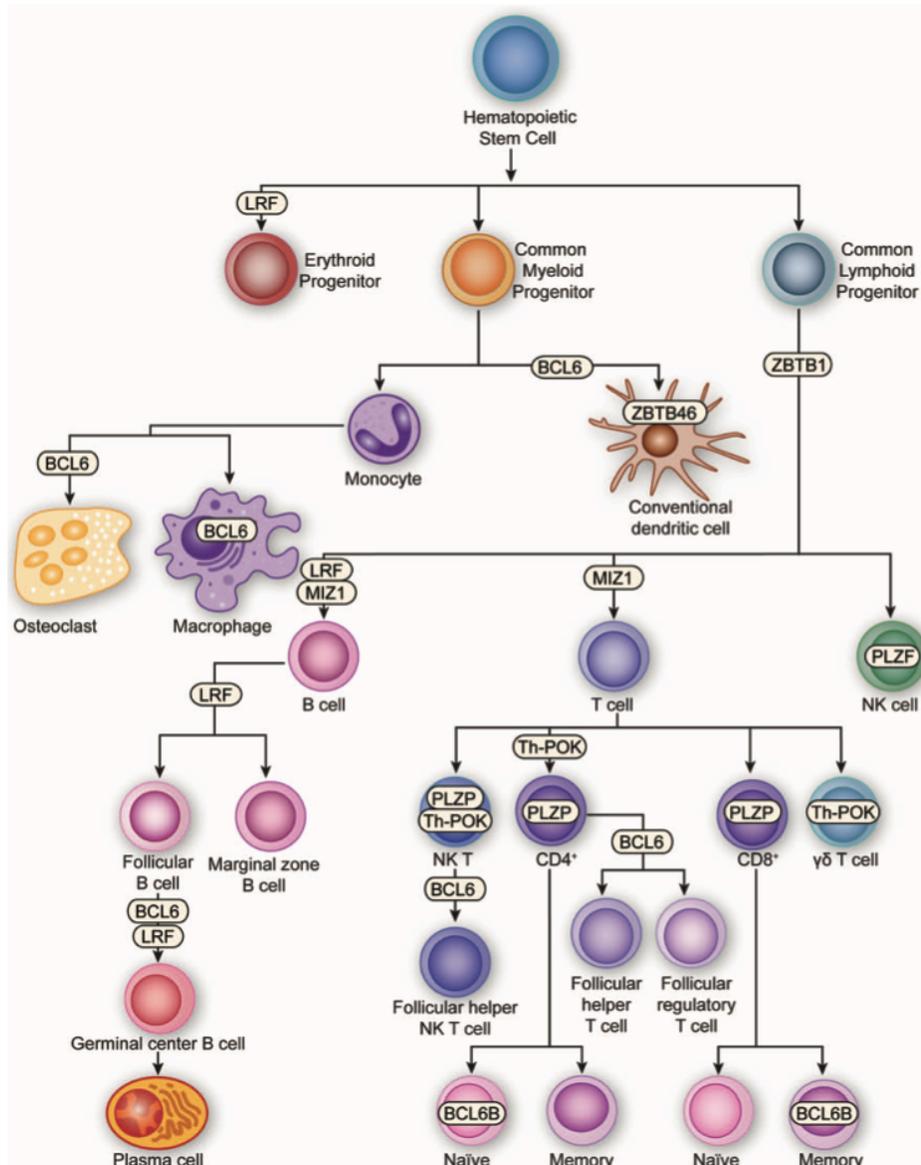


Figura 11. Participación de los factores transcripcionales ZBTB en la hematopoyesis.

Las etiquetas fuera de las células representan un requisito para su desarrollo y las etiquetas dentro de las células representan un requisito para su función efectora (Siggs & Beutler, 2012).



Entre los miembros de la familia ZBTB más estudiados se encuentran:

- El factor ZBTB27 también llamada proteína 6 del linfoma de células B (BCL6), inicialmente fue identificado como un oncogén del linfoma de células B. Se expresa en casi todos los tipos celulares (Mondal, Sawant, & Dent, 2010). Es un regulador maestro en la diferenciación de los linfocitos T cooperadores foliculares (Tfh), células esenciales para el desarrollo de centros germinales en los órganos linfáticos secundarios que permiten la maduración de linfocitos B y su diferenciación a células plasmáticas productoras de anticuerpos. Otras células del linaje hematopoyético requieren BCL6 para su desarrollo, como los osteoclastos, LT CD4⁺_M y CD8⁺_M (Siggs & Beutler, 2012). La expresión de *BCL6* está incrementada en las células Th17 y participa en su diferenciación al reprimir GATA-3 e impedir la diferenciación a Th2. (Mondal et al., 2010). En ratones *knockout* del gen *Bcl6*, se ha observado una inflamación severa debido a la falta de represión de los genes de citocinas y quimiocinas. *Bcl6* y *Nf-kb* antagonizan señales generadas por los Receptores Tipo Toll (TLR), ya que en ratones *knockout* para *Bcl6* se reportaron hipersensibles a señales de TLR por la alta actividad de *Nf-kb*. Por tanto, la pérdida de BCL6 de sitios de ocupación de DNA podría ser necesario para el reclutamiento de NF-kB factor importante durante la activación de linfocitos T CD4⁺ (Maeda, 2016).

- El factor transcripcional ZBTB7B (ThPOK) es un regulador maestro de la diferenciación del linaje de los LT CD4⁺, debido a que reprime la transcripción del gen *RUNX3*, factor transcripcional que es altamente expresado en LT CD8⁺ y funciona como un silenciador de la expresión de CD4 durante el proceso de maduración de los linfocitos T dobles positivos (CD4⁺/CD8⁺), (Wildt et al., 2007). *Ciucci y col.* mostraron como el factor transcripcional ThPOK es necesario para el desarrollo de los LT CD4⁺_M y es esencial para una memoria efectiva y duradera. ThPOK diferencia a los LT CD4⁺ a un fenotipo transcripcional de memoria, evitando la expresión de los genes *RUNX3* y *Prdm1* que codifican a RUNX3 y Blimp-1, factores transcripcionales característicos de células efectoras que son de corta duración (Ciucci et al., 2019). Los linfocitos Th1 expresan ThPOK, así como RUNX3; la disrupción de ThPOK incrementa la expresión de enzimas citotóxicas como granzima B e interferón gama en los LT CD4⁺ efectoras. ThPOK junto con ZBTB7A son esenciales para preservar la integridad y diversidad funcional de los LT CD4⁺, así como para la diferenciación de la respuesta efectora condicionada por el ambiente de citocinas (Vacchio et al., 2014).



- Por otra parte, ZBTB16 (PLZF) es necesario para las funciones efectoras durante la diferenciación de las células T invariantes *Natural Killer* (iNKT), subtipo de células T con funciones innatas y citotóxicas. Además, se ha identificado una correlación en la expresión de PLZF y el incremento de IL-4 en linfocitos, aunque el mecanismo que las asocia no está aún dilucidado (S. Zhang, Laouar, Denzin, & Sant'Angelo, 2015).

- El factor transcripcional ZBTB7A también denominado factor relacionado a leucemia (LRF), FBI-1 y Pokemon, se ha descrito como un represor transcripcional del VIH por unión directa a la región LTR (Pessler, Pendergrast, Spring, & Hughes, 1997). Adicionalmente puede interactuar con BCL6 e inducir leucemias de células T.

- *ZBTB29*, también llamado gen hipermetilado en cáncer 1 (HIC1), es un candidato como gen supresor de tumores que se encuentra expresado a la baja en muchos tipos de cáncer (Siggs & Beutler, 2012).

- Otros miembros de la familia ZBTB menos estudiados son:

El represor ZBTB2, descrito como un factor transcripcional que identifica DNA metilado por un mecanismo de unión aún desconocido, pero diferente al realizado a través de la secuencia conservada tipo KAISO, en donde 3 dedos de zinc se unen a zonas metiladas CpG (Karemaker & Vermeulen, 2018). Se ha encontrado que el factor transcripcional ZBTB2 activa la proliferación celular, a través de la represión del *gen p21* (Jeon et al., 2009a).

El represor ZBTB17 también llamado *Myc interacting zinc finger protein 1* (Miz-1), descrito como un factor transcripcional que interviene en la regulación de la vía de señalización de la vía IL-7/IL-7R/STAT5/Bcl-2 al reprimir la expresión de SOCS-1 (supresor de la señalización de la citocinas 1) que inhibe la activación de STAT5 a/b, por lo que Miz-1 es considerado un factor importante en la supervivencia celular dependiente de IL-7/IL-7R (Saba, Kosan, Vassen, & Mo, 2011; Seki et al., 2007). Esta vía es considerada como la encargada de regular el equilibrio entre los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ naïve, efectoras y de memoria, entre otros linfocitos. Estas células expresan el receptor de IL-7 (IL-7R α /c- γ) en conjunto con IL-2. La IL-7 es expresada constitutivamente por las estromales y epiteliales en el timo, tejidos linfoides y médula ósea (Goonetilleke, Clutton, Swanstrom, & Joseph, 2019).



4.5 Regulación de las proteínas ZBTB

Las proteínas ZBTB son blanco de diversas modificaciones postraduccionales como acetilación, ubiquitinación, SUMOilación y fosforilación; estas modificaciones juegan un papel importante ya que, pueden dar estabilidad o desestabilizar a las mismas, estableciendo así, los niveles apropiados según el tipo de célula y contexto fisiológico de cada una de ellos (Duan et al., 2012).

- BCL6 es fosforilado por MAPK1 en respuesta a la activación del TCR en Ser-333 y Ser-343 (Niu, Ye, & Dalla-Favera, 1998), resultando en la degradación por la vía ubiquitina/proteasoma (Duan et al., 2012). BCL6 también puede ser acetilado en Lis-379, esto inhibe la interacción con el complejo NuRD y, por tanto, la función de represor transcripcional. (Bereshchenko, Gu, & Dalla-Favera, 2002).

- Algo similar ocurre con ZBTB4 que al ser fosforilado por HIPK2, reduce la estabilidad y desencadena la degradación de la proteína en respuesta al daño del DNA (Yamada et al., 2009).

- Otro caso reportado, es el de la proteína ZBTB7A, la cual es sumoilada (adición de una proteína llamada SUMO por *small ubiquitin-related modifier*) en diferentes lisinas (61, 354, 371,379, entre otras) que resulta en una interacción inestable con los correpresores (Roh et al., 2007).

En contraparte, se ha reportado que también ocurren modificaciones que ayudan a dar estabilidad a las proteínas, como es el caso de ZBTB7B en donde, la acetiltransferasa p300 supera la actividad de la ubiquitinación y une más eficientemente los grupos acetilo a las lisinas 210, 216 y 339; de esta manera, ejerce su función como represor de *Runx3* (M. Zhang, Zhang, Rui, & Liu, 2010).



ANTECEDENTES DIRECTOS

Algunos grupos de investigación han realizado estudios, que han permitido establecer una relación entre algunos de los factores transcripcionales ZBTB y el VIH.

1. El gen *ZBTB7A* que codifica para una proteína denominada factor relacionado a linfoma (LRF) o FBI-1 tiene afinidad de unión al núcleo del promotor en la región U3 del LTR del genoma VIH-1, el cual es llamada Inductor de Transcritos Cortos (ITS) ubicada en -5 a +26 con una mayor actividad entre las posiciones +40 a +59, que lleva a una interrupción en la elongación, generando transcritos cortos de mRNA de sólo 59nt (Pessler & Hernandez, 2003; Pessler et al., 1997; Sheldon et al., 1993).
2. El grupo de *Kim et al.*, reportó una disminución de la expresión del gen *ZBTB16* en presencia de la proteína Vif en la línea celular Jurkat T-REx (D. Y. Kim et al., 2013). Vif (*virión infectivity factor*) es una proteína que inhibe la acción de la deaminasa APOBEC3G, factor de restricción celular que causa hipermutaciones en el genoma viral. Vif a través de la ubiquitin ligasa Cullin5 E3 ubiquitina a APOBEC3G, esta señalización conduce a su degradación en el proteasoma (Stopak et al., 2003).
3. HIC1 reprime la transcripción del VIH-1 dependiente de Tat en las células microgliales, principales reservorios en el sistema nervioso central, ya que existe una afinidad de HIC1 por la proteína Tat y al unirse al elemento de respuesta a Tat, lleva consigo a HIC1 que a su vez, recluta al complejo de correpresores NURD modificando la compactación de la cromatina y llevando a la represión de la transcripción (Deltour, Guerardel, & Leprince, 2002; Le Douce et al., 2016).
4. El factor transcripcional BCL6 ha sido uno de los miembros de la familia más estudiados, incluyendo trabajos sobre VIH, en los cuales se ha logrado identificar una secuencia en el genoma del VIH-1 complementaria a la secuencia de unión de BCL6. Así, el equipo de *Baron et al.*, demostró, que la unión de BCL6 a la región U3' del LTR del VIH-1 reprimía la transcripción (Baron et al., 1997). Recientemente, fue publicado un trabajo donde establecen que BCL6 contribuye a la activación y susceptibilidad a la infección de las células Tfh de ganglio *ex vivo*, así como en LT CD4⁺ no Tfh (Cai et al., 2018).



JUSTIFICACIÓN

El VIH es un problema de salud pública a nivel mundial con 37.9 millones de infectados, de los cuales se reporta una estimación anual de 1 millón de muertes relacionadas al SIDA, así como 1.8 millones de nuevas infecciones por año. En México la prevalencia es de 0.2-0.3% cifra equivalente 210,104 casos reportados hasta 2019, siendo Jalisco el 4^{to} lugar con mayor número de casos en el país.

De acuerdo con información de la OMS, se estima que el 70% de las personas que viven con VIH conocen su estado serológico y de estas solo el 62% se encuentra bajo tratamiento antirretroviral. Si bien es cierto que, el TAR es efectivo para controlar la infección, mejorando la calidad y esperanza de vida de las personas infectadas, este no representa una cura definitiva; ya que, al interrumpir el TAR en pacientes con viremia controlada durante años, se produce un repunte de la carga viral a niveles similares previo al inicio del tratamiento, fenómeno atribuido a la presencia de reservorios virales que contienen al VIH integrado que está reprimido transcripcionalmente. Estos reservorios son considerados el principal obstáculo para erradicar el virus y el motivo por el cual el TAR deba administrarse de por vida causando severos efectos adversos, además de generar altos costos para los pacientes y los sistemas de salud.

La falta del éxito en la eliminación de los reservorios virales refleja una comprensión incompleta de los mecanismos de interacción del VIH con la célula que infecta, este hecho toma una mayor relevancia ya que, actualmente las estrategias de cura se centran en la modulación de los factores del hospedero. Por lo que, es claro que se requiere de una comprensión más profunda de los mecanismos moleculares que modulan la expresión del DNA proviral.



PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Para desarrollar enfoques terapéuticos y preventivos contra el VIH/SIDA, es esencial comprender los mecanismos de interacción entre el virus y su célula hospedera. Actualmente, sabemos que existe una clara asociación entre la tasa de replicación del VIH y la presencia de factores transcripcionales celulares con función represora que llevan al silenciamiento génico.

Dentro de los represores transcripcionales, se encuentra la familia de genes *ZBTB* que participan como reguladores clave del desarrollo, diferenciación y función del linaje linfoide, incluyendo a los LT CD4⁺, principales células diana y reservorios del VIH-1. Esto, aunado a que se ha descrito que algunos de sus miembros reprimen la transcripción del VIH; promueve el interés de estudiar a esta familia de represores con la finalidad de conocer si otros miembros pudiesen estar participando en la represión del VIH-1 en los LT CD4⁺.

Con base a lo anterior, se plantea que la familia de genes *ZBTB* tiene una expresión diferencial en linfocitos T CD4⁺ de pacientes VIH positivos y que esta diferencia en la expresión está asociada con una represión de la replicación viral, de igual manera se propone que este cambio en la expresión génica puede tener una relación con la modulación de citocinas proinflamatorias.



PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuáles son los niveles de expresión de la familia de represores transcripcionales *ZBTB* en linfocitos T CD4⁺ en la infección por VIH-1?

HIPÓTESIS

Los niveles de expresión de la familia de represores transcripcionales *ZBTB* se incrementan en linfocitos T CD4⁺ en la infección por VIH-1



OBJETIVOS

General:

Evaluar los niveles de expresión de la familia de represores transcripcionales *ZBTB* en linfocitos T CD4⁺ en la infección por VIH-1

Específicos:

1. Identificar los genes *ZBTB* asociados a la infección por VIH-1 a través de un análisis *in silico*
2. Cuantificar los niveles de expresión de los genes *ZBTB* en linfocitos T CD4⁺
3. Determinar si los niveles de expresión de los genes *ZBTB* se asocian a la infección por VIH-1
4. Determinar si los niveles de expresión de los genes *ZBTB* se asocian a una represión de la replicación del VIH-1
5. Determinar si la expresión de los genes *ZBTB* se asocia a las características clínicas y niveles séricos de citocinas proinflamatorias



MATERIALES Y MÉTODOS



MATERIALES Y MÉTODOS

1. Diseño y universo del estudio

Estudio transversal analítico. Se reclutaron pacientes VIH⁺ mayores de 18 años, sexo masculino, sin infecciones bacterianas en curso, enfermedades neoplásicas, autoinmunes o hematopoyéticas; que asisten al servicio de consulta de la Unidad de VIH del Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde”. Estos pacientes fueron agrupados de acuerdo con el grado de control de la viremia de la siguiente manera: pacientes virémicos sin el uso previo de TAR (PNTx, Pacientes *Naïve* a TAR), pacientes con viremia controlada por el uso del TAR (PCTx, Pacientes Con Tratamiento; indetectables > 1 año) y pacientes con control espontáneo de la viremia (CE, *Controladores de Élite*; indetectables > 1 año, sin previa exposición a TAR). Además, se enrolaron personas clínicamente sanas, mayores de 18 años, del sexo masculino y VIH negativos.

2. Tamaño de muestra

Se incluyó una muestra no probabilística seleccionada a conveniencia con base en el grupo de controladores de élite, ya que representan menos del 1% de la población infectada por VIH-1; por tanto, la “n” dependió de aquellos que aceptaron participar en el estudio y que cumplieron con los criterios de selección. En cuanto a la “n” de los grupos *naïve* a TAR, con TAR y controles sanos se determinó con base a los controladores de élite.

3. Criterios de selección:

En las siguientes tablas se describen los criterios de selección para los diversos grupos de estudio:

- Grupo de pacientes: controladores de élite, pacientes *naïve* a TAR y pacientes con TAR (Tabla 2).
- Grupo de controles clínicamente sanos (Tabla 3)



Tabla 2. Criterios de selección: Grupos de pacientes VIH*

Controladores de élite	Pacientes naïve a TAR	Pacientes con TAR
<p>Inclusión:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Personas VIH⁺ • Masculinos • Mayores a 18 años • Sin TAR • Conteo de linfocitos T CD4⁺ >500 cel/μL • Carga viral indetectable > 1 año (<40 copias/mL) 	<p>Inclusión:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Personas VIH⁺ • Masculinos • Mayores a 18 años • Naïve a TAR • Conteo linfocitos T CD4⁺ >350 cel/μL • Carga viral detectable (<40 copias/mL) 	<p>Inclusión:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Personas VIH⁺ • Masculinos • Mayores a 18 años • TAR > 1 año • Conteo de linfocitos T CD4⁺ >500 cel/μL • Carga viral indetectable > 1 año (<40 copias/mL)
No inclusión:		
<ul style="list-style-type: none"> • Coinfecciones con VHC o VHB • Historial de enfermedades neoplásicas, hematopoyéticas o autoinmunes • Pacientes que no acepten participar en el estudio 		
Eliminación:		
<ul style="list-style-type: none"> • Personas que decidan retirarse del estudio • Muestra insuficiente o degradada para las mediciones 		

*Los resultados de carga viral de los pacientes reclutados a través de la UVIH fueron analizados por la técnica RT-qPCR COBAS AmpliPrep TaqMan HIV-1 Test, ROCHE con una sensibilidad de <40 copias/mL. Y el conteo de LT CD4⁺ por el sistema FACSCalibur System, BD.



Tabla 3. Criterios de selección: Grupo control

Inclusión:	No inclusión:	Eliminación:
<ul style="list-style-type: none">• Personas clínicamente sanas• VIH negativos• Sexo masculino• Mayores de 18 años	<ul style="list-style-type: none">• Personas con infección por VIH, VHC, VHB o infecciones bacterianas en curso• Historial de enfermedades neoplásicas, hematopoyéticas o autoinmunes• Personas que no acepten participar en el estudio• Uso de drogas IV en un periodo menor a 3 meses	<ul style="list-style-type: none">• Personas que decidan retirarse del estudio• Muestras insuficientes o degradada para las mediciones

4. Variables

Dependientes:

- **Clínicas:** Conteo de LT CD4⁺, carga viral, nadir de LT CD4⁺, tiempo de la infección, tiempo en TAR
- **Genes ZBTB:** Cambio en la expresión génica relativa
- **Citocinas:** Niveles de citocinas en suero

Independiente:

Infección por VIH en LT CD4⁺: Presencia o ausencia de la infección

5. Operacionalización de variables

Las variables dependientes e independientes consideradas relevantes para este proyecto se presentan en la tabla 4.



Tabla 4. Operacionalización de variables

Variable	Tipo de Variable	Definición operacional	Indicador (unidad)	Nivel de Medición
Dependientes				
Clínicas: Conteo de LT CD4⁺, nadir	Cuantitativa continua	Cuantificación absoluta	Cel/ μ L	De razón
Clínicas: Carga viral	Cuantitativa continua	Cuantificación absoluta	Copias/mL	De razón
Expresión génica (mRNA) de los genes ZBTB	Cuantitativa continua	Cambio en la expresión génica en base al mRNA de los genes ZBTB	Veces de cambio	De razón
Cuantificación de citocinas	Cuantitativa continua	Cuantificación absoluta	pg/mL	De razón
Independientes				
Infección por VIH-1 en LT CD4⁺	Cualitativa nominal dicotómica	Diagnóstico de VIH	Con infección	Nominal dicotómica
			Sin infección	

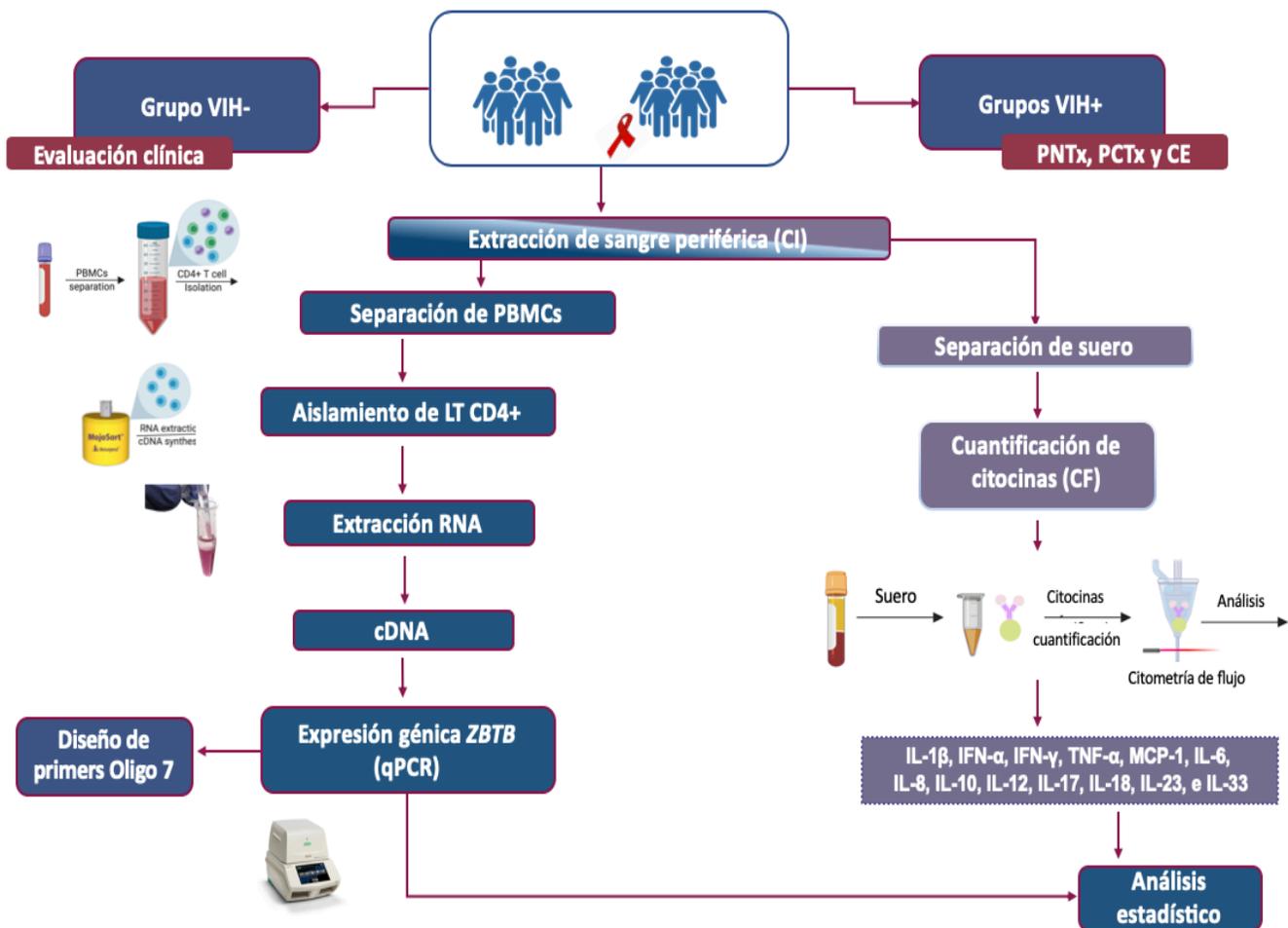
6. Periodo de estudio, sede y financiamiento

El reclutamiento de los participantes se realizó en el periodo de abril de 2017 a agosto del 2019. El proyecto de investigación se llevó a cabo en el Instituto de Investigación en Inmunodeficiencias y VIH (InVIH) del Centro Universitario de Ciencias de la Salud de la Universidad de Guadalajara, en colaboración con la Unidad de VIH del Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde”. El financiamiento de este proyecto se obtuvo por parte de los programas de la Universidad de Guadalajara, PROSNI 2017-2019 y PROINPEP 2017-2019. Así como el programa del PRODEP, NPTC (UDG-PTC-1276).



7. Diagrama metodológico

Figura 12. Diagrama metodológico





8. Metodología

a. Reclutamiento de controles clínicamente sanos

Se realiza el reclutamiento de personas clínicamente sanas, a los que se les realizó pruebas de laboratorio (tabla 5), historia clínica (Anexo IV), exploración física y evaluación de parámetros como IMC y presión arterial. Todos ellos cumplieron con los parámetros considerados como normales para cada una de las determinaciones. Además, manifestaron no tener conocimiento ni antecedentes familiares de enfermedades hematopoyéticas, neoplásicas o autoinmunes.

Tabla 5. Parámetros evaluados en cada uno de los controles sanos a través del laboratorio central del Hospital Civil “Fray Antonio Alcalde”.

Determinación	Parámetros evaluados
<i>Biometría Hemática</i>	Conteo de eritrocitos, leucocitos y plaquetas
<i>Electrolitos</i>	Fosforo, Calcio, Cloro, Potasio, Sodio
<i>Química sanguínea</i>	Glucosa, Urea, Creatinina, Nitrógeno ureico,
<i>Pruebas de Función Hepática</i>	Gamma Glutamyl Transpeptidasa, Transaminasa Glutámico Oxalacética y pirúvica, Bilirrubinas, Fosfatasa alcalina, Deshidrogenasa láctica
<i>Perfil lipídico</i>	Triglicéridos, Colesterol total, Lipoproteínas de alta, baja y muy baja densidad
<i>Serologías</i>	VIH, Virus de Hepatitis B, Virus de Hepatitis C

b. Reclutamiento de pacientes VIH⁺

Los pacientes VIH⁺ fueron reclutados a través del Instituto de Investigación en Inmunodeficiencias y VIH (InVIH) de la Universidad de Guadalajara en colaboración con el Servicio de la Unidad de VIH (UVIH) del Antiguo Hospital Civil “Fray Antonio Alcalde”.

Las muestras biológicas de los controladores de élite fueron proporcionadas por el Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIENI) de la CDMX, el Instituto de Investigación en Inmunodeficiencias y VIH (InVIH) de la Universidad de Guadalajara y por el Centro Ambulatorio para la Prevención y Atención en SIDA e Infecciones de Transmisión Sexual (CAPASITS) de Guanajuato.



c. Obtención y tipo de muestra

Se realizó la extracción de muestras de sangre periférica en tubos secos y con anticoagulante EDTA para el Biobanco de la Unidad de VIH, previa firma del consentimiento informado BIOBANCO-UVIH V.1.0 (Anexo I) de cada uno de los sujetos que participaron en este estudio.

d. Separación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)

A partir de la sangre periférica extraída se realizó la separación de PBMCs por la técnica de centrifugación por gradiente de densidad con el reactivo Lymphoprep™ (AXIS-SHIELD; No. Catálogo 114547) utilizando el protocolo estandarizado previamente por el grupo de investigación (Anexo V).

e. Aislamiento de Linfocitos T CD4⁺ a partir de PBMC

Una vez obtenidos los PBMCs, se realizó el aislamiento de linfocitos T CD4⁺ por selección positiva en dos pasos con el *kit MojoSort™ Human CD4 T Cell Selection Kit de BioLegend* (número de catálogo 480010) aplicando el procedimiento optimizado por nuestro equipo de trabajo (Anexo VI).

f. Determinación de la pureza de linfocitos T CD4⁺ aislados

Después del aislamiento se determinó la pureza de los LT CD4⁺ aislados con el citómetro de flujo *Attune™ NxT de Life Technologies*. La tinción se realizó con los siguientes anticuerpos: anti-CD3-PerCP (número de catálogo 300428), anti-CD4-FITC (número de catálogo 300538) y anti-CD14- APC (número de catálogo 367118) obteniendo una lectura final correspondiente a una pureza de 90.58% de LT CD4⁺, como se muestra en la figura 13. (Anexo VII)

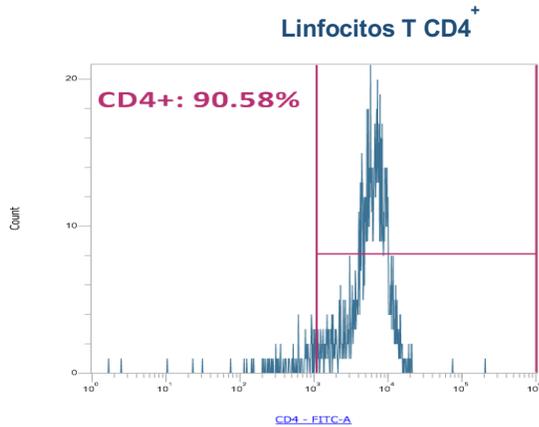


Figura 13. Histograma de la pureza de los LT CD4⁺: El histograma muestra que el 90.58% de la muestra pertenece a células con el marcador CD4⁺. Conteo relativo obtenido por citometría de flujo.

g. Diseño de *primers*

El diseño de *primers* de los diferentes miembros de la familia de genes *ZBTB* se realizó con el software OLIGO 7. Los *primers* fueron dirigidos hacia todas las variantes descritas para ese gen (tabla 6). El alineamiento de secuencias para comprobar la especificidad de los *primers* fue realizado a través de la herramienta BLAST del ncbi. La síntesis de *primers* se realizó por medio del servicio *Integrated DNA Technologies (IDT) Inc.*

h. Estandarización de *primers* PCR punto final

La estandarización de los 49 *primers* se realizó inicialmente por PCR punto final utilizando la enzima *Promega Hot Start Green* y el termociclador *Veriti* de *Applied Biosystems*, se corrió un gradiente de diferentes temperaturas de donde se obtuvo la temperatura de alineamiento óptima de cada primer (T_m), posterior a ello se comprobaron los tamaños de los fragmentos obtenidos por medio de geles de agarosa.

i. Electroforesis en gel de agarosa

Los productos de la PCR se analizaron por la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, para comprobar que el tamaño del fragmento de los amplicones correspondían al esperado. El gel fue preparado pesando y disolviendo agarosa en *buffer* TAE 1X (Tris-HCL



0.4M, EDTA 50mM pH 8.0, ácido acético hasta pH 7.2) y con el agente fluorescente *Sybr Safe* (No. Catálogo S33102). La separación fue realizada a 65V/2h y su visualización fue en el fotodocumentador *Fusion FX7* de la marca *Vilber Lourmat*.

j. Extracción de RNA de linfocitos T CD4⁺

La extracción del RNA de linfocitos T CD4⁺ se realizó por la técnica Tiocianato de guanidina-Fenol-Cloroformo con el reactivo TRIzol™ de *Invitrogen* (No. Catálogo 15596018). Posteriormente, la muestra se trató con 3μL (4U/μL) de *DNAsa I* de *Promega* (Ref. Z358A), con el objetivo de eliminar el DNA que pudiera haberse arrastrado al momento de la separación (Anexo VIII). Posteriormente, las muestras fueron cuantificadas con el lector *Synergy H1* (*BioTek*) e inmediatamente después se realizó la síntesis de cDNA, mientras que la muestra restante fue conservada a -80°C.

k. Síntesis de cDNA

La retrotranscripción de 400ng/μL de RNA total se realizó con el *kit SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System* de *Invitrogen* (No. Catálogo 18091200) para obtener el DNA complementario (cDNA), específicamente el RNA mensajero (mRNA) por lo que se utilizó el *primer* oligo dT, secuencia de timinas que se une a la cola de poli A presentes en el mRNA (Anexo X).

l. PCR en tiempo real (qPCR)

Una vez obtenido el cDNA, se cuantificó la expresión relativa de los genes *ZBTB* a través de la técnica PCR en tiempo real (qPCR) utilizando el termociclador *CFX96* (*Bio-Rad*) y el supermix *SsoAdvanced Universal SYBR Green* de *Bio-Rad* (No. Catálogo 1725271) a un volumen final de 10μL. Las condiciones utilizadas se describen en el Anexo XI.



m. Análisis de expresión génica

Los datos obtenidos de la qPCR fueron analizados utilizando el método de cuantificación relativa ΔCq con la fórmula:

$$\Delta Cq = (Cq_{\text{gen } ZBTB} - Cq_{\bar{x} \text{ genes referencia}})$$

Adicionalmente, se utilizó método de *Livak* para la cuantificación relativa $2^{-\Delta\Delta Cq}$ en la que se observó la sobreexpresión o subexpresión de los genes *ZBTB* normalizando a 1 con el grupo control (Schmittgen & Livak, 2008). Anexo XII

Se utilizaron como genes de referencia:

- *RPL32*: gen que codifica para la proteína ribosomal L32 en *Homo Sapiens* componente de la subunidad mayor 60S del ribosoma en eucariotas (Ochoa-Hernández et al., 2012)
- *RP18S*: gen que codifica para la proteína ribosomal 18S (Ochoa-Hernández et al., 2012; Majerowicz et al., 2011)
- *GAPDH*: Gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa, enzima que participa en la glucólisis (Liu et al., 2015).

En la tabla 6 se describe las características y secuencias de los *primers* utilizados para los genes seleccionados en este estudio. En el Anexo IX se muestra la tabla completa de los *primers* estandarizados.



Tabla 6. Información de los primers

Símbolo	Nombre del gen	Número de acceso	Primer Forward 5'-3' Primer Reverse 5'-3'	Longitud del producto	Ta	Referencia
RPL32	<i>Homo sapiens ribosomal protein L32</i>	NM_000994.3	F: GACTTGACAACAGGGTTCGTAG R: ATTTAAACAGAAAACGTGCACA	320	60	(Ochoa-Hernández et al., 2012) (Liu et al., 2015)
RPS18	<i>Homo sapiens ribosomal protein S18</i>	NM_022551.2	F: CGATGGGCGGCGGAAAA R: CAGTCGCTCCAGGTCTTCACGG	283	58	
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa	NM_002046.3	F: CACTGCCACCCAGAAGACTGTG R: TGTAGGCCATGAGGTCCACCAC	449	63	
ZBTB2	<i>Homo sapiens zinc finger and BTB domain containing 2</i>	NM_020861.2	R: GCGACTTTCTCCCTGTTGGCTA F: AATATGACTCCCTCAGACCCC	300	59	*
ZBTB4	<i>Homo sapiens zinc finger and BTB domain containing 4</i>	NM_020899.3	F: TATTCCCATCTCCCCAGTGTCA R: ACCAGGGTTAACTAGTGCAA	232	59	*
ZBTB5	<i>Homo sapiens zinc finger and BTB domain containing 5</i>	NM_014872.2	F: GCCGAGAAGATAGACCTCA R: CTCTGGACTCAACAAATAGGGG	261	59	*
ZBTB7A	<i>Homo sapiens zinc finger and BTB domain containing 7A</i>	NM_015898.3	F: GAAGCCCTACGAGTGCAACATC R: GTGGTTCTTCAGTCTAGTTGTG	317	59	(He et al., 2010)
ZBTB7B	<i>Homo sapiens zinc finger and BTB domain containing 7B</i>	NM_001252406.2	F: TCCCAGAGCCCTCATTCCAA R: TAGAAACCCGCATAGCCGAAG	212	59	*
ZBTB16	<i>Homo sapiens zinc finger and BTB domain containing 16</i>	NM_006006.4	F: ACTACTCGGCCATGATCAAGC R: GCCTCCCTTACACATAGCAC	193	59	*
ZBTB17	<i>Homo sapiens zinc finger and BTB domain containing 17</i>	NM_001242884.1	F: AGAAGACCCCAACACTCACA R: GCCCATACTGCTGATAGAAGTCC	152	59	*
BCL6	<i>Homo sapiens B-cell CLL/lymphoma 6</i>	NM_001706.4	F: GCCAGTCCCTGGTGAGTACAG R: TGCATATCACTTCGTGCCTCTT	362	59	(Duy et al., 2010)
HIC1	<i>Homo sapiens HIC ZBTB transcriptional repressor 1</i>	NM_006497.3	F: GTCGTGCGACAAGAGCTACAA R: CGTTGCTGTGCGAACTTGC	282	59	(Y. Li et al., 2019)
ZBTB38	<i>Homo sapiens zinc finger and BTB domain containing 38</i>	NM_001080412.2	F: TGAAGCCTAGTGTCTATCCGTA R: TCTCCCCATTTGGTACCCTC	304	59	*

* Primers diseñados con el Software Oligo 7 para este proyecto. F: Forward; R: Reverse; Ta: Temperatura de alineamiento.



n. Análisis *in silico* del genoma del VIH-1 HXB2 y los factores transcripcionales ZBTB

El análisis *in silico* para determinar la posible unión de los factores transcripcionales ZBTB, se realizó utilizando la herramienta bioinformática UGENE y la secuencia del genoma VIH-1 HXB2 obtenida del *VIH sequence database* (No. Acceso K03455), que corresponde al genoma completo del VIH-1 grupo M, subtipo B, en el que se han secuenciado e identificado cada uno de los genes y sus posiciones, por tanto, es utilizado como cepa de referencia. El genoma del VIH-1 HXB2 está compuesto por 9719pb, en la que la región reguladora 5`LTR y 3`LTR comprenden las posiciones 1-634 y 9086-9719 respectivamente (Fig. 14); las regiones codificantes están comprendidas en las posiciones 790-9168 abarcando los 3 genes principales: gen *gag* (790-2292), *pol* (2358-5096) y *env* (6046-8378). Se realizó una revisión en la literatura, así como en diversas bases de datos como: *Human Genes Data Base* (*genecards.org*), *UniProt* (*Uniprot.org*) y *The Human Protein Atlas* (*proteinatlas.org*) para identificar las secuencias de unión a DNA reportadas para cada uno de los siguientes FT ZBTB: ZBTB2, ZBTB4, ZBTB5, ZBTB7A, ZBTB7B, ZBTB16, ZBTB17, BCL6, ZBTB38 y HIC1. Posteriormente, estas secuencias fueron alineadas en el software UGENE, el cual, determina si existe la posibilidad de una alineación entre el FT ZBTB y el genoma del VIH-1.

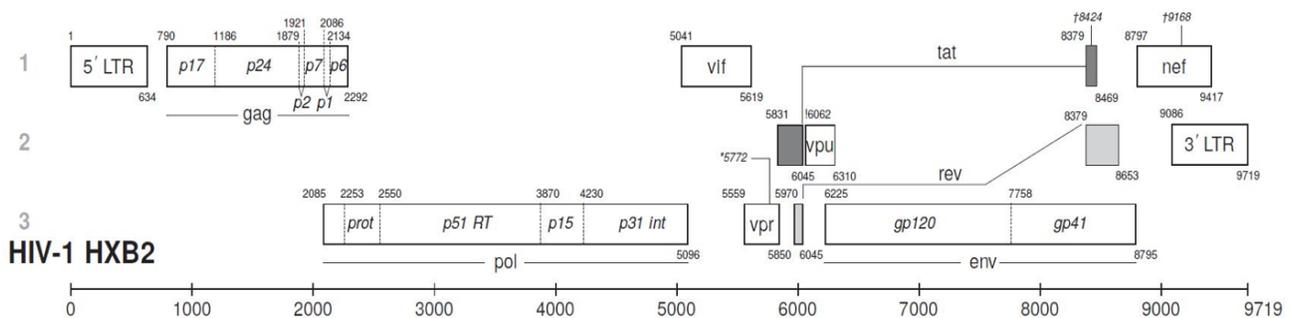


Figura 14. Representación esquemática del genoma del VIH-1 HXB2. Secuencia conformada por 9719pb, en donde la región reguladora 5`LTR y 3`LTR comprenden las posiciones 1-634 y 9086-9719 respectivamente; las regiones codificantes están comprendidas en las posiciones 790-9168 abarcando los 3 genes principales *gag* (790-2292), *pol* (2358-5096) y *env* (6046-8378).



o. Cuantificación de citocinas

Se determinaron las concentraciones de citocinas en las muestras de suero de los sujetos con el kit LEGENDplex™ Human Inflammation Panel 1 (13-plex) de BioLegend (No. Catálogo: 740118), el cual incluye la detección de las citocinas y quimiocinas IL-1 β , IFN- α , IFN- γ , TNF- α , MCP-1 (CCL2), IL-6, IL-8 (CXCL8), IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-18, IL-23 e IL-33. Esta técnica fue realizada por citometría de flujo con el equipo *Attune™ NxT de Life Technologies* (Anexo XII).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La información recolectada fue agrupada en una hoja de cálculo de Excel y se analizó con el paquete estadístico SPSS V. 20.0 y GraphPad Prism 6. Se realizó estadística descriptiva como frecuencias, medias, medianas, desviación estándar y rangos intercuartiles; así como, estadística comparativa con *Kruskal-Wallis* previa comprobación de normalidad con *Shapiro-Wilk* y la prueba *post hoc* de *Dunn*. Para las correlaciones se realizó la prueba de *Spearman*. Se consideraron estadísticamente significativos valores de $p < 0.05$.



ASPECTOS ÉTICOS Y BIOSEGURIDAD

Aspectos éticos

De acuerdo con el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, en el Título Segundo (De los Aspectos Éticos de la Investigación en Seres Humanos), Artículo 17, esta investigación se considera de riesgo mínimo. Se trabajó con muestras de sangre obtenidas para el Biobanco de la Unidad de VIH de donadores sanos y pacientes VIH positivos, previo consentimiento informado (Anexo I) donde se les notificó los riesgos y beneficios de participar en el estudio. Las muestras de sangre se codificaron para salvaguardar la confidencialidad de los pacientes; esta clave se encuentra en la hoja de llenado de datos correspondiente, la cual se utiliza para el análisis de datos. El procedimiento de obtención de muestras, así como el procesamiento posterior se apega a las normas de éticas y al Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación a la Declaración de Helsinki vigente (2013). El proyecto fue sometido al Comité de Ética del Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde” y aprobado el 20 de abril de 2017 con el número 128/17 (Anexo II); también se contó con la aprobación del Comité de Investigación y Bioseguridad del Centro Universitario de Ciencias de la Salud de la Universidad de Guadalajara con el número de aprobación CUCS/CINV/0215/17 (Anexo III).

Bioseguridad

Los tubos con sangre, así como todo el material desechable que contenía residuos peligrosos biológicos infecciosos fueron inactivados y desechados en bolsa roja para su incineración, de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002. La capacitación, asesoramiento y supervisión de los experimentos realizados estuvieron a cargo del responsable del proyecto. El Instituto de Investigación en Inmunodeficiencias y VIH (InIVIH) del Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara cuenta con un Nivel 2 de Bioseguridad.



RESULTADOS



RESULTADOS

1. Población de estudio

Se reclutaron un total de 33 pacientes VIH⁺ los cuales fueron agrupados de acuerdo con el grado de control de la infección: 15 pacientes VIH⁺ virémicos sin el uso previo de TAR (PNTx, Pacientes *Naïve* a TAR); 13 pacientes VIH⁺ avirémicos bajo esquema de TAR (PCTx, Pacientes Con Tratamiento; indetectables > 1 año) y 5 pacientes Controladores de Élite avirémicos (CE, indetectables > 1 año sin exposición previa a TAR). Además, se reclutaron 16 controles clínicamente sanos (VIH⁻). En la tabla 7, se presentan las características demográficas y clínicas de los 49 participantes (VIH⁺ y VIH⁻), así como los mecanismos de acción de los antirretrovirales bajos los que se encontraban al momento del reclutamiento (Tabla 8).

La media de edad de los sujetos fue de 34.87 ± 10.05 años, siendo el grupo de controladores de élite los de mayor edad (43.20 ± 13.90 años), seguido de los pacientes con TAR (37.62 ± 7.84 años); con respecto a esta característica una diferencia significativa fue observada entre el grupo de CE y los pacientes *naïve* a TAR (29.67 ± 9.42 años; $p < 0.01$). Los pacientes con TAR tuvieron un mayor conteo de LT CD4⁺ de 818 cel/ μ L de sangre (678-1046), estos niveles reflejan el uso de una terapia antirretroviral efectiva, que les permitió la reconstitución inmunológica desde su conteo más bajo (nadir) de 275 cel/ μ L (46-370) a las cifras actuales. Al comparar el nadir de LT CD4⁺ de este grupo con los CE, se observó que fue significativamente menor ($p < 0.05$) en los pacientes con TAR vs. los CE cuyo conteo promedio fue de 488 cel/ μ L (425-606). Adicionalmente, este grupo en tratamiento muestra un mayor tiempo de infección (6.80 ± 2.92 años), seguido por los controladores de élite (4.65 ± 2.37 años) y finalmente los pacientes *naïve* a TAR (0.25 ± 0.18 años). En cuanto a la terapia utilizada, la mayoría de los pacientes con TAR tenían esquemas con mecanismos de acción similares siendo el común denominador el uso de ITRAN ($n=13; 100\%$).



Tabla 7. Características demográficas y clínicas

Variable	VIH [†] n= 16	PNTx n= 15	PCTx n= 13	CE n=5	p
Edad (años) [†]	32.58± 7.94	29.67± 9.42 ^a	37.62 ± 7.84	43.20± 13.90 ^a	<0.01 ^a
Conteo de LT CD4 ⁺ (cel/μL)	N/A	558 (412-778)	818 (678-1046)	744 (489-863)	0.56
Conteo de LT CD8 ⁺ (cel/μL)	N/A	1070 (495-1378)	712 (541-1047)	612 (547-644)	0.141
Relación CD4 ⁺ /CD8 ⁺	N/A	0.62 (0.47-0.89)	1.2 (0.77-1.33)	1.15 (0.75-1.41)	0.138
LT CD4 ⁺ nadir (cel/μL)	N/A	N/A	275 (46-370)	488 (425-606)	<0.05
Carga viral (copias/mL)	N/A	29650 (21075-43425)	< 40	< 40	N/A
Tiempo de infección media [†]	N/A	0.25± 0.18 ^a	6.80± 2.92 ^a	4.65 ± 2.37	<0.001 ^a
Tiempo de infección sin TAR [†]	N/A	3.29± 1.98	7.32± 9.68	N/A	0.384
Tiempo en TAR [†]	N/A	N/A	6.20± 2.80	N/A	N/A

Los valores son reportados en mediana (IQR) y medias ± DE[†]. Comparaciones: *Kruskal-Wallis* con corrección de *Dunn*; N/A: No aplica comparación; LT: Linfocitos T; IQR: Rango intercuartil (percentil 25,75); DE: Desviación Estándar; TAR: Tratamiento Antirretroviral; PNTx: Paciente Naïve a TAR; PCTx: Paciente Con TAR; CE: Controladores de élite; Superíndice ^a: diferencia estadística entre grupos.

Tabla 8. Frecuencia del uso de antirretrovirales en los pacientes de estudio clasificados de acuerdo con su mecanismo de acción.

Mecanismos de acción del TAR del grupo PCTx (n=13)	n	%
Base:		
• Inhibidor de la Transcriptasa Reversa Análogo de Nucleósido (ITRAN)	13	100
• Inhibidor de la Transcriptasa Reversa Análogo de Nucleótido	12	92
Complemento:		
• Inhibidor de la Transcriptasa Reversa No Nucleósido (ITRNN)	11	85
• Inhibidor de la Integrasa (INSTI)	1	8
• Inhibidor de la Proteasa (IP)	1	8



2. Selección de genes *ZBTB*

2.1 Análisis *in silico* de bases de datos: GEO y SIDRA

Para la selección de los genes de estudio se realizó una revisión exhaustiva de la bibliografía disponible de los miembros de la familia *ZBTB*, así como un análisis *in silico* para determinar los genes de interés de acuerdo con los objetivos de este trabajo. El análisis *in silico* consistió en determinar la expresión diferencial de los genes *ZBTB* en 4 bases de datos disponibles en las plataformas en línea *Gene Expression Omnibus* (GEO) del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) y el *Systems Immunology Toolkit* (SIDRA), los cuales son almacenes de datos públicos en línea que proporcionan datos crudos o procesados de expresión génica obtenidos por diversas técnicas como microarreglos, hibridación y RT-qPCR.

Se consultaron las bases de datos que incluían en sus especificaciones: “*Homo Sapiens*”, “HIV”, “LT CD4⁺”, “elite controllers”. De la totalidad de los estudios depositados en las dos bases de datos (GEO y SIDRA) se seleccionaron los siguientes:

- Base de datos 1 (GSE18233): *Genome wide mRNA expression correlates of viral control in CD4⁺T cells from HIV-1 infected individuals (2009)*. Colaboradores: Rotger M, Dang KK, Fellay J, Heinzen (Suiza). Tipo de experimento: perfil de expresión por microarreglos en LT CD4⁺. Base de datos crudos.
- Base de datos 2 (GSE23879): *Transcriptional profiling of CD4 T-cells in HIV-1 infected patients (2011)*. Colaboradores: Vigneault F, Woods M, Buzon MJ, Li C. (USA). Tipo de experimento: perfil de expresión por microarreglos en LT CD4⁺. Base de datos crudos.
- Base de datos 3 (GSE73968): *Expression data from Human CD4 T cells subpopulations of HIV⁺ patients and HIV⁻ controls (2016)*. Colaboradores: García GO, Aguilar-García T, Gutiérrez-Jasso F, Vázquez-Pérez J, Zúñiga J, Pérez-Patrigéon S, *et. al.* (México). Tipo de experimento: perfil de expresión por microarreglos en LT CD4⁺_{MC}. Base de datos procesados.



- Base de datos 4 (GSE53527): *Long-term Antiretroviral Treatment Initiated in Primary HIV-1 Infection Affects the Size, Composition and Decay Kinetics of the Reservoir of HIV-1 Infected CD4 T Cells* (2017). Colaboradores: Buzon MJ, Pareyra F, Martin-Gayo E, Ouyang Z, Sun H, Li JZ, Piovoso M, Shaw A, *et. al.* (USA). Tipo de experimento: perfil de expresión por microarreglos en LT CD4⁺. Base de datos procesada.

Solamente 2 de las bases de datos (1 y 2) tenían información disponible como datos crudos, que fueron descargados y utilizados para obtener la información de los niveles de expresión de cada gen *ZBTB* de cada sujeto de estudio. La información recolectada, fue agrupada en una hoja de Excel y se analizó con el paquete estadístico SPSS V.20 y GraphPad Prism 6. Se realizaron comparaciones estadísticas entre los datos de los grupos utilizando la prueba de ANOVA o Kruskal-Wallis dependiendo de la distribución de los datos y la prueba post-hoc de Dunn. Se consideró estadísticamente significativos valores de $p < 0.05$ (Fig. 15)

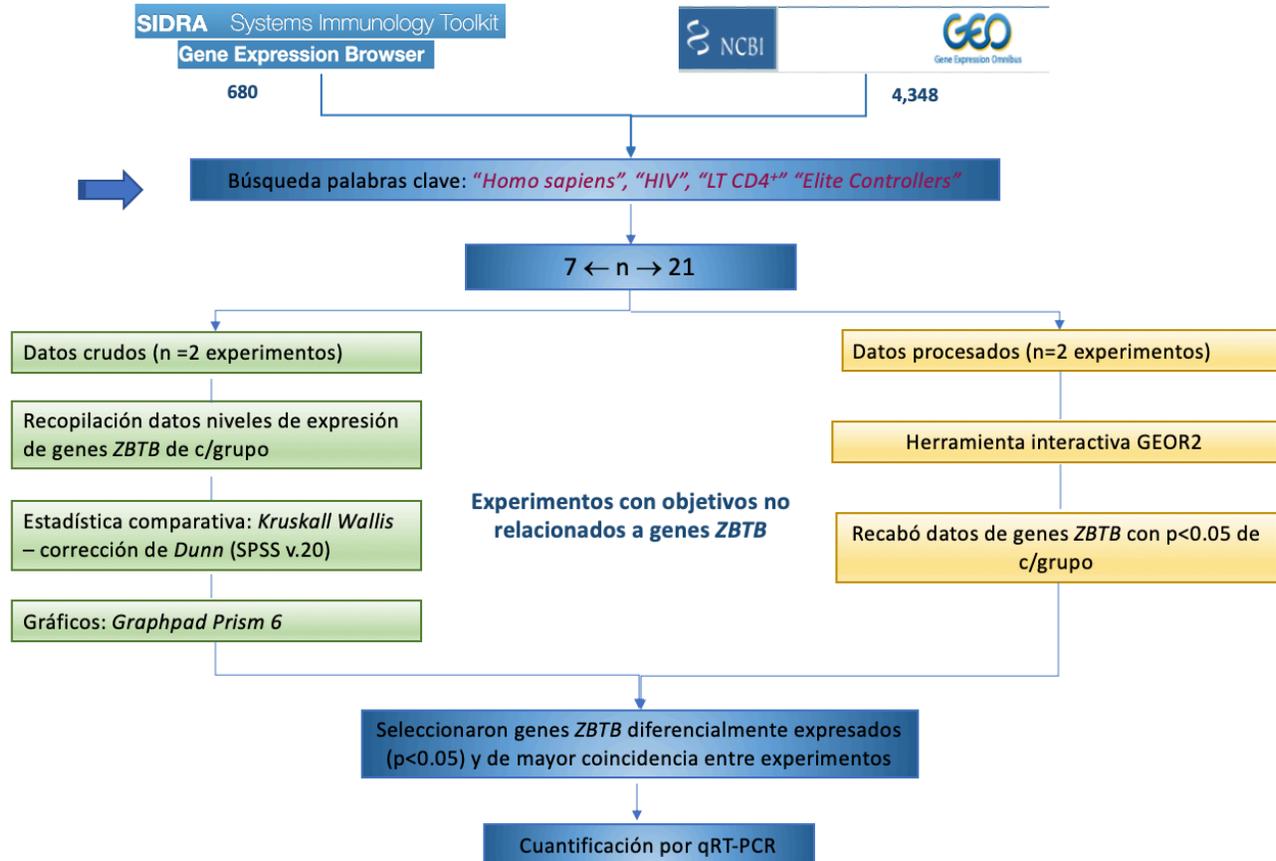


Figura 15. Análisis *in silico* de la expresión génica de GEO y SIDRA.

Representación esquemática del análisis *in silico* de las bases de datos reportadas en GEO y SIDRA de expresión génica. La plataforma en línea Gene Expression Omnibus (GEO) tiene 4,348 bases de datos de acceso libre, mientras que Systems Immunology Toolkit (SIDRA) cuenta con 680. Se realizó una búsqueda con las palabras clave: "Homo Sapiens, HIV, LT CD4⁺ y elite controllers". Se encontraron 7 coincidencias en SIDRA y 21 en GEO. Se realizó una revisión de las características de estos estudios y se encontró que 2 bases de datos de SIDRA y 2 de GEO eran relevantes para nuestro estudio. Para las bases de datos de SIDRA, se tomaron los datos crudos y se realizaron estadísticas comparativas con Anova o *Kruskal--Wallis* según la distribución de los datos con corrección de Dunn y se graficaron en graphpad prism 6. En el caso de GEO, las bases de datos se procesaron con la herramienta bioinformática GEOR2, la cual arrojó las expresiones diferenciales, por lo que, aquí sólo se recabó la información correspondiente a todos los miembros de la familia de genes *ZBTB*.

Los resultados obtenidos de los genes *ZBTB* diferencialmente expresados y con significancia estadística de la base de datos 1, se muestran en la figura 16. Las comparaciones se realizaron entre los grupos: VIH⁻ (n=3), VIH⁺ sin TAR (n=89), VIH⁺ con TAR (n=89) y CE (n=14).



En los genes *HIC1*, *ZBTB5*, *ZBTB17*, *ZBTB43* y *BCL6* se observan mayores niveles de expresión en los pacientes VIH⁺ con respecto a los controles, teniendo un comportamiento similar entre los 3 diferentes subgrupos VIH⁺. Por otro lado, *ZNF131*, *ZBTB4* y *ZBTB38* mostraron menores niveles de expresión en los pacientes VIH⁺ con respecto al grupo control. Ningún gen *ZBTB* mostró diferencias significativas entre los CE con otro grupo VIH⁺.

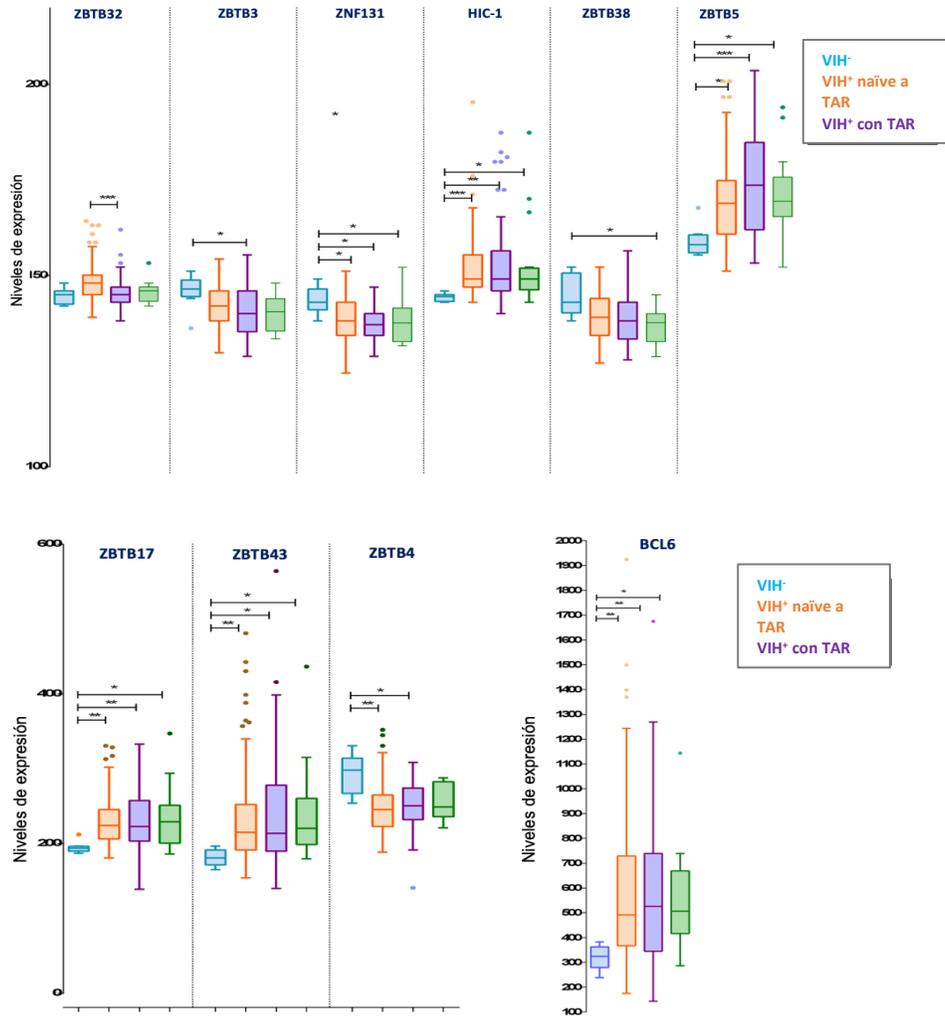


Figura 16. Niveles de expresión de los genes *ZBTB* de la base de datos 1. Comparación entre los grupos: VIH⁻ (n=3), VIH⁺ sin TAR (n=89), VIH⁺ con TAR (n=89) y CE (n=14). Se muestran sólo los resultados estadísticamente significativos (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001). Kruskal-Wallis con corrección de Dunn.



Base de datos 2. El análisis comparativo de los genes *ZBTB* entre los grupos de estudio (VIH^- ; n=9), (VIH^+ con TAR; n=9), (CE; n=14) mostró que los genes *ZBTB10*, *ZBTB43*, *ZBTB32*, *MYNN*, *GZF1*, *ZBTB5* y *BCL6* tienen un mayor nivel de expresión los pacientes VIH^+ con respecto al control, coincidiendo el comportamiento de *ZBTB5* y *BCL6* con los resultados obtenidos en el experimento 1. Mientras que *ZBTB7B*, *ZBTB40* y *ZBTB48* mostraron un menor nivel de expresión en los VIH^+ con respecto a los VIH^- . *ZBTB11*, *ZBTB39*, *ZBTB9*, *ZBTB17*, *ZBTB3*, *HIC1* y *ZNF131* tuvieron un nivel significativamente mayor el grupo VIH^+ con TAR vs. el control, mientras que, en el grupo de CE se observa como *ZBTB17*, *ZBTB3*, *HIC1* y *ZNF131* tienen niveles de expresión similares al grupo VIH^- (Fig. 17 y 18).

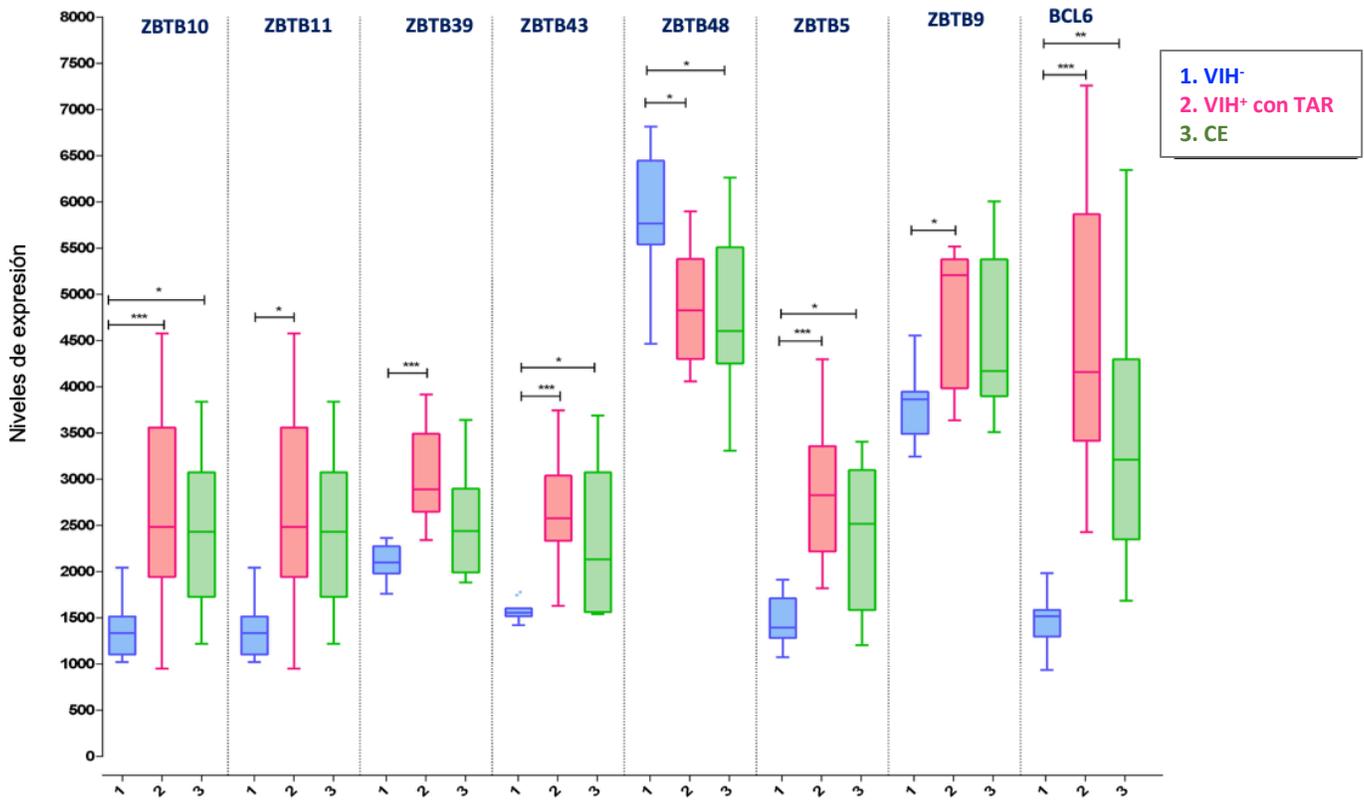


Figura 17. Niveles de expresión de los genes *ZBTB* de la base de datos 2. Grupos: VIH^- (n=9), VIH^+ con TAR (n=9) y CE (n=14). Se muestran sólo los resultados estadísticamente significativos (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). Kruskal-Wallis con corrección de Dunn.

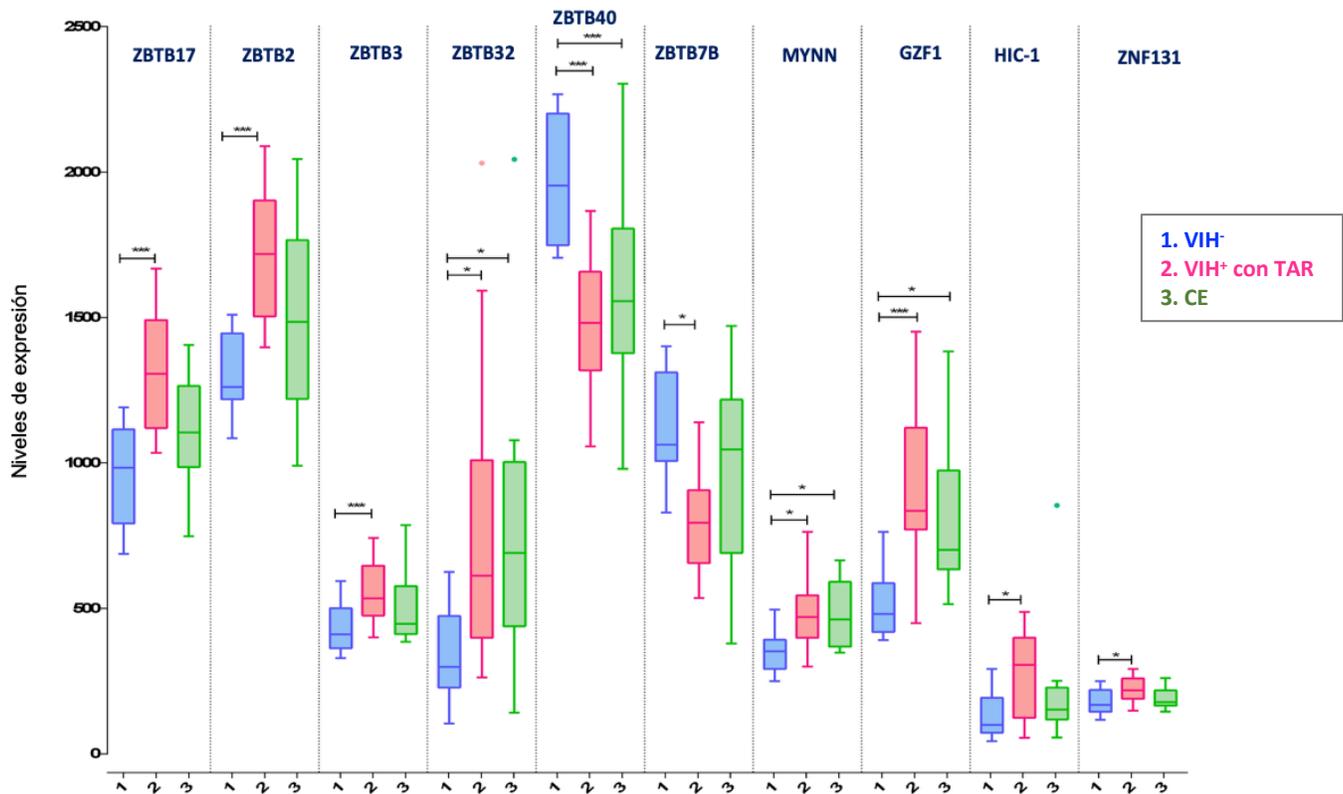


Figura 18. Niveles de expresión de los genes ZBTB de la base de datos 2.

Grupos: VIH⁻ (n=9), VIH⁺ con TAR (n=9), VIH⁺ y CE (n=14). Se muestran sólo los resultados estadísticamente significativos (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001). Kruskal-Wallis con corrección de Dunn.

Las bases de datos 3 y 4 fueron analizados con la herramienta en línea GEOR2, que permite la comparación de 2 o más grupos, obteniendo así los genes diferencialmente expresados, sin mostrar si estos mostraban una sobre o subexpresión. De las bases de datos que contenían la totalidad de los genes, se seleccionó la información referente a la expresión de los genes de interés (genes ZBTB).

Base de datos 3. Comparación de linfocitos T CD4⁺ de memoria central (LT CD4⁺_{MC}) de pacientes VIH⁺ (n=3) y LT CD4⁺_{MC} de personas VIH⁻ (n=3). Los genes ZBTB10^{***}, ZBTB21^{***}, ZBTB38^{***}, ZBTB5^{**}, ZBTB48^{**}, ZBTB7C^{**}, ZBTB6^{*}, ZBTB7B^{*}, ZBTB40^{*}, ZBTB49^{*} (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001), mostraron diferencias significativas en la expresión en LT CD4⁺_{MC} de pacientes VIH⁺ con respecto a los VIH⁻. Cabe señalar que el gen ZBTB5 se presenta como un factor común entre los experimentos previamente analizados, aunque en este caso no fue posible determinar si se encontraba sub o sobreexpresado.



En la base de datos 4, se analizaron datos de pacientes VIH⁺ que iniciaron TAR en la fase aguda de la infección (n=8), pacientes que iniciaron TAR en la fase crónica (n=10) y CE (n=10). El gen *ZBTB12** mostró diferencias significativas entre el grupo VIH⁺ agudos con TAR y el grupo de CE, mientras que *ZBTB33*** , *ZBTB7C*** , *ZBTB18** (*p<0.05,**p<0.01;***p<0.001), mostraron diferencias significativas entre el grupo VIH⁺ crónico con TAR y el grupo de CE. En la figura 19 se presenta un resumen de los experimentos analizados, así como los genes expresados diferencialmente con significancia estadística.

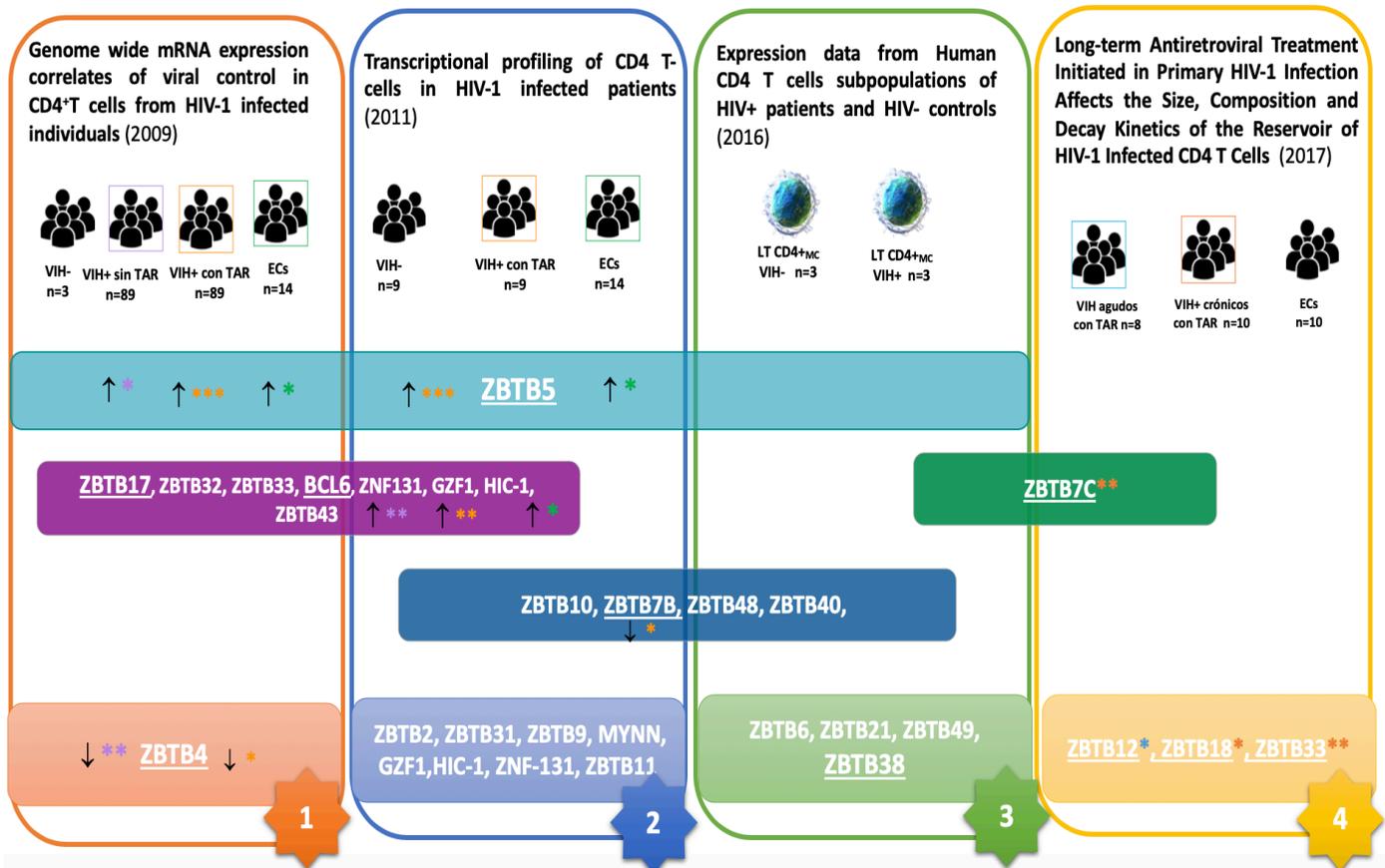


Figura 19. Resumen de resultados de las bases de datos 1, 2, 3 y 4. Esquema representativo de los genes diferencialmente expresados con significancia estadística entre los grupos de estudio de cada experimento. Se presenta el nombre de la base de datos y año que fue puesta a disposición en GEO y/o SIDRA, así como las características de los grupos de estudio (tipos de pacientes y “n”). Las barras de colores representan la concordancia de los genes diferencialmente expresados entre las bases de datos. Se observa que el gen *ZBTB5* fue diferencialmente expresado en 3 de las 4 bases de datos analizadas, por lo que se incluyó para nuestras determinaciones. De acuerdo con los objetivos de este estudio y a la información arrojada por este análisis *in silico* de los diversos experimentos, en conjunto con la revisión bibliográfica de la familia de genes *ZBTB* se realizó la selección de genes para las mediciones experimentales en nuestro estudio.



Con base a estos resultados provenientes de experimentos con grupos similares al propuesto por nuestro grupo de trabajo, además de una exhaustiva revisión bibliográfica de acuerdo con nuestra pregunta de investigación, se seleccionaron los genes para investigarlos bajo nuestras condiciones de estudio:

Genes: *ZBTB2*, *ZBTB4*, *ZBTB5*, *ZBTB7A*, *ZBTB7B* (*ThPOK*), *ZBTB16*, *ZBTB17*, *ZBTB27* (*BCL6*), *ZBTB29* (*HIC1*) y *ZBTB38* (Fig.20).

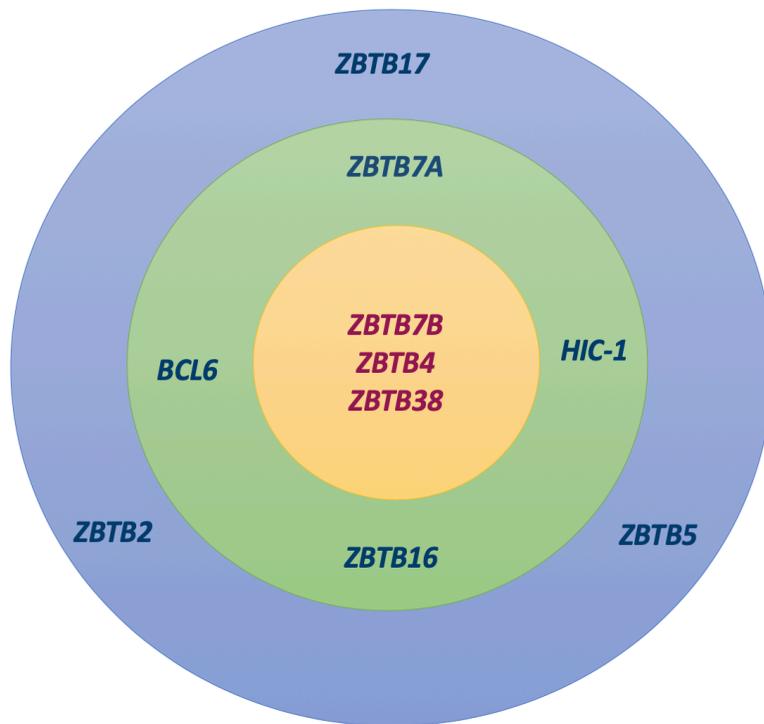


Figura 20. Esquema representativo de los genes *ZBTB* seleccionados. Los genes *ZBTB* del centro (amarillo) hacia afuera, representa el nivel de interés de acuerdo con nuestros objetivos de estudio. La selección fue realizada con base al análisis de diferentes bases de datos y la revisión bibliográfica previa.



3. Análisis *in silico*: Factores transcripcionales ZBTB y genoma del VIH-1 HXB2

La información referente a la interacción entre los represores transcripcionales ZBTB y el VIH es escasa, por lo que con el objetivo de obtener más información que pudiera sustentar las posibles interacciones entre los represores ZBTB de interés y el VIH-1, se hizo un análisis *in silico* para determinar los posibles sitios de unión de estos represores al genoma de referencia VIH-1 HXB2 (Fig. 21). Para ello se realizó una revisión bibliográfica, así como la consulta de diversas bases de datos: *Human Genes Data Base (genecards.org)*, *UniProt (Uniprot.org)* y *The Human Protein Atlas (proteinatlas.org)* con el objetivo de identificar las secuencias de unión reportadas para cada uno de los siguientes factores transcripcionales de estudio: ZBTB2, ZBTB4, ZBTB5, ZBTB7A, ZBTB7B, ZBTB16, ZBTB17, BCL6, HIC1 y ZBTB38, cuyos genes fueron previamente seleccionados. Es relevante mencionar que, aunque el alcance de este estudio se limita a la expresión génica, los resultados de este análisis *in silico* podrían ayudar a hipotetizar posibles mecanismos de interacción entre las proteínas codificadas por los *genes ZBTB* y el VIH-1.

El primer análisis realizado fue la secuencia del DNA a la que se alinea el factor transcripcional ZBTB7A, ya que experimentalmente se ha demostrado que se une de manera específica a una región del VIH-1 denominada inductor de transcritos (IST) cortos (-5 a +26), cuya secuencia corresponde a ACTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAG de 30 nt (Sheldon et al., 1993). El resultado arrojado en nuestro análisis *in silico* fue que el FT ZBTB7A tiene un posible sitio de unión a la región LTR del VIH-1 en la posición 451-481, que es el que describe Sheldon y col. como generador de mRNAs del VIH de solo 59nt. Este resultado ayuda a dar validez a la información encontrada por esta herramientas bioinformática con lo reportado experimentalmente.

Otro FT de interés fue ZBTB4 que estructuralmente está formada por un dominio BTB y 8 dedos de zinc, 3 de estos 8 dedos de zinc dan origen a una estructura altamente conservada, que reconoce secuencias con gran especificidad, es decir, puede reconocer secuencias en el DNA que contienen dos dinucleótidos CpG metilados consecutivos (CGCG); además de



reconocer la secuencia consenso no metilada denominada *Kaiso binding site* (KBS), TCCTGCNA en donde “N” puede ser cualquier nucleótido (A, T, C o G) (Filion et al., 2006). Para este represor, en el análisis *in silico* se encontró que existen 4 uniones a KBS, cuyas posiciones y variación del nucleótido “N” se pueden observar en la tabla 9. Además, de dos posibles alineamientos entre la secuencia CGCG metilada del VIH y el represor ZBTB4.

El FT BCL6, tiene una secuencia óptima de unión de TTTNNGNATNCTTTCNAGG(A/G)AT de 24 nt, en el análisis realizado obtuvimos 0/0 coincidencias, esto podría estar relacionado a que, en el artículo donde describe la secuencia (Baron et al., 1997), se reporta que no todos los nucleótidos establecen una unión en el DNA, aunque ellos demuestran que *in vitro* la unión a esta secuencia si es factible. Esto podría ser debido a la extensa cantidad de nucleótidos unidos que darían estabilidad de unión, aunque la secuencia no sea del todo complementaria. Por tanto, la especificidad en la coincidencia de los nucleótidos con la que se hizo este análisis en UGENE, no permite el reconocimiento de la secuencia. Aquí se muestra la secuencia y en otro color están representados los nucleótidos que tienen complementariedad con la secuencia de referencia del VIH-1.

TTTNNNGN**N**ATNCTTTCNAGG(A/G)AT

Ha sido descrito que HIC1 interacciona con la proteína Tat en las células microgliales, llevando a la represión de la transcripción del VIH. Esta tiene una secuencia de unión óptima [CG]NG[CG]GGGCA[CA]CC, sin embargo, hay un núcleo principal (GGGCAACC) que se ha demostrado se une *in silico* e *in vitro*, por lo que inicialmente se probó con la secuencia óptima y no se obtuvo coincidencia, por lo que, se realizaron variaciones respetando el núcleo principal resultando la unión en 4 diferentes sitios (Tabla 10).

El factor transcripcional ZBTB38 tiene un comportamiento similar a ZBTB4, los dos son dependientes de DNA metilado y tienen el dominio *Kaiso*, por lo que en la tabla 9 se encuentran las secuencias y posiciones ya descritas para ambos. Adicional a eso, ZBTB38 se une a la secuencia CACGTG en cada una de las cadenas del DNA.



Con respecto al FT ZBTB16 se encontró 1 sitio de unión en la secuencia TACTGTAC en la posición 2470 a 2477 de la cadena molde (3' - 5').

En lo que respecta a los FT ZBTB2, ZBTB5, ZBTB7B y ZBTB17 no se encontraron reportes de sus secuencias consenso, sin embargo, se sabe que el FT ZBTB2 compite con SP1 por su sitio de unión (Jeon et al., 2009a).

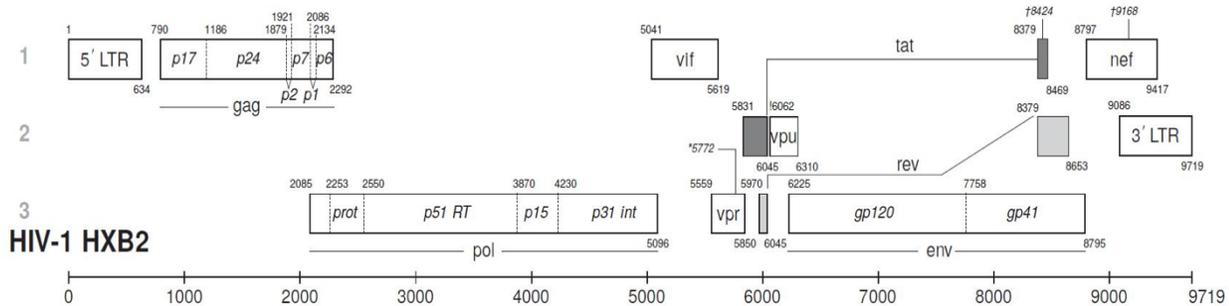


Figura 21. Representación esquemática del genoma del VIH-1 HXB2 compuesto por 9719pb, en donde la región reguladora 5'LTR y 3'LTR comprenden las posiciones 1-634 y 9086-9719 respectivamente; las regiones codificantes están comprendidas en las posiciones 790-9168 abarcando los 3 genes principales gen *gag* (790-2292), gen *pol* (2358-5096) y gen *env* (6046-8378).

Tabla 9. Secuencias consenso *Kaiso binding site* (KBS) y *CpG* metilados presentes en genoma del VIH-1 HXB2 y que son reconocidas por FT ZBTB.

Gen ZBTB	Secuencia consenso	Posición 5'-3'	Posición 3'-5'	Referencia
ZBTB4,	Secuencia KBS: TCCTGCNA			(Filion et al., 2006).
ZBTB22,	TCCTGCAA		4012-4005	
ZBTB32,	TCCTGCTA		1503-1496, 4547-4540	
ZBTB33,	TCCTGCCA		5978-5971	
ZBTB34,	Secuencia DNA metilado: CGCG			
ZBTB38	CGCG	712-715	715-712	



Tabla 10. Secuencias consenso dentro del genoma del VIH-1 HXB2 reconocidas por los FT ZBTB.

Gen <i>ZBTB</i>	Secuencias consenso	No. sitios	5'-3'	3'-5'	Referencia
<i>ZBTB7A</i>	ACTGGGTCTCTCTGGT_ TAGACCAGATCTGAG	1	451-481	-	<i>Morrison et al., 1999</i>
<i>ZBTB16</i>	TACTGTAC	1	-	2477-2470	(Ivins et al., 2003)
<i>BCL6</i>	TTTNNNGNATNC TTTCNAGG(A/G)AT	0	-	-	(Baron et al., 1997)
<i>HIC1</i>	GGGCACCC	1	-	3680-3623	(Pinte et al., 2004)
	GGGGCACA	1	-	6876-6883	
	CGGGCACA	2	-	566-559, 9651-9644	
<i>ZBTB38</i>	CACGTG	1	9373-9378	9378-9373	(Filion et al., 2006). Uniprot

4. Determinación de los niveles de expresión de los genes *ZBTB*

Se realizó la determinación de los niveles de expresión relativa de los genes *ZBTB* seleccionados en LT CD4⁺ de los diferentes grupos VIH⁺ (PCTx, PNTx y CE) y VIH⁻. En donde al menos 9 sujetos de cada grupo, tuvo una cuantificación de los niveles de expresión de los 10 genes, al igual que los 5 controladores de élite.

4.1 Gen *ZBTB7A*

Diversas investigaciones describen al FT *ZBTB7A* como un represor transcripcional del VIH-1 por unión directa a la región LTR (Pessler et al., 1997), por lo que fue de nuestro interés caracterizarlo en nuestras poblaciones de estudio como una referencia. Observamos que los niveles de expresión del gen *ZBTB7A* en los pacientes VIH⁺ vs. VIH⁻ fueron similares. Al realizar la subclasificación de los grupos se pudo visualizar de manera más clara su comportamiento; observamos que el grupo de controladores de élite mostró un incremento significativo de hasta 12.2 veces más al compararlo contra el grupo VIH⁻ ($p < 0.05$) y contra el grupo naïve a TAR ($p < 0.05$). Los grupos VIH⁺ naïve y con TAR tuvieron una tendencia al incremento de los niveles de expresión con respecto a los VIH⁻ (Fig.22).

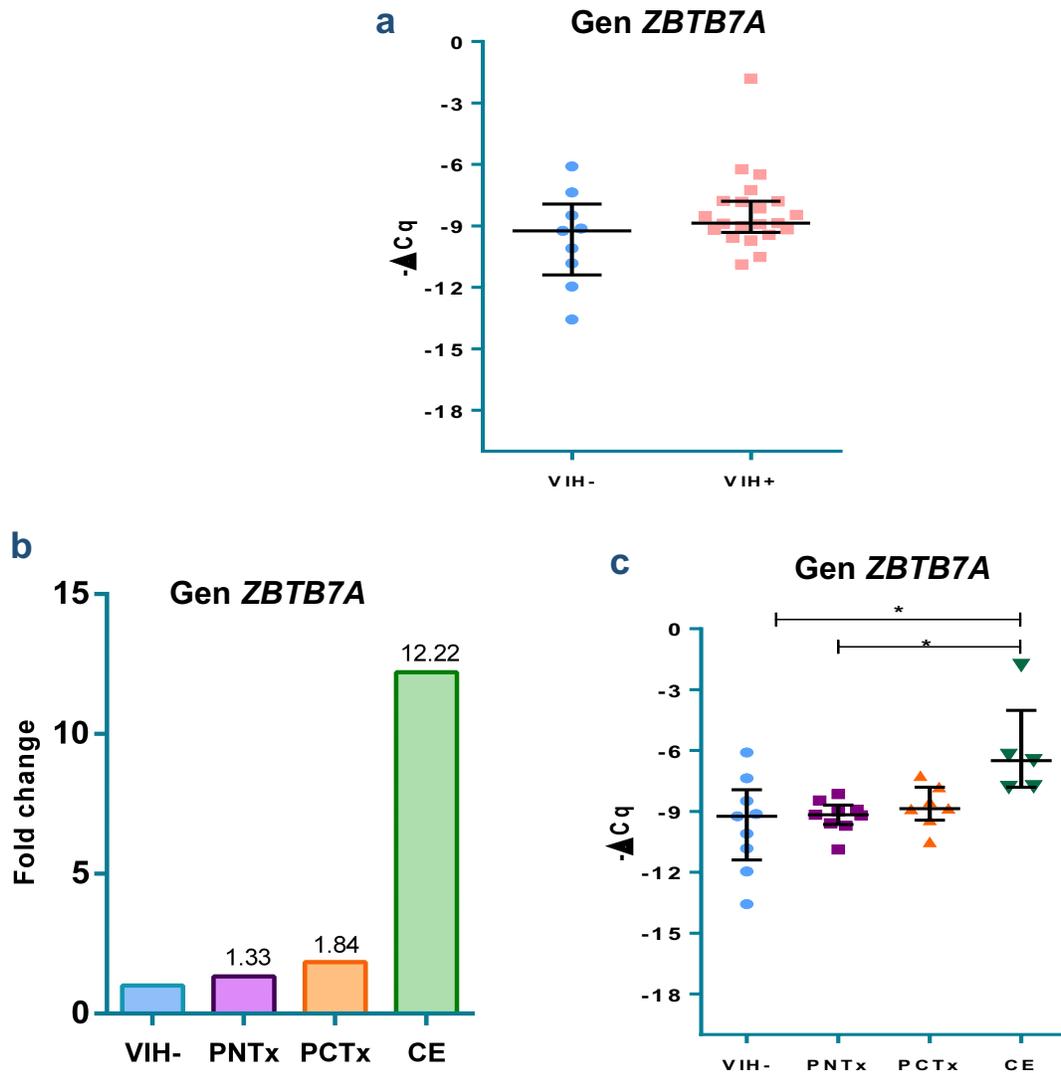


Figura 22. Gráficas de los niveles de expresión del gen ZBTB7A. a) Al comparar a los sujetos VIH⁺ vs. VIH⁻ se observó un comportamiento similar en los niveles de expresión. b y c) Cuando se analizan los datos por grupos se aprecia una tendencia en el incremento de los niveles de expresión en los grupos VIH⁺, siendo significativa en los CE vs. VIH⁻ (p<0.05) e incluso CE vs PNTx. (p<0.05). Kruskal-Wallis con corrección de Dunn. (* p<0.05). Método relativo de expresión a y c) $-\Delta Cq$; b) $2^{-\Delta\Delta Cq}$.



4.2 Gen *ZBTB29* (*HIC1*)

El gen hipermetilado en cáncer 1 (*HIC1*), es un gen supresor de tumores, su hipermetilación o delección se ha asociado con el desarrollo de algunos tipos de cáncer. En las células microgliales *HIC1* interacciona con Tat y reprime la transcripción del VIH-1 (Deltour, Guerardel, & Leprince, 2002; Le Douce et al., 2016). Sin embargo, la expresión de *HIC1* en LT CD4⁺ periféricos en el contexto VIH, no ha sido caracterizada. En este estudio encontramos que la expresión del gen *HIC1*, mostró un comportamiento similar en los niveles de expresión entre las personas VIH⁺ vs. VIH⁻ (Fig. 23). Al realizar el subanálisis entre grupos, se logró apreciar un comportamiento heterogéneo entre los grupos VIH⁺; el grupo de CE tuvo un incremento significativo en comparación con el grupo con TAR ($p < 0.01$); en el grupo de PNTx se observaron niveles similares a los VIH⁻; mientras que, en los PCTx mostró una disminución en la expresión (Fig. 24).

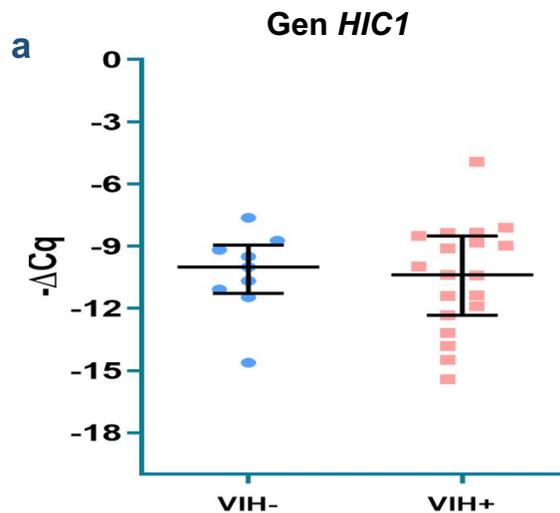


Figura 23. Gráficas de los niveles de expresión del gen *HIC1*. a) Se observó un comportamiento similar en los niveles de expresión entre los sujetos VIH⁺ vs. VIH⁻. Kruskal-Wallis con corrección de Dunn. Método relativo de expresión $-\Delta Cq$.

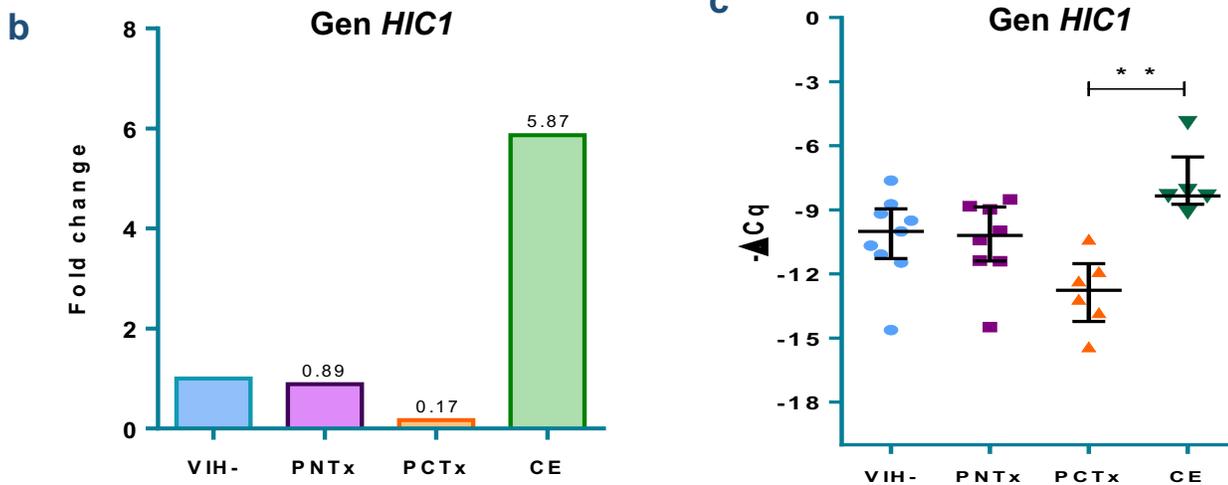


Figura 24. Gráficas de los niveles de expresión del gen *HIC1*. b y c) Los grupos subclasificados mostraron niveles de expresión heterogéneos; los PNTx tuvieron niveles similares a VIH⁺, PCTx mostraron niveles disminuidos mientras que los CE niveles incrementados de 5.87 veces más con respecto a los VIH⁻. Además, los niveles de los CE fueron significativamente mayores comparados con los PCTx ($p < 0.01$). Kruskal-Wallis con corrección de Dunn. (** $p < 0.01$). Método relativo de expresión b) $2^{-\Delta\Delta Cq}$ y c) $-\Delta Cq$.

4.3 Gen *ZBTB2*

Al realizar el análisis comparativo de los niveles de expresión del gen *ZBTB2* entre las personas VIH⁺ vs VIH⁻ no se encontraron diferencias (Fig. 25). Sin embargo, en la comparación entre los grupos VIH⁺ se observó, de manera interesante, un incremento significativo en la expresión en el grupo de controladores de élite comparado con los VIH⁻ de hasta 6.95 veces ($p < 0.05$), e incluso con respecto a los otros grupos VIH⁺ (PNTx; $p < 0.001$ y PCTx). Este resultado es relevante, ya que este factor transcripcional ha sido descrito como un activador de la proliferación celular (protooncogén), a través de la represión del gen p21, al competir por el sitio de unión (caja GC) en el promotor en donde se une Sp1 (Jeon et al., 2009a). Como antes se mencionó, la región LTR del VIH-1 contiene sitios de unión a SP1, por lo que un fenómeno de inhibición competitiva similar podría ocurrir al aumentar la expresión del gen *ZBTB2* (Fig.25).

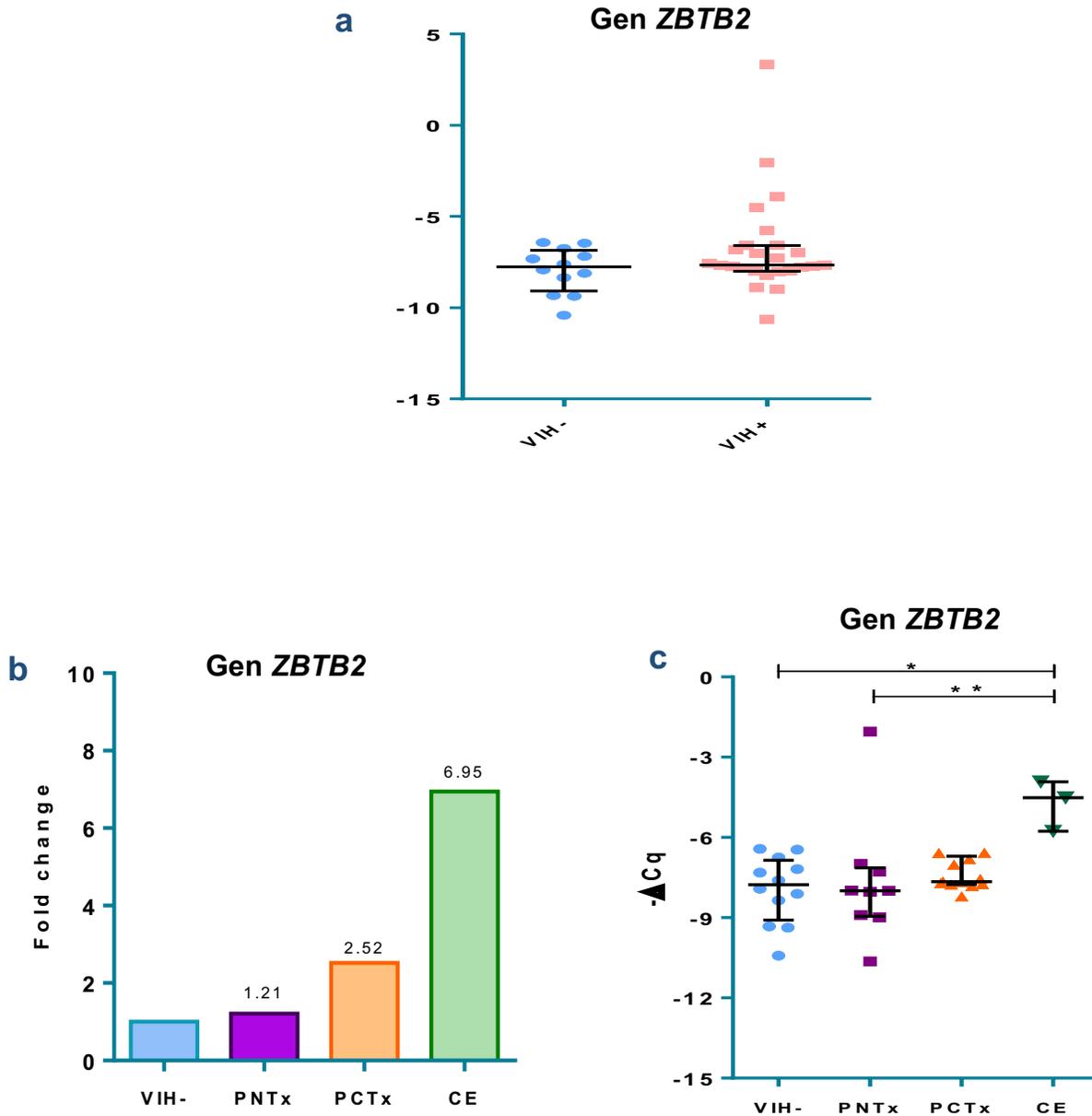


Figura 25. Gráficas de los niveles de expresión del gen ZBTB2. a) Los niveles de expresión entre los pacientes VIH⁺ y VIH⁻ no muestran diferencias significativas. b y c) Se observó como el grupo de controladores de élite tuvo 6.95 veces mayor expresión con respecto al grupo VIH⁻, e incluso mayor expresión comparados con los grupos VIH⁺ (PNTx;p<0.001 y PCTx). Kruskal-Wallis con corrección de Dunn. (* p<0.05; ** p<0.01). Método relativo de expresión a y c) $-\Delta Cq$; b) $2^{-\Delta\Delta Cq}$.



4.4 Gen ZBTB4

El factor transcripcional ZBTB4 ha sido descrito como un supresor de tumores, así como su sobreexpresión se ha asociado a la represión de SP1, SP3 y SP4; sin embargo, sus funciones continúan bajo investigación (Yang et al., 2014; Yu et al., 2018). Este factor transcripcional tiene la capacidad de unirse a secuencias CG metiladas y además cuenta con una secuencia KBS de unión a DNA (Filion et al., 2006). Encontramos que los niveles de expresión del gen ZBTB4 fueron mayores en los pacientes VIH⁺ comparado con el grupo VIH⁻ ($p < 0.001$) como se muestra en la Fig. 26; presentándose la mayor expresión en el grupo de controladores de élite, cuyo incremento fue significativo comparado con los VIH⁻ ($p < 0.05$), seguido del grupo naïve a TAR ($p < 0.05$) y finalmente los pacientes con TAR (Fig.27).

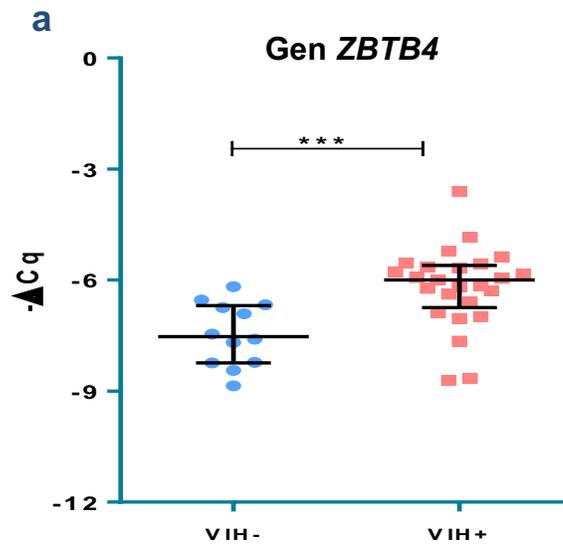


Figura 26. Gráficas de los niveles de expresión del gen ZBTB4. a) Se observó como el nivel de expresión es mayor en el grupo de VIH⁺ comparado con el grupo VIH⁻. Kruskal-Wallis con corrección de Dunn. (***) $p < 0.001$). Método relativo de expresión $-\Delta Cq$.

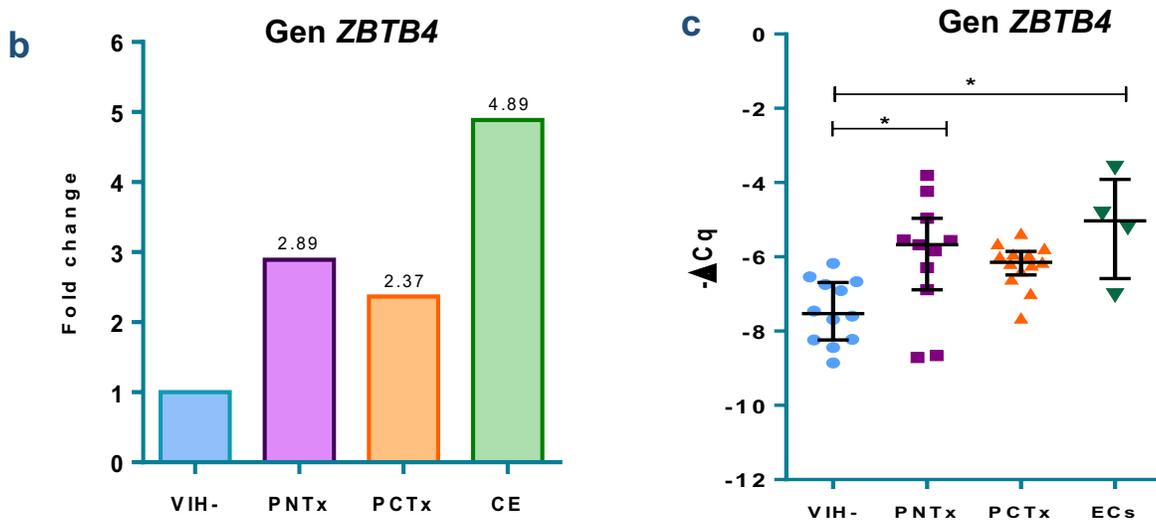


Figura 27. Gráficas de los niveles de expresión del gen ZBTB4. b y c) Al realizar el subanálisis se encontró que el grupo VIH⁺ PNTx; $p < 0.05$ y CE; $p < 0.05$ mostraban un incremento que resultó ser significativo con respecto a los VIH⁻. Kruskal-Wallis con corrección de Dunn. (* $p < 0.05$). Método relativo de expresión b) $2^{-\Delta\Delta Cq}$ y c) $-\Delta Cq$.

4.5 Gen ZBTB38

Con respecto al gen ZBTB38 se observó una mayor expresión en los pacientes VIH⁺ comparados con el grupo VIH⁻ ($p < 0.05$). El grupo controladores de élite mostró la mayor elevación ($p < 0.05$) de hasta 6.15 veces más comparado con los VIH⁻; el grupo con TAR también mostró un incremento de 2.12 veces más con respecto al grupo VIH⁻ ($p < 0.05$), ver Fig. 28. Este es un factor transcripcional que puede unirse a zonas metiladas (CpG), se le ha asociado a la replicación y reparación del daño del DNA (de Dieuleveult & Miotto, 2018). Es uno de los miembros de la familia ZBTB cuyas funciones no han sido totalmente caracterizadas y, por tanto, continúa bajo investigación.

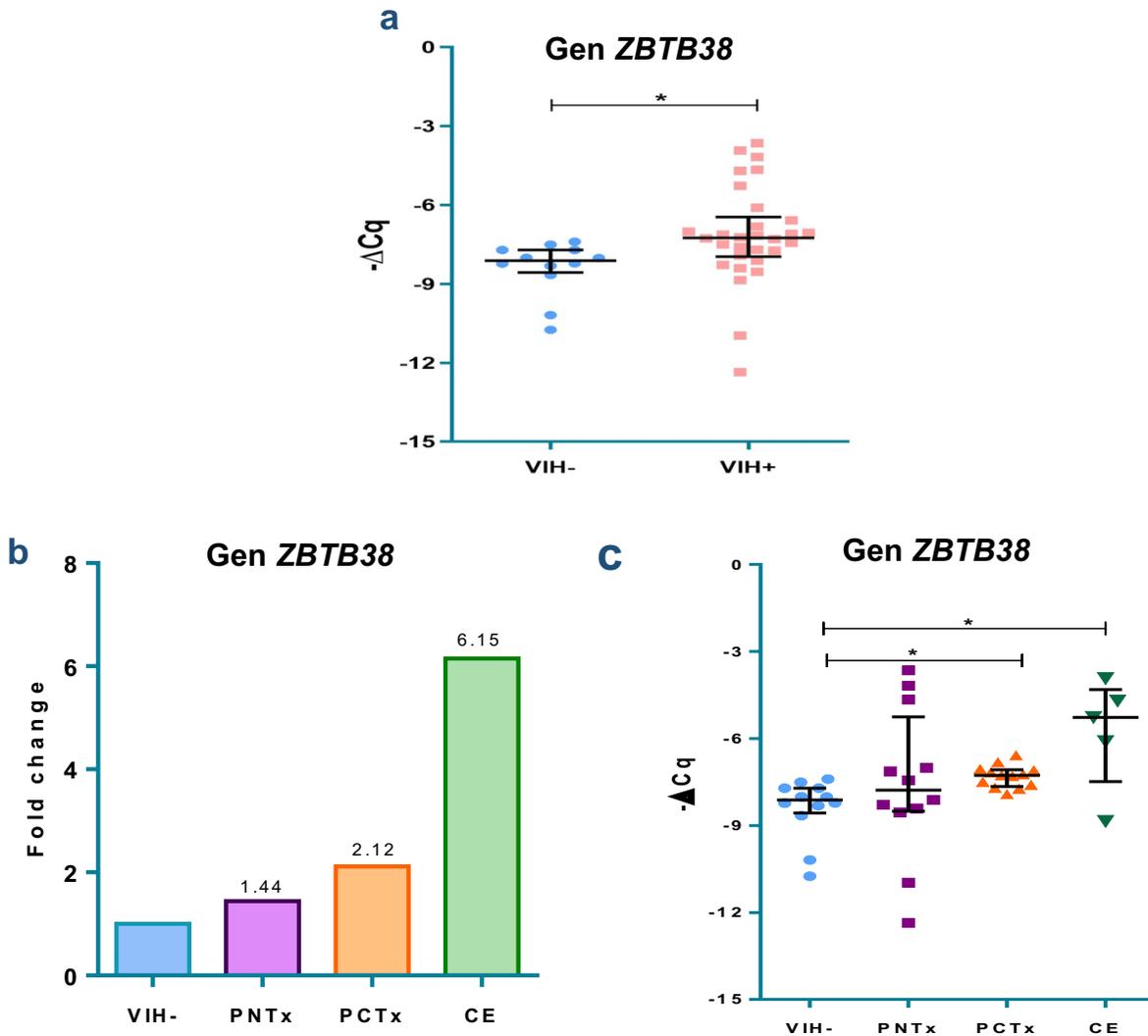


Figura 28. Gráficas de los niveles de expresión del gen *ZBTB38*. Se encontró una mayor expresión en los grupos VIH⁺ con respecto al grupo VIH⁻; PCTx y CE mostraron un aumento significativo de 2.12 y 6.15 respectivamente ($p < 0.05$) con respecto a los VIH⁻. Kruskal-Wallis con corrección de Dunn. (* $p < 0.05$). Método relativo de expresión a y c) $-\Delta Cq$; b) $2^{-\Delta\Delta Cq}$.

Es de notar que los mayores niveles de expresión de los genes que se unen a DNA metilado como *ZBTB2*, *ZBTB4* y *ZBTB38*, los mostraron los controladores de élite; este resultado es interesante ya que este grupo ha sido reportado con el mayor grado de metilación en la región 5'LTR del DNA proviral (Blazkova et al., 2009).



4.6 Gen *ZBTB7B*

El factor transcripcional *ZBTB7B* o también llamado ThPOK es codificado por el gen *ZBTB7B*, es un regulador maestro de la diferenciación del linaje LT CD4⁺ (Wildt et al., 2007) y recientemente se ha descrito como un factor transcripcional necesario para el establecimiento de los LT CD4⁺_M (Ciucci et al., 2019). Al realizar las determinaciones, se encontró que los niveles de *ZBTB7B* son mayores en los pacientes VIH⁺ con respecto al grupo VIH⁻ ($p < 0.001$), Fig. 29. Y que el grupo de controladores de élite mostró el mayor nivel de expresión con una significancia de $p < 0.001$ con respecto a los VIH⁻, seguido de los pacientes con TAR ($p < 0.05$) y finalmente los pacientes naïve a TAR (3.38, 3.11 y 2.59 veces más expresión, respectivamente), con respecto a los VIH⁻ (Fig. 30).

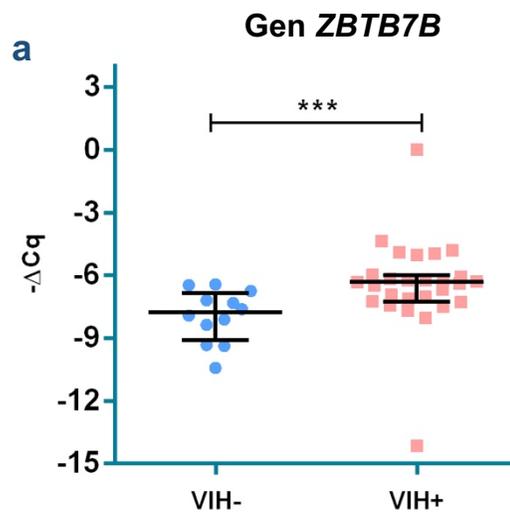


Figura 29. Gráficas de los niveles de expresión del gen *ZBTB7B*. Se encontró una mayor expresión en los grupos VIH⁺ con respecto al grupo VIH⁻ Kruskal-Wallis con corrección de Dunn. (***) $p < 0.001$). Método relativo de expresión $-\Delta Cq$.

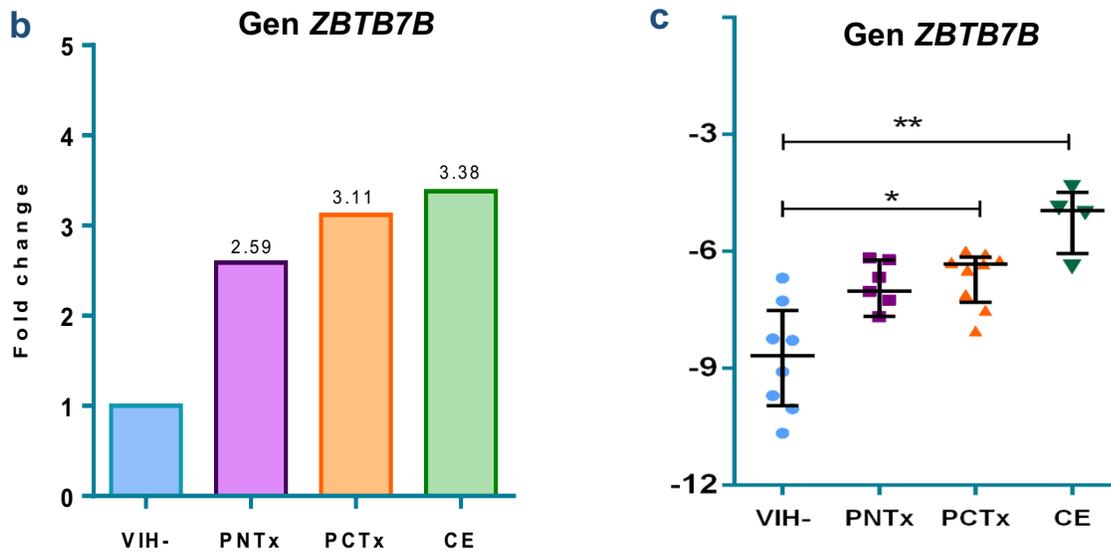


Figura 30. Gráficas de los niveles de expresión del gen ZBTB7B. b y c) Los niveles de los 3 grupos VIH⁺ son mayores comparados con el grupo VIH⁻. Se observó un aumento significativo en PCTx (p<0.05) y CE (p<0.01) con respecto a los VIH⁻. Kruskal-Wallis con corrección de Dunn. (* p<0.05; **p<0.01). Método relativo de expresión b) $2^{-\Delta\Delta Cq}$ y c) $-\Delta Cq$.

4.7 Gen ZBTB17

El factor ZBTB17, también llamado Miz-1 participa en la regulación de la señalización de la vía IL-7/IL-7R, vía que media la supervivencia y proliferación de linfocitos T de memoria. La expresión del gen ZBTB17, mostró una tendencia a una mayor expresión en los grupos VIH⁺ comparada con el grupo VIH⁻, sin embargo, esta no fue significativa (p =0.52). Al comparar los grupos se observó como el grupo naïve a TAR (p<0.05) y CE tuvieron 2.83 y 2.59 veces más respectivamente, al compararlos contra el grupo VIH⁻ (Fig. 31)

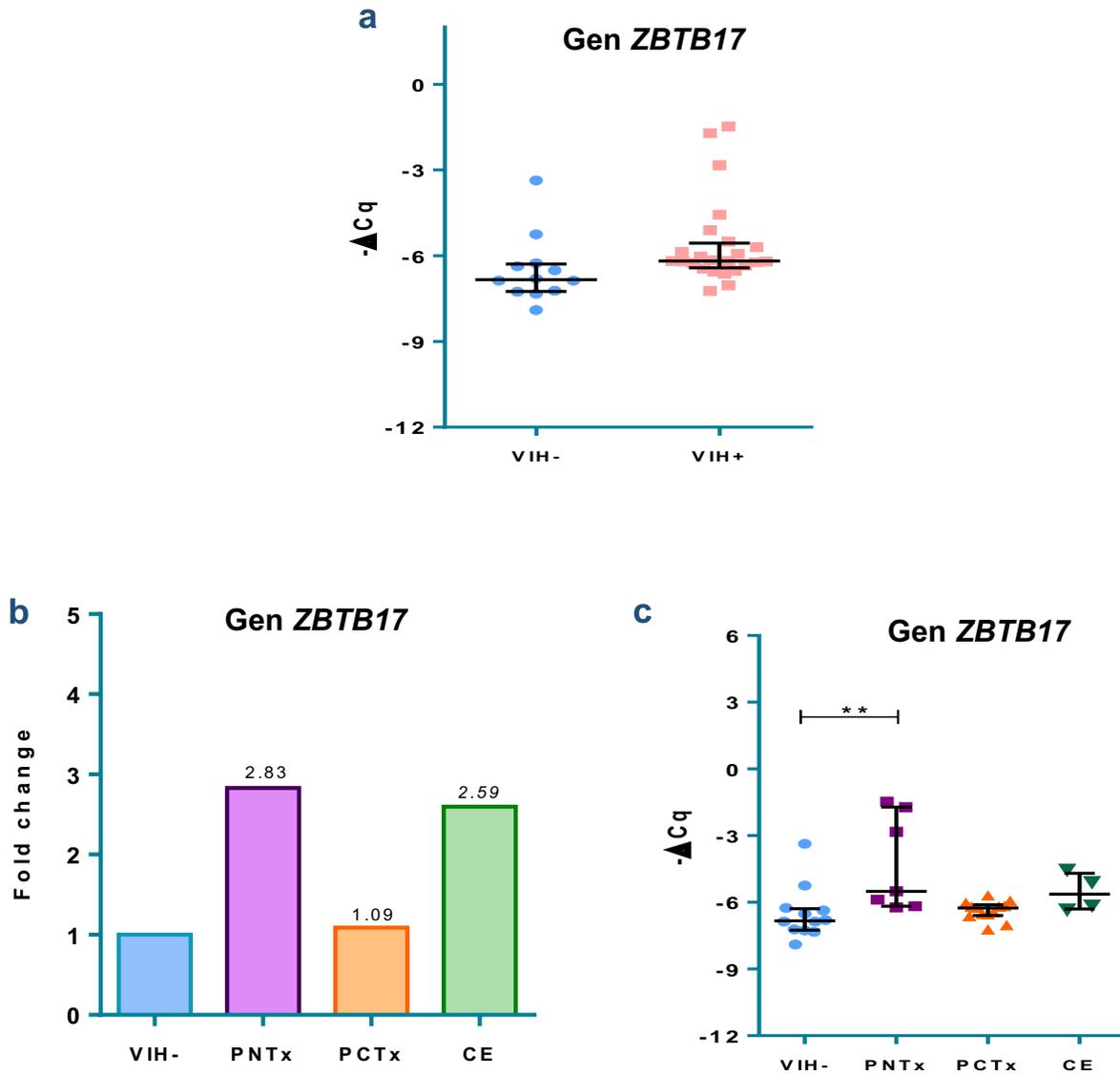


Figura 31. Gráficas de los niveles de expresión del gen *ZBTB17*. a) Los niveles de expresión del gen *ZBTB17* fueron mayores en los pacientes VIH⁺. b) y c) en la subclasificación de grupos VIH⁺, la expresión en los PNTx fue notablemente más elevada ($p < 0.05$), así como en los CE. Kruskal-Wallis con corrección de Dunn. (** $p < 0.01$). Método relativo de expresión a y c) $-\Delta Cq$; b) $2^{-\Delta\Delta Cq}$.



4.8 Gen ZBTB5

El represor ZBTB5 ha sido descrito como un protooncogén, que reprime al gen favoreciendo la progresión del ciclo celular (Koh et al., 2009). En cuanto a los niveles de expresión del gen ZBTB5, se observó una disminución en las personas VIH⁺ vs. VIH⁻ (Fig. 32). En la subclasificación de grupos los pacientes con TAR, así como, los controladores elite presentaban los menores niveles de expresión entre los grupos VIH⁺, aunque sin significancia estadística.

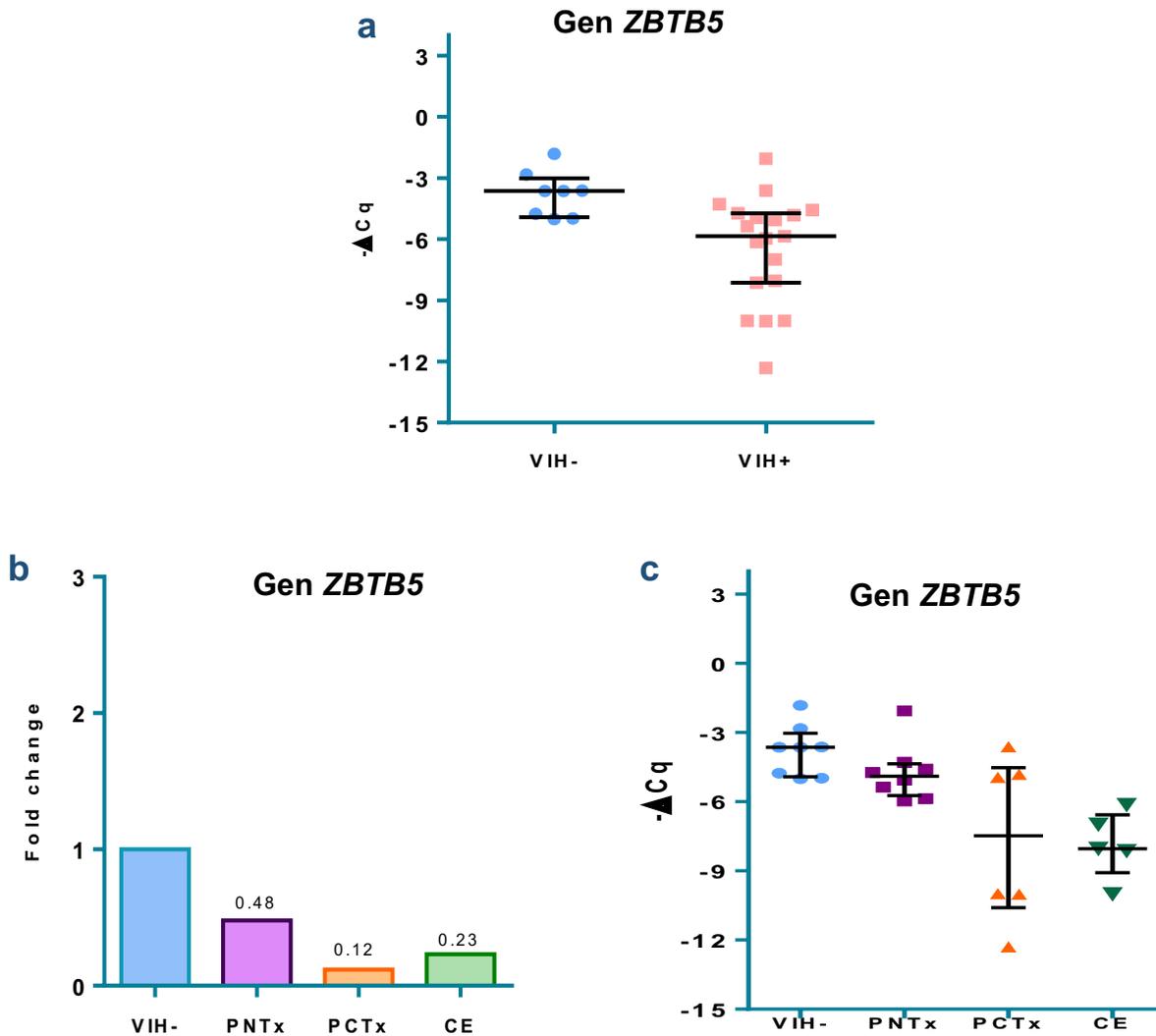


Figura 32. Gráficas de los niveles de expresión del gen ZBTB5.

a) Muestra una disminución en la expresión de ZBTB5 en los grupos VIH⁺ comparado con el grupo VIH⁻. b y c) En el subanálisis se encontró que el grupo VIH⁺ con TAR (PCTx) fue el que mostró la mayor disminución, aunque sin significancia estadística. Kruskal-Wallis con corrección de Dunn. Método relativo de expresión a y c) $-\Delta Cq$; b) $2^{-\Delta\Delta Cq}$.



4.9 Gen ZBTB16

Al determinar los niveles de expresión del gen *ZBTB16*, se observó una tendencia a la subexpresión en los grupos VIH⁺ ($p < 0.01$) con respecto al grupo VIH⁻. Al separarse en los diferentes grupos VIH⁺, se observó la disminución en la expresión en cada uno de ellos, siendo significativamente menor en los pacientes naïve a TAR (PNTx) con respecto al grupo VIH⁻ ($p < 0.01$), expresándose sólo 0.10 veces (Fig.33). Este gen se ha asociado con la presencia de la leucemia promielocítica aguda, sin embargo, su papel en VIH aún es desconocido.

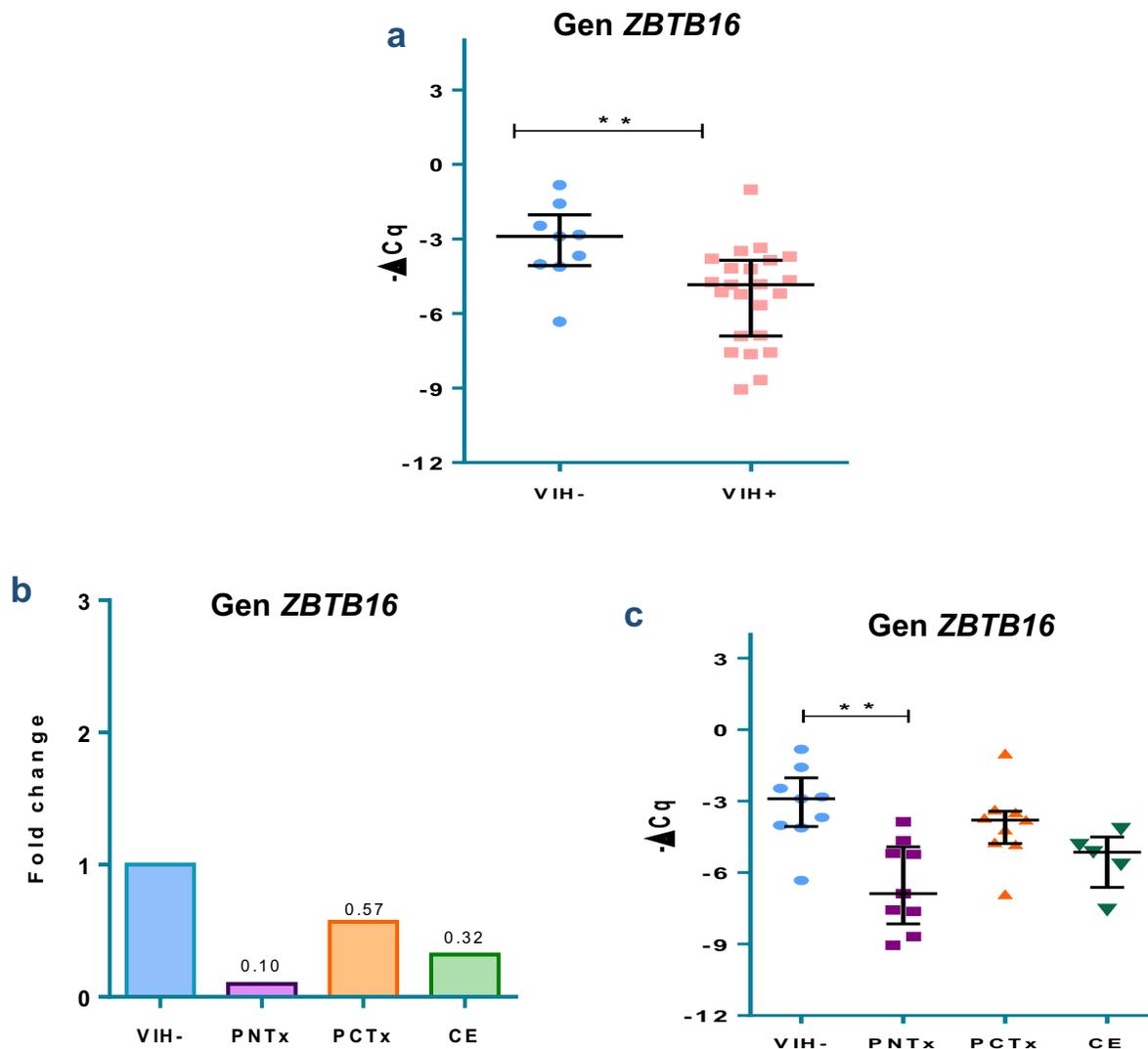


Figura 33. Gráficas de los niveles de expresión del gen *ZBTB16*. a) Los grupos VIH⁺ mostraron una tendencia a la subexpresión, b y c) siendo significativa en el grupo naïve a TAR ($p < 0.01$). Kruskal-Wallis con corrección de Dunn. (** $p < 0.01$). Método relativo de expresión a y c) $-\Delta Cq$; b) $2^{-\Delta\Delta Cq}$.



4.10 Gen *ZBTB27* (*BCL6*)

Se observa un comportamiento en el que disminuyen los niveles de expresión del gen *BCL6* en los pacientes VIH⁺ comparados con el grupo VIH⁻. Al realizar la comparación por grupos, se observó cómo los pacientes con TAR presentaron los menores niveles de sólo 0.17 veces comparado con el grupo VIH⁻ ($p < 0.05$), Fig. 34.

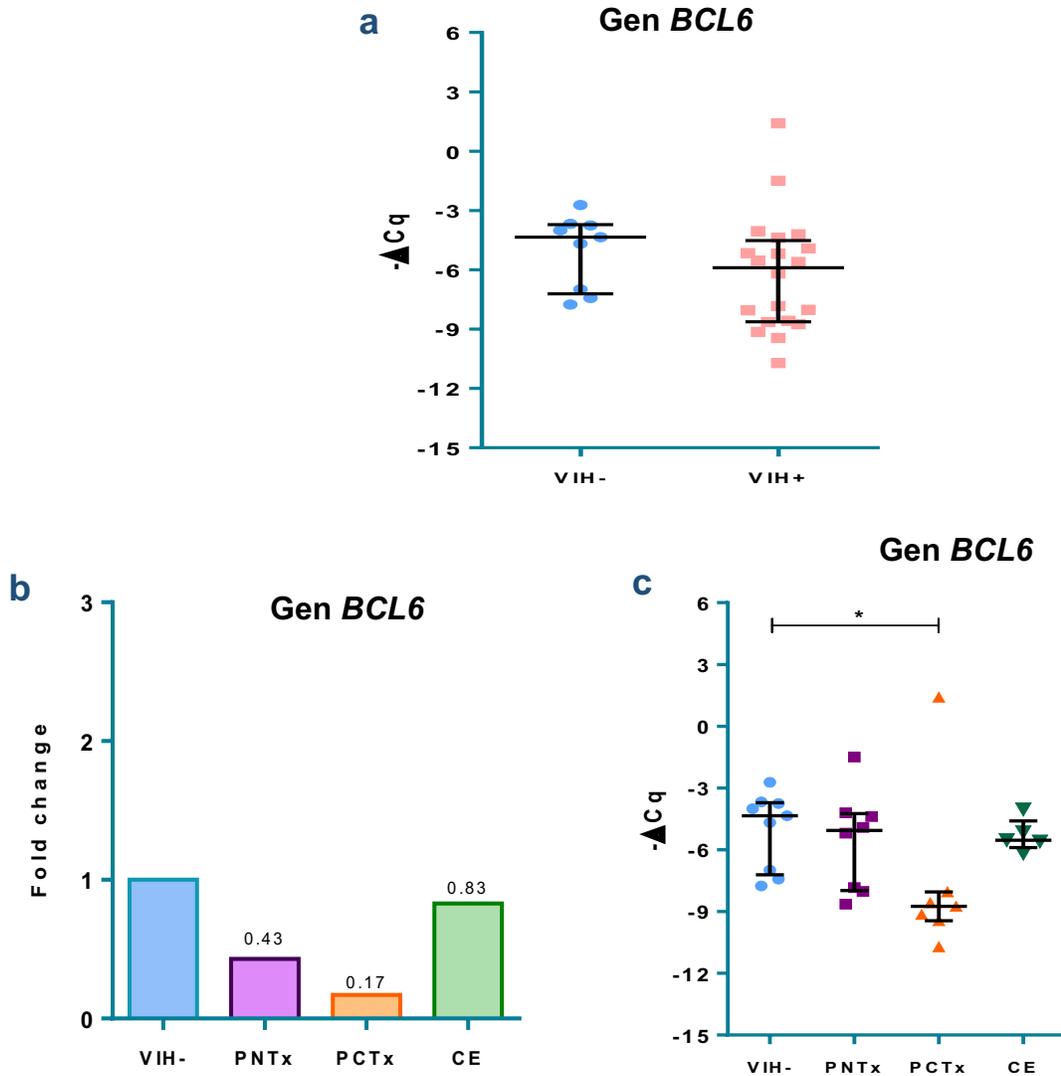


Figura 34. Gráficas de los niveles de expresión del gen *BCL6*. Se observó una tendencia a disminuir la expresión de *BCL6* en los pacientes VIH⁺, siendo significativa en los PCTx con respecto al grupo VIH⁻ ($p < 0.05$). Kruskal-Wallis con corrección de Dunn. (* $p < 0.05$). Método relativo de expresión a y c) $-\Delta Cq$; b) $2^{-\Delta\Delta Cq}$.



En la siguiente tabla se presenta un resumen de los genes *ZBTB* evaluados y sus perfiles de expresión en los grupos VIH⁺. Es de notar que, en la mayoría de los genes evaluados se observa un incremento en los grupos VIH⁺. Y de manera interesante, el grupo de los controladores de élite fue el que mostró mayor número de genes *ZBTB* incrementados y con significancia estadística. La elevada expresión de algunos de los genes *ZBTB* en los controladores de élite podría sugerir la presencia de un ambiente represivo en los LT CD4⁺, que podría tener un impacto en el silenciamiento génico, no sólo de los genes celulares, sino también de los genes virales.

Tabla 11. Perfil de expresión de los genes *ZBTB* en los grupos VIH⁺

Gen	Resumen de niveles de expresión			
	VIH ⁻	VIH ⁺ sin TAR (PNTx)	VIH ⁺ con TAR (PCTx)	Controladores de élite (CE)
Significancia estadística				
<i>ZBTB2</i>	-	≈	↑	↑
<i>ZBTB4</i>	-	↑	↑	↑
<i>ZBTB7A</i>	-	↑	↑	↑
<i>ZBTB7B</i>	-	↑	↑	↑
<i>ZBTB16</i>	-	↓	↓	↓
<i>ZBTB27 (BCL6)</i>	-	↓	↓	≈
<i>ZBTB29 (HIC1)</i>	-	≈	↓	↑
<i>ZBTB38</i>	-	↑	↑	↑
<i>ZBTB17</i>	-	↑	≈	↑
<i>ZBTB5</i>	-	↓	↓	↓

≈ aproximadamente iguales al grupo VIH⁻



5. Comparación de los niveles de expresión de los genes *ZBTB* entre pacientes con replicación viral activa y controlada

Con la finalidad de investigar si el perfil de expresión de los genes *ZBTB* es diferente en LT CD4⁺ con replicación viral activa y controlada, se realizó una comparación entre los pacientes naïve a TAR, el grupo con TAR y el grupo de controladores de élite. Para ello, se normalizó con los niveles de expresión de los genes *ZBTB* de los pacientes naïve a TAR. Los resultados mostraron que los pacientes con TAR tienen niveles de expresión similares al grupo naïve a TAR (veces cambio) de *ZBTB2* (1.52), *HIC1* (0.19), *ZBTB7A* (1.38), *ZBTB7B* (0.75) y *ZBTB4* (1.17) con excepción del gen *ZBTB38*, donde se observó un incremento de 2.83 veces cambio; mientras que los controladores de élite mostraron una mayor expresión (veces cambio) en los genes *ZBTB7A* (9.16), *ZBTB38* (7.60), *ZBTB2* (7.56), *HIC1* (6.61), *ZBTB7B* (2.56) y *ZBTB4* (2.56). Fig. 35.

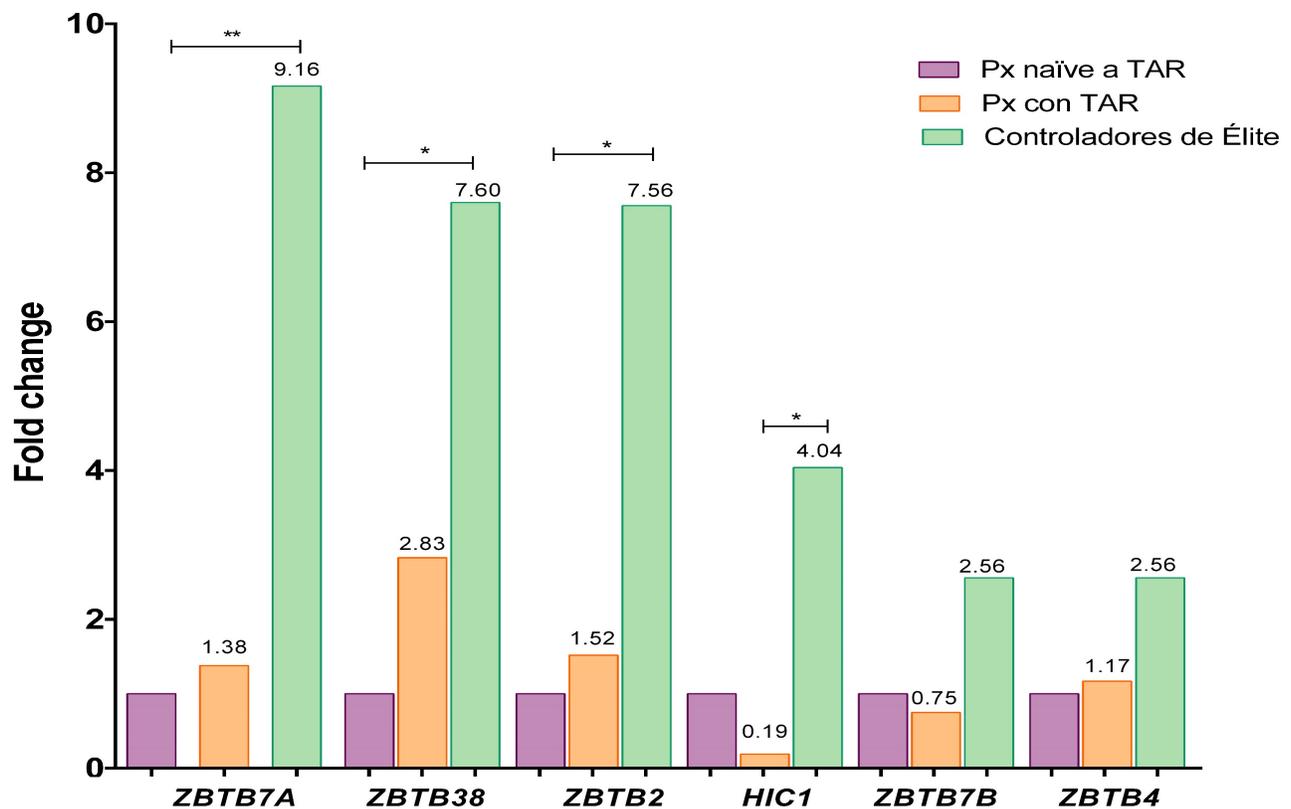


Figura 35. Niveles de expresión de los genes *ZBTB* pacientes con replicación viral activa y controlada.

Gráfico de barras que muestra la comparación entre controladores de élite, pacientes con TAR y pacientes naïve a TAR cuyos niveles fueron utilizados para normalizar a 1. Método relativo de cuantificación $2^{-\Delta\Delta Cq}$.



6. Determinación de citocinas proinflamatorias

La infección por VIH se caracteriza por profundas anormalidades que incluye la desregulación de la expresión de un gran número de citocinas que regulan la homeostasis del sistema inmune, además de participan en el control viral (Freeman et al., 2016). Durante el inicio de la infección, en los primeros 5 días tras la detección de la viremia, las primeras citocinas que se elevan son $IFN\alpha$ e IL-15, seguida por $TNF\alpha$, $IFN\gamma$ e IL-12. Después de esta gran liberación inicial de citocinas proinflamatorias, se observa una respuesta antiinflamatoria con un pico retardado de producción de IL-10, seguido de la elevación del receptor de IL-1 (IL-1RA), respuesta que caracteriza la transición de la fase aguda a la fase crónica. Esta respuesta inmunomoduladora contribuye a disminuir la activación celular y la producción de partículas virales, creando así, la condición inmuno-viológica necesaria para el establecimiento de células infectadas de forma latente (Vandergeeten, Fromentin, & Chomont, 2012).

Basado en lo anterior y en reportes en los que se describe a BCL6, como un FT que participa en la regulación de citocinas como IL-18, IL-4 e IL-5 en modelos murinos (Arima et al., 2014; Takeshi Tokuhisa Okada et al., 2003), se decidió realizar la cuantificación de citocinas séricas con el panel de 13 citocinas y quimiocinas proinflamatorias en muestras de suero de pacientes VIH⁺ y controles sanos con el Kit LEGENDplex™ Human Inflammation Panel (Fig. 36-38).

Los resultados mostraron un incremento en la concentración de citocinas en suero en los pacientes VIH⁺; de manera relevante, el grupo de controladores de élite mostró elevación en la mayoría de ellas, siendo significativo su incremento en los niveles de IL-1 β ($p<0.01$), IL-23 ($p<0.05$) e IL-33 ($p<0.01$) comparado con el grupo VIH⁻. Contrario a lo que esperábamos, las personas VIH⁺ con TAR fue el segundo grupo en mostrar una elevada concentración de citocinas, siendo significativas $IFN-\gamma$ ($p<0.05$), IL-23 ($p<0.01$) e IL-33 ($p<0.01$) comparadas con el grupo VIH⁻. Incluso los niveles de $IFN-\gamma$ fueron mayores en las personas tratadas, que en los no tratados ($p<0.05$).

Cabe mencionar que en el caso de $TNF-\alpha$ en la mayoría de los sujetos de los tres grupos, las cuantificaciones estuvieron por debajo del límite de detección (1.8 ng/mL) limitando la comparación de esta citocina.

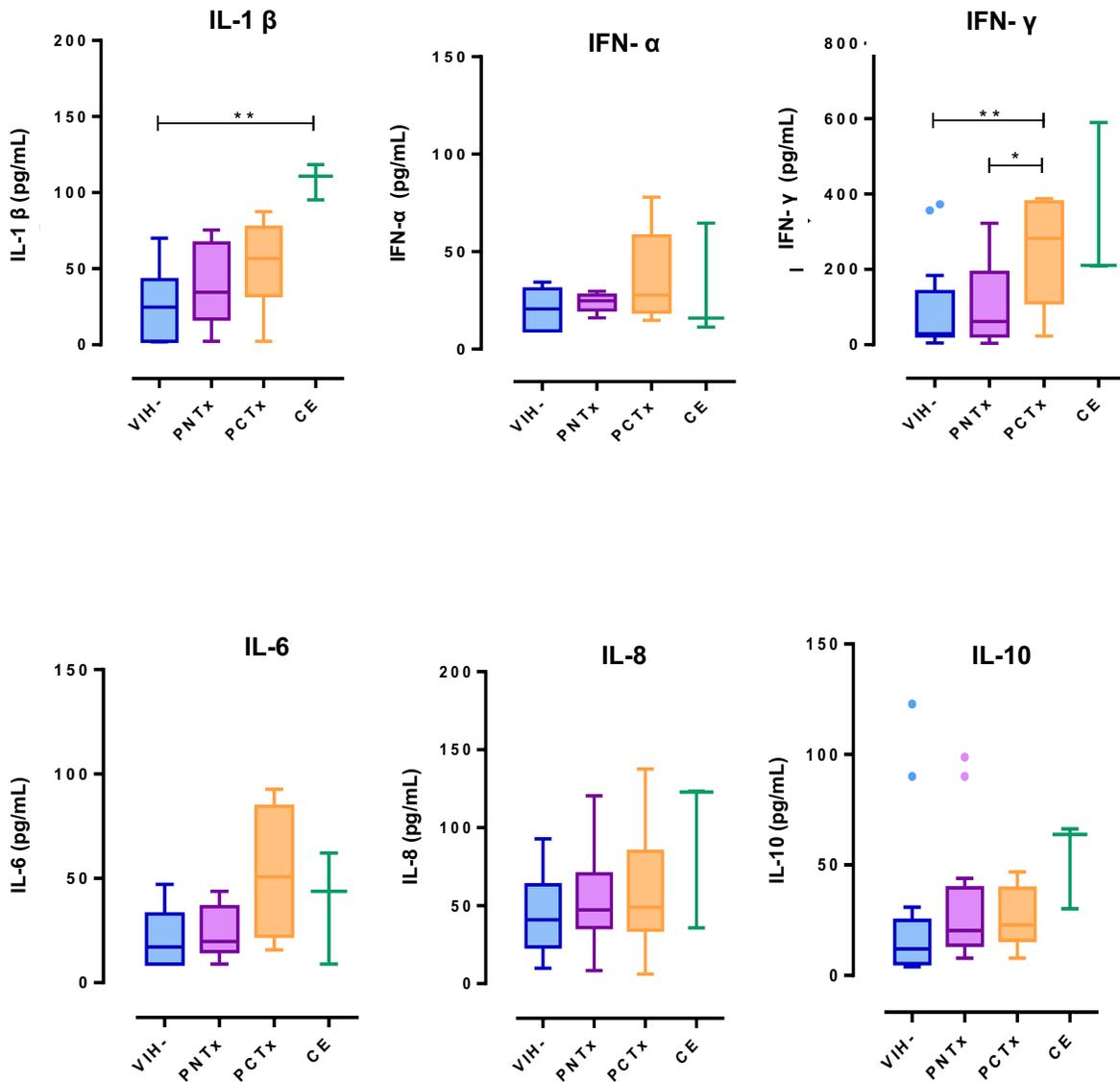


Figura 35. Citocinas y quimiocinas proinflamatorias. Comparación de las concentraciones de citocinas y quimiocinas (pg/mL) entre los diferentes grupos: VIH⁻ y VIH⁺ (PNTx: pacientes naïve a TAR; PCTx: pacientes con TAR; CE: controladores de élite).Kruskal-Wallis con corrección de Dunn. (** p<0.01;* p<0.05).

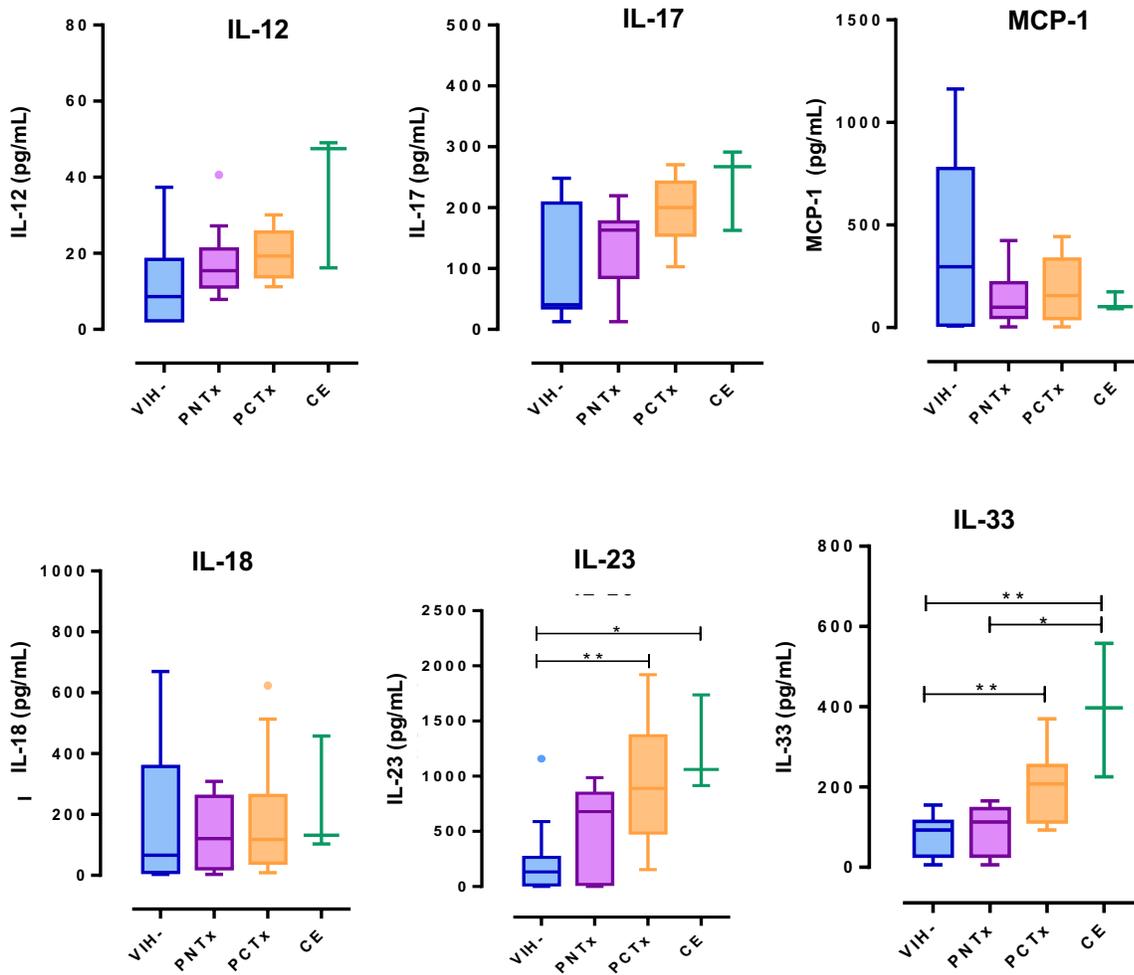


Figura 36. Citocinas y quimiocinas proinflamatorias.

Comparación de las concentraciones de citocinas y quimiocinas (pg/mL) entre los diferentes grupos: VIH⁻ y VIH⁺ (PNTx: pacientes naïve a TAR; PCTx: pacientes con TAR; CE: controladores de élite). Kruskal-Wallis con corrección de Dunn. (** p<0.01; * p<0.05).

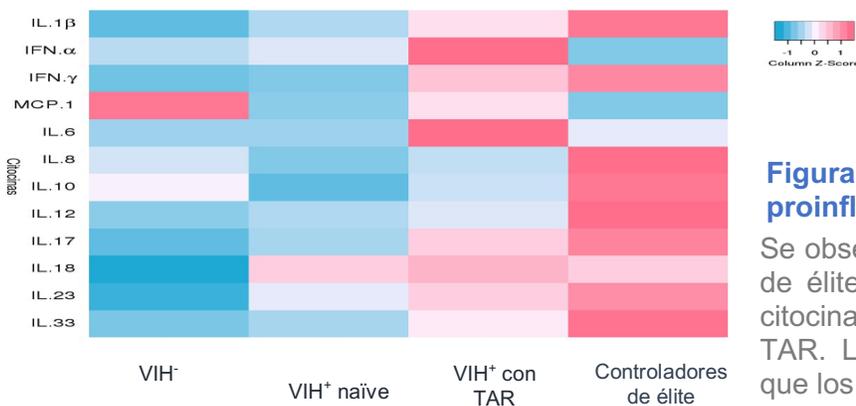


Figura 37. Heat map de citocinas proinflamatorias determinadas en suero.

Se observa como el grupo de controladores de élite tuvo una mayor concentración de citocinas séricas, seguido del grupo con TAR. Los VIH⁻ muestran niveles menores que los grupos VIH⁺.



7. Correlación entre los niveles de expresión *ZBTB*, características clínicas y citocinas proinflamatorias.

Se realizaron correlaciones entre los niveles de expresión de los genes *ZBTB*, las características clínicas y los niveles de citocinas proinflamatorias séricas, aplicando la prueba de correlación de Spearman. Se observó una correlación negativa moderada entre los niveles de *ZBTB7A* y la carga viral (-0.510; $p < 0.01$) en los pacientes VIH⁺, que se perdió al subclasificarse en los diversos grupos. Además de una correlación negativa moderada entre los niveles de *ZBTB2* y el nadir de LT CD4⁺ ($r = -0.643$; $p < 0.05$) en los pacientes bajo TAR (Fig. 39). Notamos que la mayoría de las correlaciones se presentó entre los niveles de expresión de los genes *ZBTB* y las citocinas proinflamatorias (tabla 12).

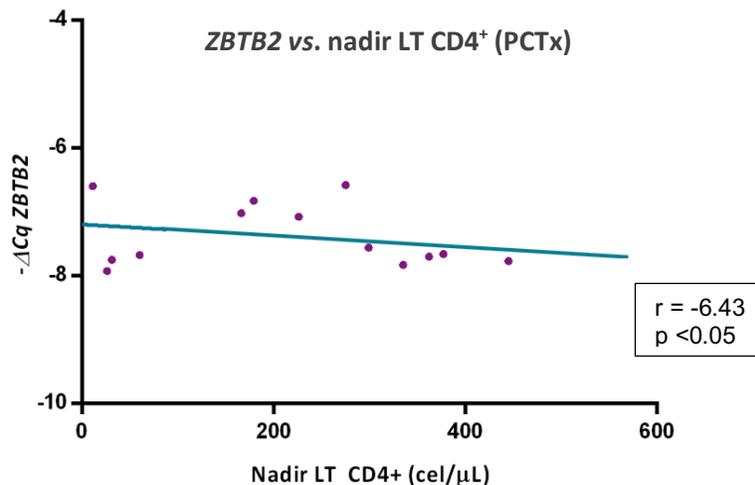


Figura 38. Correlación entre el gen *ZBTB2* y el Nadir de LT CD4⁺

a) Se observó una correlación negativa moderada entre el gen *ZBTB2* y el nadir de LT CD4⁺ ($r = -0.643$; $p < 0.05$). Correlación de Spearman. PCTx: Pacientes con TAR.



Tabla 12. Correlaciones entre los niveles de expresión *ZBTB* y citocinas proinflamatorias

Grupos	-ΔCq <i>ZBTB</i>	Correl. Spearman	IL-1β	IFN-α	IFN-γ	MCP-1	IL-6	IL-8	IL-10	IL-12	IL-17A	IL-18	IL-23	IL-33
VIH +	<i>ZBTB2</i>	Coef. de correlación	0.11	-0.12	0.29	-0.14	0.35	0.31	.484*	0.31	0.30	-0.06	0.17	0.35
		Sig. (bilateral)	0.60	0.58	0.17	0.51	0.09	0.14	0.02	0.14	0.16	0.79	0.44	0.09
	<i>ZBTB4</i>	Coef. de correlación	-0.19	-0.14	-.378*	-0.18	-0.24	-0.13	-0.16	-0.30	-0.30	-0.05	-0.27	-.374*
		Sig. (bilateral)	0.33	0.49	0.05	0.36	0.22	0.52	0.43	0.12	0.12	0.80	0.16	0.05
	<i>ZBTB17</i>	Coef. de correlación	0.16	-0.08	0.03	-0.32	0.15	0.20	0.27	0.22	.485*	-0.14	0.17	0.19
		Sig. (bilateral)	0.46	0.69	0.89	0.13	0.49	0.34	0.20	0.30	0.02	0.50	0.44	0.39
	<i>ZBTB38</i>	Coef. de correlación	-0.08	-0.07	0.06	0.14	0.02	0.19	.468*	0.15	0.00	-0.14	-0.18	-0.10
		Sig. (bilateral)	0.69	0.74	0.77	0.47	0.93	0.32	0.01	0.45	0.99	0.48	0.37	0.61
	<i>ZBTB5</i>	Coef. de correlación	-.444*	0.02	-0.33	-0.01	0.09	-0.22	-0.11	-0.31	-0.15	-0.03	-0.22	-0.19
		Sig. (bilateral)	0.04	0.92	0.15	0.98	0.69	0.33	0.63	0.17	0.51	0.89	0.33	0.42
PNTx	<i>ZBTB2</i>	Coef. de correlación	0.07	-0.47	-0.20	-.683*	.700*	0.20	0.47	0.32	0.57	-0.50	0.12	0.22
		Sig. (bilateral)	0.86	0.21	0.60	0.04	0.04	0.61	0.21	0.41	0.11	0.17	0.77	0.57
	<i>ZBTB4</i>	Coef. de correlación	0.35	-0.09	0.24	-.587*	.167	-0.42	-0.44	-0.16	0.31	-0.01	.577*	.597*
		Sig. (bilateral)	0.27	0.78	0.45	0.04	0.56	0.17	0.15	0.62	0.32	0.97	0.05	0.04
	<i>ZBTB7B</i>	Coef. de correlación	-0.49	-0.15	0.06	0.26	-0.26	0.05	0.34	-0.04	-0.24	-0.19	-.738**	-0.56
		Sig. (bilateral)	0.13	0.67	0.86	0.43	0.43	0.89	0.31	0.92	0.48	0.57	0.01	0.07
	<i>ZBTB17</i>	Coef. de correlación	0.33	-0.12	-0.09	-0.47	0.43	0.38	0.60	0.48	.900**	-0.38	0.33	0.66
		Sig. (bilateral)	0.38	0.77	0.81	0.21	0.24	0.31	0.09	0.19	0.00	0.31	0.38	0.06
	<i>ZBTB38</i>	Coef. de correlación	-0.09	-0.16	-0.03	0.28	-0.34	0.42	.657*	0.39	0.01	-0.25	-.577*	-0.35
		Sig. (bilateral)	0.77	0.62	0.92	0.38	0.28	0.17	0.02	0.21	0.98	0.43	0.05	0.27
	<i>ZBTB7A</i>	Coef. de correlación	0.14	0.15	0.22	0.25	-0.27	0.55	.717*	0.62	0.28	-0.05	-0.32	-0.17
		Sig. (bilateral)	0.72	0.70	0.57	0.52	0.48	0.12	0.03	0.08	0.46	0.90	0.40	0.66
	<i>BCL6</i>	Coef. de correlación	-0.47	0.03	-0.20	0.27	-0.46	0.30	0.38	-0.02	-0.08	-0.08	-.695*	-0.36
		Sig. (bilateral)	0.20	0.93	0.60	0.49	0.22	0.43	0.31	0.97	0.83	0.83	0.04	0.35

Correlación de Spearman. PNTx: Paciente naïve a TAR. (** p<0.01; * p<0.05)

Debido a que se ha descrito una actividad represora del FT BCL6 sobre la IL-18 (Takeshi Tokuhisa Okada et al., 2003), se esperaba encontrar una correlación inversa entre estas dos variables, sin embargo, no se encontró correlación en ninguno de los grupos de estudio.

Entre los datos destacados por tener correlaciones de moderadas a fuertes, se encontró que existe una correlación positiva y moderada entre los niveles de expresión del gen *ZBTB17* y la IL-17 en los pacientes VIH⁺ (r =0.485; p<0.05), la cual se vio intensificada en el subgrupo de pacientes naïve a TAR (r = 0.90; p<0.01), ver figura 40. La IL-17 es una citocina producida por los LT CD4⁺ con fenotipo Th17, esta citocina puede inducir la producción de citocinas proinflamatorias como IL-6 (Zhu & Paul, 2008). IL-6 se aprecia ligeramente incrementada en los PNTx y mucho más en los PCTx, aunque ninguno con significancia estadística.

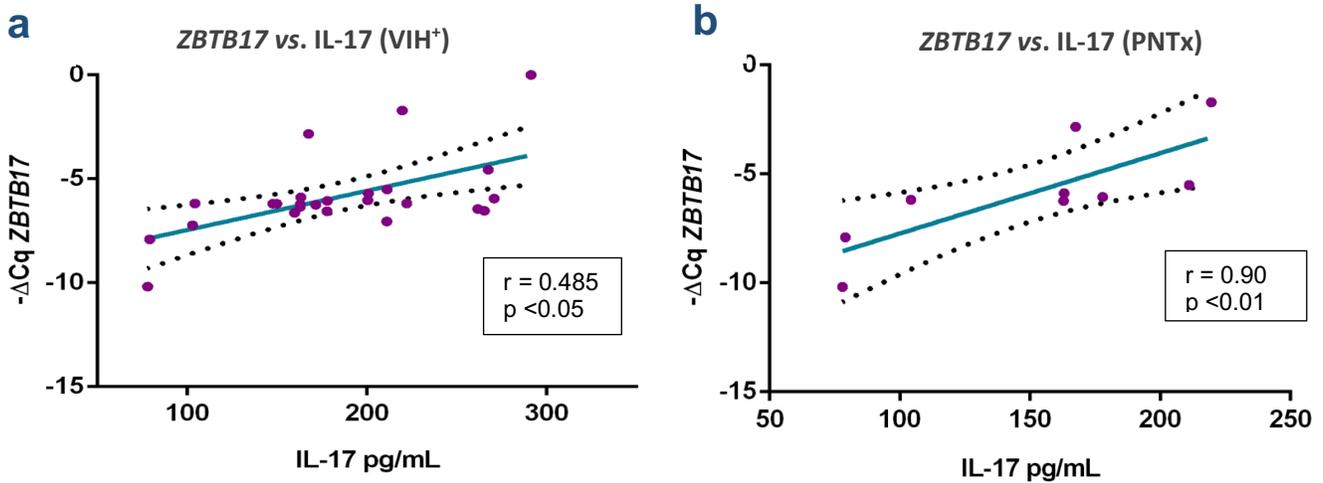


Figura 39. Correlación entre los niveles de expresión *ZBTB17* e IL-17. a) Se observó una correlación positiva moderada entre los niveles de expresión del gen *ZBTB17* e IL-17 en los pacientes VIH⁺ ($r = 0.485$; $p < 0.05$). b) Dicha correlación se intensificó en el subgrupo de pacientes naïve a TAR ($r = 0.90$; $p < 0.01$). Correlación de Spearman. PNTx: Paciente naïve a TAR.

Adicionalmente, encontramos una correlación negativa y moderada entre los niveles de *ZBTB7B* e IL-23 en los pacientes naïve a TAR ($r = -0.738$; $p < 0.01$), ver figura 41. Otras correlaciones moderadas entre los diferentes *ZBTB* e IL-23/IL-33 se muestran en la tabla 12, las cuales no han sido previamente reportadas en la literatura.

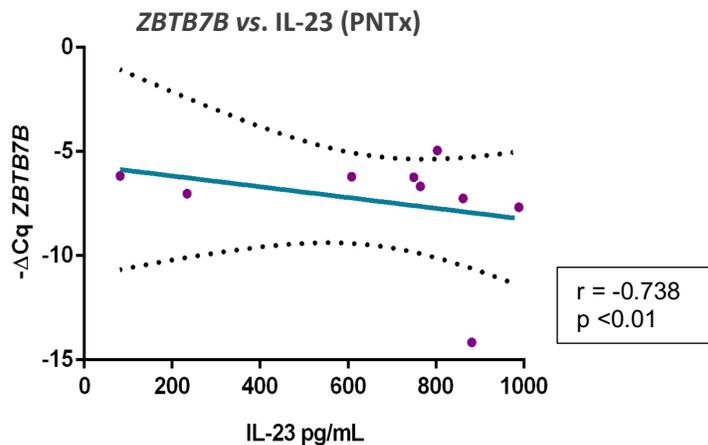


Figura 40. Correlaciones entre los niveles de expresión del gen *ZBTB7B* e IL-23. Se observó una correlación negativa y moderada entre los niveles de expresión del gen *ZBTB7B* e IL-23 en pacientes naïve a TAR. Correlación de Spearman. PNTx: Paciente naïve a TAR.



También se observó que los niveles de expresión de los genes *ZBTB38* y *ZBTB2* correlacionaron con la IL-10. Debido a que, la literatura relaciona de manera indirecta a los FT *ZBTB2*, *ZBTB4* y *ZBTB38* con la represión de IL-6 e IL-10; hipotetizamos que en nuestros resultados se podría encontrar una correlación negativa entre estos genes y las citocinas IL-6 e IL-10. Contrario a lo que esperábamos, la correlación observada fue positiva (Fig. 42). Cabe mencionar que las mediciones de las citocinas de este estudio se realizaron en suero, lo que representa una medición sistémica y, por tanto, limita este tipo de correlaciones. Mediciones a nivel celular, podrían representar datos más certeros del grado de correlación de las citocinas con los niveles de expresión de los genes *ZBTB*.

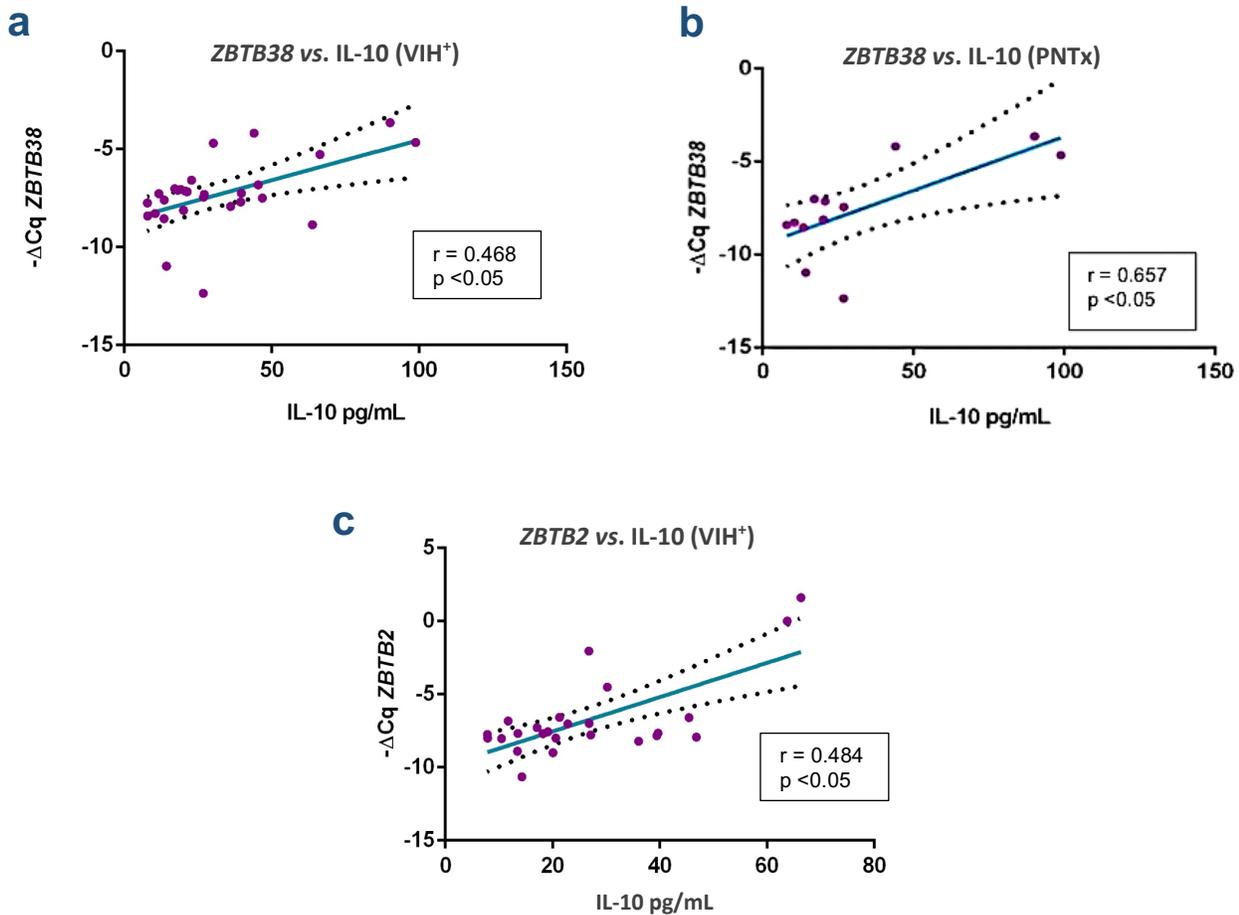


Figura 41. Correlaciones entre los niveles de expresión de *ZBTB38* y *ZBTB2* con IL-10. a) Se observó una correlación positiva entre los niveles de los genes *ZBTB38* e IL-10 en pacientes VIH⁺ ($r = 0.468$; $p < 0.05$) y b) PNTx ($r = 0.657$; $p < 0.05$). Así como una correlación positiva moderada entre la expresión de *ZBTB2* e IL-10 en VIH⁺ ($r = 0.484$; $p < 0.05$). Correlación de Spearman.



DISCUSIÓN



El virus de la inmunodeficiencia humana es un retrovirus que al infectar su célula diana se integra en su genoma como un paso esencial en su ciclo de replicación, ya que necesita de la maquinaria transcripcional, así como de los factores transcripcionales celulares para poderse replicar. Al igual que el genoma de la célula, el VIH integrado, llamado DNA proviral también es sujeto a la regulación transcripcional, que está dada, por diversos mecanismos como la presencia de factores celulares con acción activadora o represora, las modificaciones epigenéticas, así como también por la actividad de proteínas virales como Tat. Existe claramente una relación entre la presencia de represores transcripcionales y la disminución de la tasa de replicación del VIH. La presencia de estos factores genera un ambiente represivo en que el VIH se mantiene transcripcionalmente inactivo en las células infectadas, permaneciendo oculto de la acción inmune y del tratamiento antirretroviral, dificultando la tarea de su erradicación.

En este trabajo se abordó la posible relación entre el VIH y los niveles de expresión génica de algunos miembros de la familia de represores transcripcionales *ZBTB* en linfocitos T CD4⁺, células clave en la infección por VIH y principales reservorios. Para ello, se reclutó una muestra aleatoria de pacientes VIH⁺. La “n” total de las personas enroladas en este estudio fue de 49. Al momento de realizar el reclutamiento se consultó la base de datos del servicio de atención a personas con VIH/SIDA, de donde se tomaron las características sociodemográficas y clínicas más relevantes para este estudio, las cuales fueron correlacionadas con los niveles de expresión obtenidos de los genes *ZBTB*.

Dentro de las características clínicas observadas en los sujetos de estudio, se encontraron diferencias significativas en la edad entre el grupo de controladores de élite (43.20 ± 13.90 años) y el grupo naïve a TAR (29.67 ± 9.42 años; $p < 0.01$); de acuerdo con Deek *et al.*, las personas que viven con VIH, tienen un riesgo mayor de padecer afecciones asociadas al envejecimiento, ya que se ha observado que el VIH acelera este proceso; siendo una de las manifestaciones, el incremento en los niveles de las citocinas proinflamatorias de manera crónica que se asocia fuertemente al desarrollo de comorbilidades y al incremento de la mortalidad en la infección por el VIH (Deeks, 2011). En nuestro estudio, la edad podría representar un factor de confusión para estos grupos con respecto al nivel de citocinas, sin



embargo es una diferencia difícil de evitar, ya que con la mejora en el diagnóstico oportuno, cerca del 40% de los nuevos casos diagnosticados de VIH oscilan en el grupo etario de 25-34 años, de acuerdo a reportes de CENSIIDA de 2019; mientras que, en el caso de los controladores de élite al tener la capacidad de controlar de manera rápida y espontánea la viremia, muestran un curso de la infección asintomática dificultando su diagnóstico temprano e incluso pueden llegar a no ser diagnosticados (Blankson, 2010).

El seguimiento del recuento de LT CD4⁺ en el grupo de CE con 744 cel/ μ L (489-863) y de pacientes bajo TAR con 818 cel/ μ L (678-1046); así cómo, los niveles indetectables de carga viral (<40 copias/mL), muestra como tanto los CE como los pacientes con TAR, han logrado controlar la replicación del VIH-1 a nivel plasmático. Los primeros (CE), controlan la replicación viral de manera espontánea a través de diversos mecanismos asociados, entre los que se encuentran, la baja susceptibilidad a la infección de las células diana, así como una inmunidad celular más eficiente con mayor capacidad antiviral y de proliferación (Gaardbo et al., 2012; Gonzalo-gil et al., 2017; Monel et al., 2019); mientras que, los sujetos bajo TAR a través del uso continuo y prolongado de esquemas de tratamiento. Adicionalmente, el grupo con TAR presentó el menor conteo de LT CD4⁺ nadir de 275 cel/ μ L (46-370), mayor tiempo de infección (6.80 ± 2.92 años), así como, un tiempo sin uso de TAR de 7.32 ± 9.68 meses, características asociadas al establecimiento de un mayor tamaño de reservorio viral en la infección por VIH (Boulassel et al., 2012). Los pacientes naïve a TAR por su parte, mostraron el menor conteo al momento de este estudio de LT CD4⁺ de 558 cel/ μ L (412-778) y elevados niveles de LT CD8⁺ de 1070 cel/ μ L (495-1378), lo que es característico de una replicación viral activa.

Para el abordaje de la familia de genes *ZBTB*, se realizó una revisión exhaustiva de la bibliografía disponible de los miembros de la familia *ZBTB*, así como un análisis *in silico* con las bases de datos obtenidas de *Gene Expression Omnibus* (GEO) y *Systems Immunology Toolkit* (SIDRA). Los resultados encontrados en el análisis *in silico*, muestran que existen modificaciones en los niveles de expresión de diversos genes *ZBTB* en LT CD4⁺ en los grupos VIH⁺; es de destacar que, estos resultados proceden de investigaciones de diversas poblaciones (Suiza, USA y México), realizadas de manera independiente entre sí, y que sus objetivos de estudio no estaban relacionados a la familia de genes *ZBTB*. Estos hallazgos



aportan evidencia relacionada a que los genes *ZBTB* se modifican en la infección por VIH-1, independientemente de la población de estudio e incluso del sexo de los participantes.

En conjunto, estos resultados y la revisión bibliográfica fundamentaron las bases para la selección de los genes *ZBTB* que se estudiaron en el presente trabajo; siendo *ZBTB2*, *ZBTB4*, *ZBTB5*, *ZBTB7A*, *ZBTB7B*, *ZBTB16*, *ZBTB17*, *ZBTB27 (BCL6)*, *ZBTB29 (HIC1)* y *ZBTB38* los genes seleccionados, basado en sus niveles diferenciales de expresión, frecuencia entre estudios y su posible papel relacionado a la infección por VIH-1.

Después de realizar los análisis de expresión de los genes *ZBTB* en los LT CD4⁺ en nuestros grupos de estudio, se observó un comportamiento heterogéneo en los grupos VIH⁺, esto posiblemente debido a las diversas funciones en la que estos FT *ZBTB* participan. Sin embargo, es de destacar que 6 de los 10 genes evaluados (*ZBTB2*, *ZBTB4*, *ZBTB7A*, *ZBTB7B*, *HIC1* y *ZBTB38*) tuvieron los mayores niveles de expresión en los controladores de élite, lo que representa un resultado interesante y nos genera la hipótesis, si este fenotipo transcripcional de LT CD4⁺, podría ser uno de los mecanismos que contribuyen al control de la viremia en este tipo de pacientes. Para tratar de acercarnos a responder esto, normalizamos a 1 con los niveles de expresión de los pacientes con replicación viral activa (Px naïve a TAR) y los comparamos con los grupos con replicación viral controlada por TAR o de manera espontánea (Px con TAR y controladores de élite, respectivamente). Encontramos que los CE tenían los mayores niveles de expresión (veces cambio) de los genes *ZBTB7A* (9.16), *ZBTB38* (7.60), *ZBTB2* (7.56), *HIC1* (6.61), *ZBTB7B* (2.56) y *ZBTB4* (2.56). Mientras que los pacientes con TAR mostraron niveles de expresión similares al grupo naïve a TAR (veces cambio) de *ZBTB2* (1.52), *HIC1* (0.19), *ZBTB7A* (1.38), *ZBTB7B* (0.75) y *ZBTB4* (1.17) con excepción del gen *ZBTB38*, donde se observó un incremento de 2.83 veces. Lo que nos lleva a descartar al TAR como una variable interviniente y sugerir que el incremento en la expresión de los genes *ZBTB* en los LT CD4⁺ es un perfil específico de los controladores de élite.

A continuación, se describe de una forma más detallada cada gen *ZBTB* determinado en nuestro estudio. De entre los genes evaluados, *ZBTB7A* representó particular interés en nuestro estudio, ya que en el contexto VIH, *Pessler et al.*, lo caracterizaron como un gen que



codifica al factor celular ZBTB7A (FBI-1), el cual se une a una región del LTR del VIH denominada inductor de transcritos cortos (IST) y lleva a una interferencia en la transcripción a nivel de elongación, generando transcritos de solo 59 nucleótidos (Pessler et al., 1997). En nuestro estudio observamos que, los mayores niveles de expresión lo mostró el grupo de controladores de élite, 12.22 veces más con respecto al grupo VIH- ($p < 0.05$). Mientras que los grupos VIH⁺ naïve y con TAR tuvieron una tendencia al incremento, aunque sin significancia estadística. La determinación de los niveles de expresión de este gen, debido a su influencia directa en la represión de la transcripción del VIH previamente descrita, sugiere la posibilidad de que un perfil de expresión incrementado de otros genes *ZBTB*, podría contribuir al silenciamiento génico del VIH-1.

La evaluación de la expresión del gen *HIC1* bajo nuestras condiciones de estudio, también fue de particular interés, ya que el grupo de investigación de *Le Douce et al.*, encontró que la proteína codificada por este gen llevó a la inhibición de la transcripción del VIH-1 en cultivos de células microgliales humanas. En su trabajo describieron como HIC1 sufría modificaciones postraduccionales, que lo hacía susceptible a tener afinidad de unión a la proteína viral Tat. Al momento de ser reclutada la proteína Tat al elemento de respuesta a la transactivación de la región LTR del VIH, lleva consigo a HIC1 y el consiguiente efecto de la represión por compactación de la cromatina (Le Douce et al., 2016). A pesar de que este mecanismo fue descrito en las células microgliales, principales reservorios del VIH en el sistema nervioso central, es consecuente pensar en la posibilidad de que este mecanismo podría ser viable en reservorios periféricos como los LT CD4⁺. En nuestro estudio, encontramos que la expresión del gen HIC1 mostró un comportamiento similar en los niveles de expresión entre las personas VIH⁺ vs. VIH⁻. Al realizar el subanálisis entre grupos, se aprecia un comportamiento heterogéneo entre los grupos VIH⁺; sin embargo, en los CE el gen *HIC1* se expresó 5.87 veces más que los VIH⁻, este incremento resultó significativo al compararlo con el grupo con TAR ($p < 0.01$). En contraste, en los pacientes con TAR se observó una disminución en la expresión comparado con el grupo VIH⁻; mientras que, los pacientes naïve a TAR se acercaron a niveles similares a los VIH⁻. Ante la expresión incrementada del gen *HIC1* en los LT CD4⁺ de los CE, cabe la posibilidad que pueda presentarse el mecanismo descrito por *Le Douce et al.*, y de esta manera reprimir la transcripción del VIH en estas células.



Desde el punto de vista del establecimiento y mantenimiento del estado de latencia viral en los reservorios, las modificaciones epigenéticas tienen un papel determinante dado que, estas impactan directamente en la tasa de replicación viral. Dentro de las regulaciones epigenéticas mejor descritas, se encuentra la metilación del DNA, en donde las enzimas DNA metiltransferasas (HMTs) adicionan un grupo funcional metilo a la citosina, principalmente en las islas CpG, que son regiones de alta concentración de Citocinas/Guaninas, que forman parte de la región promotora de los genes y está asociado al silenciamiento génico. La acetilación/deacetilación de histonas, es otra forma de regulación epigenética, controlada por las acetilasas de histonas (HAT), enzimas que promueven una conformación abierta de la cromatina en donde los factores transcripcionales y RNA Pol II pueden tener acceso al DNA; mientras que, la eliminación de los grupos acetilo es realizada por las deacetilasas de histonas (HDAC) llevando a una conformación cerrada de la cromatina, de esta manera el DNA está inaccesible para el reclutamiento de la maquinaria transcripcional, lo que favorece el silenciamiento génico (J. K. Kim, Samaranyake, & Pradhan, 2009). En el contexto VIH, estas modificaciones afectan directamente la transcripción de los genes virales; la metilación del DNA, así como la deacetilación de histonas favorecen el mantenimiento de un DNA proviral transcripcionalmente inactivo en sus reservorios, pero que es competente para su replicación al modificarse tales condiciones represivas. Se ha descrito que en la infección por VIH-1, hay una hipermetilación en la región 5´LTR en las células latentemente infectadas (Palacios et al., 2012) y que existe una correlación positiva con la pérdida de la metilación del LTR y la activación de la expresión viral (Ishida, Hamano, Koiwa, & Watanabe, 2006). Esto apoya el hecho que, los niveles de metilación en el promotor del DNA del VIH integrado, determine la eficacia de la expresión viral (Verma, 2014).

En relación a lo anterior, algunos miembros de la familia de represores transcripcionales ZBTB, han mostrado que pueden unirse a zonas metiladas CpG y de esta manera reclutar correpresores que llevan al silenciamiento génico; tal es el caso, de los represores ZBTB2, ZBTB4 y ZBTB38 (Filion et al., 2006; Karemaker & Vermeulen, 2018). En nuestro estudio observamos de manera interesante, que los niveles de expresión de los genes *ZBTB4* y *ZBTB38* se mostraron elevados en las personas VIH⁺ (*ZBTB4*;p<0.001, *ZBTB38*;p<0.05) en



comparación con los VIH⁻, mientras que la expresión de *ZBTB2* fue similar en ambos grupos. Al realizar la subclasificación de los grupos, se observó como los controladores élite presentaban los mayores niveles en los 3 genes antes mencionados, con una expresión de 6.95 veces más del gen *ZBTB2*, 6.15 veces más del gen *ZBTB38* y 4.89 veces más del gen *ZBTB4* comparados con el grupo VIH⁻, todos ellos con significancia estadística ($p < 0.05$). Según reportes del metiloma, los controladores de élite son el grupo de VIH⁺ que presenta un mayor grado de metilación, seguido de los pacientes con TAR y finalmente los pacientes virémicos (Blazkova et al., 2009). Adicionalmente, en el análisis *in silico* realizado para estos genes, se encontró que tanto para los FT *ZBTB4* y *ZBTB38* hay 2 posibles sitios de unión “CGCG” y 4 posibles sitios de unión a la secuencia consenso KBS (secuencia de unión a *Kaiso*; región altamente conservada en estos y otros miembros de la familia de represores *ZBTB*) en el genoma del VIH-1. Con respecto al FT *ZBTB2*, no se logró encontrar la secuencia de unión al DNA, por lo que el análisis *in silico* en nuestro estudio no fue factible; sin embargo, Jeon et al., refiere que el FT *ZBTB2* compite con el activador SP1 por su sitio de unión (Jeon et al., 2009b). Esto es relevante ya que, la región LTR del VIH-1 contiene sitios de unión a SP1, por lo que un fenómeno de inhibición competitiva similar podría ocurrir en las células infectadas.

En resumen, la descripción de los perfiles de metilación realizada por Blazkova et al., además del perfil de expresión de los genes *ZBTB* cuyos niveles se encuentran elevados en nuestros grupos VIH⁺ y de manera relevante en los controladores de élite, así como el análisis *in silico* que muestra sitios de posible unión al DNA proviral, nos lleva a sugerir la posibilidad de una interacción directa de los represores *ZBTB2*, *ZBTB4* y *ZBTB38* sobre el genoma del VIH-1 y que dicha interacción estaría contribuyendo a la represión de la transcripción en los LT CD4⁺. En este contexto, investigaciones recientes realizadas por Jiang y col. apoya nuestra hipótesis, ya que observaron a través de secuenciación de siguiente generación en PBMCs que los reservorios de los CE tienen características distintivas a los reservorios de los pacientes que no controlan la infección, tales como, que los sitios preferenciales de integración del VIH se realiza en regiones cromosómicas con mayor susceptibilidad a las metiltransferasas en los CE; enriquecido con marcas represivas (metilación de más del 90%) favoreciendo así, una conformación de heterocromatina, es decir, un ambiente represivo para la replicación del VIH



(Jiang et al., 2020). Basado en lo anterior, sugerimos la realización de una investigación más profunda que pueda ayudar a dilucidar la función de los FT ZBTB en los reservorios de los CE.

Además de los factores que podrían influir directamente en la represión transcripcional del VIH en las células, los factores celulares que intervienen en la supervivencia y mantenimiento de los reservorios virales son de gran relevancia. Los reservorios se establecen tempranamente, durante la fase aguda de la infección, su reactivación es la mayor fuente de repunte viral después de 2 a 8 semanas de falla o abandono del TAR y son el principal obstáculo para erradicar el VIH. Los reservorios con el VIH latente han sido detectados en sangre, ganglios linfáticos, cerebro y otros sitios inmunoprivilegiados. Dentro de las subpoblaciones celulares, los linfocitos T CD4⁺, particularmente los de memoria central, constituyen el principal reservorio y de mayor relevancia clínica, por ser el más extenso y de mayor vida media de aproximadamente 44 meses (Mbonye & KRNA, 2017; Siliciano & Greene, 2011). Diversas líneas de investigación sugieren que la generación de los LT CD4⁺ de memoria a partir de las células efectoras infectadas, así como su mantenimiento y proliferación homeostática son los mayores determinantes de la persistencia viral (Kulpa & Chomont, 2015). Recientemente *Ciucci et al.*, describieron que ZBTB7B (ThPOK) es un factor necesario para la diferenciación de los LT CD4⁺ de memoria de vida larga, y no sólo eso, sino que es esencial para el desarrollo de una memoria efectiva y duradera al reprimir a los genes *RUNX3* y *PRDM1*, cuyos factores transcripcionales son característicos de células efectoras de corta duración (Ciucci et al., 2019). De manera interesante, al realizar el análisis de expresión en nuestro estudio, observamos mayores niveles de expresión del gen *ZBTB7B* en los pacientes VIH⁺ en comparación con el grupo VIH⁻ ($p < 0.001$), siendo el grupo de controladores de élite el que presentó el mayor incremento con 3.38 veces más respecto al grupo VIH⁻ ($p < 0.01$), seguido del grupo con TAR (3.11 veces más) y el grupo naïve a TAR (2.59 veces más). Estos resultados nos llevan a hipotetizar que los niveles aumentados de la expresión de *ZBTB7B* favorece un fenotipo de células de memoria de vida larga que podría estar contribuyendo de manera importante al mantenimiento de los LT CD4⁺ no infectados como infectados, y, por tanto, al mantenimiento de reservorios virales. Con base a lo anterior, podría explorarse la posibilidad de utilizar a *ZBTB7B* como blanco terapéutico, ya que su inhibición limitaría el establecimiento del estado de memoria; adicionalmente, hipotetizamos que en las células que ya adquirieron



el fenotipo de memoria (incluyendo a reservorios del VIH), se promovería la generación de un fenotipo de células efectoras de vida corta, ayudando a disminuir el tamaño del reservorio viral.

Otro factor importante que contribuye a la persistencia del virus en los LT CD4⁺, es la proliferación homeostática mediada por la IL-7. Esta citocina induce la proliferación y supervivencia de los LT CD4⁺_M al unirse a su receptor IL-7R y activar la vía de señalización JAK1/JAK3/STAT5, que conduce a la producción de moléculas antiapoptóticas y de proliferación como Bcl-2 y Mcl-1 (Ruelas & Greene, 2013). Dicha vía se activa tras la unión de la citocina a su receptor, el cual está asociado intracelularmente a las proteínas Janus Kinasas (JAK1 y JAK3) caracterizadas por tener dominios homólogos de cinasas en el extremo C-terminal, tras ser activadas, las JAK fosforilan al transductor de señal y activador de la transcripción 5 (STAT5), esta fosforilación permite su dimerización y translocación al núcleo, donde se une a secuencias reguladoras llamadas secuencias activadas por interferón- γ (GAS) de genes que participan en procesos de proliferación y supervivencia celular (Shuai & Liu, 2003). Con el fin de evitar una señalización excesiva y la activación anormal que puede conducir a trastornos autoinmunes o a una transformación oncogénica, la vía es regulada negativamente por el supresor de señalización de citocinas-1 (SOCS-1), el cual es inducido por diversas citocinas como IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-7 e IL-15. Este regulador negativo, a su vez es reprimido por el FT ZBTB17 (Miz-1), por lo que se le ha descrito como regulador de la señalización de la vía IL-7/IL-7R/STAT5/Bcl-2 al reprimir la transcripción del gen *SOCS-1* y los eventos de señalización en respuesta a IL-7, además de regular la señalización de IFN- γ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-6 e insulina, entre otras moléculas (Möröy, Saba, & Kosan, 2011). Cabe mencionar que en un contexto VIH, particularmente en una infección no tratada, se presenta un agotamiento progresivo de los LT CD4⁺_M como resultado de la infección directa, así como, por la desregulación de la vía IL-7/IL-7R; dicha desregulación es restaurada con el inicio del TAR lo cual lleva, indirectamente, al establecimiento de los reservorios del VIH en los LT CD4⁺_M (Goonetilleke et al., 2019). Al realizar las determinaciones de los niveles de expresión de *ZBTB17* en nuestros grupos de estudio, observamos 2.83 veces más expresión de *ZBTB17* en los pacientes naïve a TAR ($p < 0.01$) y 2.59 veces más en los controladores de élite comparados con el grupo VIH⁻. Hipotetizamos entonces, que el incremento de los niveles de expresión de este gen podría ser un mecanismo del sistema inmune para tratar de restaurar



las células de memoria depletadas y mantener la homeóstasis de las subpoblaciones celulares T (Goonetilleke et al., 2019). Por lo que bajo esta premisa, el incremento en los niveles de expresión del gen *ZBTB17* en los controladores de élite podría estar asociada al mantenimiento de un conteo de LT CD4⁺ relativamente estables al promover la supervivencia y proliferación de los LT CD4_M⁺, lo que estaría acorde a lo reportado por Okulicz y col., quien demuestra que los CE tienen una mayor preservación de LT CD4_{MC}⁺ y que mantienen la capacidad de producir IL-2 e IL-7 (Okulicz & Lambotte, 2011); mientras que, en los PNTx a pesar que se reportan niveles elevados de *ZBTB17* y de IL-7 sérica (Hodge et al., 2011), no logran reestablecerse las poblaciones de memoria debido a la continua activación inmune que lleva a la desregulación producida a nivel de receptor (disminución del IL-7Rα/CD127) en las células infectadas. En contraste a los observado con los otros dos grupos, los pacientes con TAR tuvieron una expresión similar a los VIH⁻ (1.09 veces cambio), lo cual podría estar relacionado al restablecimiento de la función de la vía de IL-7/IL-7R que lleva a la normalización de los niveles de IL-7 después de 1 año bajo TAR como parte de su regulación autocrina (Hodge et al., 2011). Con base en diversas investigaciones que muestran la participación del FT *ZBTB17* en la regulación del gen *SOCS-1* en la vía la IL-7/IL-7R/STAT5, como el realizado por Kosan y col. en modelos murinos donde observaron que la delección de *Zbtb17* (*Miz-1*) interrumpe los eventos de señalización desencadenados por la IL-7, así como el realizado por Patel y Col., en donde a través de cultivos celulares establecen que Bcl2 es un efector de la actividad del FT *ZBTB17* (Kosan et al., 2010; Patel & McMahon, 2007); se sugiere que la participación del FT *ZBTB17* en el proceso de mantenimiento de los LT CD4_M⁺ podría ser investigada con el fin de comprender mejor los mecanismos de acción del FT *ZBTB17* sobre esta vía, la forma en cómo es regulado y así, determinar si podría actuar como un potencial blanco terapéutico en la regulación de la proliferación homeostática y de esta manera disminuir la expansión de los reservorios virales del VIH.

En contraparte a la elevación de la expresión de los genes previamente revisados, los genes *ZBTB5*, *ZBTB16* y *BCL6* mostraron una subexpresión en los pacientes VIH⁺ con respecto a los sujetos VIH⁻. De los cuales, para fines de este trabajo, es de nuestro interés mencionar al gen *ZBTB16*, cuyo factor transcripcional ha sido asociado con el desarrollo y funcionamiento de las



células T *Natural Killer* invariantes (iNKT). Existe información controversial acerca de la expresión del gen *ZBTB16* en linfocitos T no pertenecientes al sistema inmune innato. El equipo de *Zhang et al.*, reportaron que en un sistema *in vitro* e *in vivo* de células T maduras de un modelo murino, el gen *zbtb16* está inactivado y establemente suprimido en células T convencionales (S. Zhang et al., 2015). Por otro lado, Raberger *et al.*, reportaron que este gen se encontraba expresado en LT de sangre periférica de modelos murinos, aunque de manera restringida en las células T CD4⁺CD44^{hi}, el cual es un fenotipo que diferencia a los linfocitos T de memoria de los naïve. (Raberger et al., 2008). Acorde a lo reportado por Raberger, en nuestro análisis observamos que sí existe una expresión de *ZBTB16* en LT CD4⁺ y que los niveles en pacientes VIH⁺ se encuentran disminuidos en comparación del grupo VIH⁻ ($p < 0.01$). Aunque en nuestro estudio no se determinaron los fenotipos de las subpoblaciones celulares, los niveles de expresión se midieron en LT CD4⁺ totales, en donde las células de memoria representan una parte de la población total, por lo que, nuestros resultados apoyan lo propuesto por Raberger y su equipo.

Adicionalmente, el grupo de *Kim et al.*, al estudiar a la proteína viral Vif en una línea de células derivadas de sangre periférica (T-REx Jurkat), observó por medio de microarreglos como un gran número de genes disminuían su expresión en presencia de Vif, incluyendo a *ZBTB16*. Sin embargo, los estudios con respecto a *ZBTB16* no fueron profundizados (D. Y. Kim et al., 2013). Basado en este hecho y con el objetivo de obtener más información, se realizó el análisis de nuestros resultados, mostrando que los niveles de expresión de *ZBTB16* en los pacientes naïve a TAR fueron menores con respecto a los otros dos grupos VIH⁺ ($p < 0.01$). Esto concuerda con lo encontrado por el equipo *Kim et al.*, ya que los pacientes naïve a TAR cursan por una infección activa, productora de viriones y por tanto de proteínas virales, dentro de las que se encuentra Vif. En tanto, en los pacientes con TAR y controladores de élite se observa una disminución en la expresión del gen *ZBTB16*, aunque no significativa. En estos dos grupos de pacientes se sabe que mantienen una viremia residual (niveles por debajo de los límites de detección), atribuida a una posible replicación viral de bajo grado y a la eventual activación de reservorios con el VIH latente y (Conway & Perelson, 2016), en donde hay producción de proteínas virales como Vif, pero en menor grado comparados con los pacientes VIH⁺ naïve a TAR con replicación activa. Este resultado es relevante, ya que se muestra por primera vez en



un sistema *in vivo*, la posible influencia de la proteína viral Vif sobre la expresión del gen *ZBTB16*. Estudios más detallados con respecto a este tema podrían revelar información que permita comprender la interacción entre la proteína viral Vif y el gen *ZBTB16*.

La replicación del VIH-1 no sólo es influenciada por los FT del huésped, sino que las citocinas también tienen un papel importante en la producción de nuevos viriones, ya que regulan múltiples etapas de su ciclo viral, desde la unión al receptor hasta la liberación del virus (Freeman et al., 2016; Osuji et al., 2018; Vandergeeten et al., 2012). La infección por VIH-1 induce la producción de citocinas proinflamatorias, incluidas interleucinas, interferones y quimiocinas. Se ha reportado que las citocinas proinflamatorias IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-15 y el TNF- α estimulan la replicación del VIH-1 en linfocitos T, mientras que IL-10, IL-13, IL-16, IFN- α e IFN- β pueden reprimirla (Hokello et al., 2019; Osuji et al., 2018). Por lo que bajo este contexto, decidimos cuantificar los niveles de citocinas séricas en los grupos VIH⁺ y el grupo VIH⁻, a través de un panel inflamatorio de 13 citocinas (IL-1 β , IFN- α , IFN- γ , TNF- α , MCP-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-18, IL-23 e IL-33) y lo correlacionamos con los niveles de expresión de los genes *ZBTB*, ya que algunos estudios han establecido una relación directa entre algunos miembros de la familia de FT *ZBTB* y las citocinas, como el descrito para *BCL6* sobre IL-4, IL-5 e IL-8, ésto observado en modelos murinos (Takeshi Tokuhisa Okada et al., 2003).

Nuestros resultados mostraron un incremento en la concentración de citocinas proinflamatorias en suero de los pacientes VIH⁺, lo que es acorde a lo reportado por otros estudios (Katherine Kedzierska & Crowe, 2001). El grupo de CE fue el que tuvo una mayor elevación en los niveles de citocinas, con un incremento significativo de IL-1 β ($p < 0.01$), IL-23 ($p < 0.05$) e IL-33 ($p < 0.01$) y una tendencia al incremento de IFN- γ e IL-10 comparado con el grupo VIH⁻. Se ha reportada que los CE presentan mayores niveles de activación de células T, una mayor activación de la cascada de la coagulación e inflamación sistémica en comparación con los VIH⁻ y pacientes VIH⁺ que están controlados con TAR, esto debido al mantenimiento de una viremia residual; además tienen un mayor riesgo de morbilidad y mortalidad, no debido a la progresión de la infección, sino al aumento de la activación inmune y la inflamación (Crowell & Hatano, 2015). Cabe resaltar que, los CE son un grupo heterogéneo desde el punto de vista clínico, ya que



una proporción de ellos pueden perder el control virológico (hasta el 30 %) y declinar el conteo de LT CD4⁺ (aprox. 20%), llevando eventualmente a la progresión del SIDA (Leon et al., 2016); en estos pacientes con posible pérdida del status, se presentan niveles elevados de citocinas proinflamatorias y quimiocinas (Pernas et al., 2017). Si bien es cierto que un ambiente inflamatorio en los CE como el observado en nuestro grupo de estudio, en donde hay una mayor cantidad de citocinas proinflamatorias circulantes que podría contribuir al control virológico, también puede tener un efecto desfavorable a largo plazo (Crowell et al., 2015; Gonzalo-gil et al., 2017). Es importante mencionar, que solo 3 de los 5 pacientes controladores de élite tuvieron determinaciones del nivel de citocinas en nuestro trabajo, por lo que es difícil llegar a conclusiones en nuestro estudio con respecto a este grupo; un tamaño de muestra mayor podrá dar un panorama más completo y confiable del comportamiento de estas citocinas y su posible contribución en el control espontáneo de la viremia.

Por otro lado, las personas VIH⁺ con TAR fue el segundo grupo en mostrar una elevada concentración de citocinas séricas, siendo significativo el incremento en IFN- γ , IL-23 e IL-33 comparado con el grupo VIH⁻ ($p < 0.01$) y mostrando una tendencia a la elevación de las citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 e IL-17. Se observó que de las citocinas que podrían favorecer o inhibir la replicación del VIH-1, ninguna resultó ser significativa (IL-1 β , IL-6 ó IL-10). Con respecto al incremento significativo de las citocinas IL-23 e IL-33 en estos pacientes, estas podrían estar relacionadas con el mantenimiento de la integridad intestinal dado que la IL-23 ayuda a la diferenciación y estabilidad de las células Th17, las cuales son una subpoblación de LT CD4⁺ que regula la homeóstasis y defensa intestinal, mientras que IL-33 (secretada por células epiteliales), actúa como señal de daño de tejido; esta citocina potencia las respuestas de los LT CD8⁺ y células NK, lo cual puede llegar a causar una atrofia de las vellosidades intestinales (Brenchley et al., 2004). En nuestros resultados, los pacientes con TAR presentan niveles elevados tanto de IL-23 como de IL-33, que podrían indicar un posible daño intestinal generado antes de iniciar el TAR. Basado en lo anterior, creemos que el aumento observado en la IL-23 podría deberse a un intento del sistema inmune por tratar de restaurar la subpoblación Th17 y de esta manera recuperar la integridad intestinal (Fernandes, Berthoud, Kumar, & Angel, 2017).



Por otro lado, los niveles elevados de IL-33 en los pacientes bajo TAR (6.20 ± 2.80 años) concuerda con lo reportado por Mehraj y col., quienes demuestran que existe un incremento en los niveles de IL-33 después de 34 meses de TAR que lleva a mejorar la respuesta citotóxica de LT CD8⁺ y células NK; y por lo tanto, a un incremento en los niveles sistémicos de INF- γ (los cuales también se encuentran elevados en nuestro grupo con TAR); además de potenciar la actividad de estas células contra células infectadas por el VIH-1 y contribuir a la producción de citocinas proinflamatorias (Mehraj, Ponte, & Routy, 2016; Roff, Noon-Song, & Yamamoto, 2013).

Actualmente, el logro más notable en la batalla contra el VIH fue la introducción del TAR, que ha transformado a la infección por VIH-1 de ser un padecimiento mortal a una enfermedad crónica y manejable (Babu et al., 2019). Aunque el TAR controla con éxito la replicación del VIH y previene las infecciones oportunistas, las personas que lo reciben presentan enfermedades a largo plazo, que están asociadas al envejecimiento, como enfermedades cardiovasculares, cáncer y osteoporosis. Diversos estudios demuestran que la infección por VIH acelera el proceso de envejecimiento, y que una de las características de un sistema inmune envejecido (senescente) es la elevación de las citocinas proinflamatorias (Deeks, 2011). Lo anterior, podría contribuir a explicar porque los pacientes bajo TAR e incluso los controladores de élite presentan niveles elevados de citocinas proinflamatorias, ya que sus medias de edad se encuentran en $37.62 \text{ años} \pm 7.84$ y 43.20 ± 13.90 , respectivamente.

Adicionalmente, otro factor que parece influir en la inflamación crónica en los pacientes, es el período antes del inicio del TAR, ya que parece existir un punto de inflamación en la infección no tratada, que persiste después de la supresión virológica (Freeman et al., 2016). En referencia a esto, observamos que el tiempo transcurrido desde el diagnóstico hasta el inicio de TAR fue mayor en los PCTx (7.32 ± 9.68 meses), que en los pacientes naïve a TAR (3.29 ± 1.98 meses), cuya medicación fue proporcionado después de la toma de muestra para este estudio. Esto podría representar una razón adicional, que podría explicar los niveles elevados de citocinas en los pacientes bajo TAR, ya que en ese lapso de tiempo pudo haber ocurrido un daño en la integridad del intestino, que lleva a una inflamación crónica persistente.



Con relación a la información reportada de los genes *ZBTB* y su represión sobre algunas citocinas, se ha reportado que los FT *ZBTB2*, *ZBTB4* y *ZBTB38* reprimen la actividad de la proteína específica 1 (Sp1) debido a su capacidad de unión a zonas metiladas. Sp1 es un FT que actúa como activador de los genes de las citocinas IL-6 e IL-10, estas citocinas tienen un papel importante en la inmunoregulación de la infección, así como, un posible rol patogénico en la progresión de la enfermedad (Tanaka, Narazaki, & Kishimoto, 2014; Tone, Powell, Tone, Thompson, & Waldmann, 2000). Nuestros resultados mostraron una tendencia al incremento de IL-10 en los grupos VIH⁺, lo que corresponde con reportes previos, en donde se ha observado que los niveles de IL-10 en plasma son significativamente más altos en los VIH⁺ en comparación con las personas VIH⁻, lo que reduce la capacidad del sistema inmunológico para eliminar el virus (Reuter, Pombo, & Betts, 2012). La IL-10 activa la vía de señalización IL-10R/JAK1/STAT3 que regula genes de progresión celular como *BCL2* y otros genes antiapoptóticos. Es secretada por varios fenotipos de LT CD4⁺, como Th2, Treg, Th1 y Th17, además de monocitos, macrófagos activados, células dendríticas, linfocitos B, células epiteliales, entre otras (Mosser & Zhang, 2008), es una molécula antiinflamatoria e inmunosupresora que inhibe la producción de IL-2 e INF- γ , así como otras citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-6 e IL-12) (Reuter et al., 2012). Está transcripcionalmente regulada por Sp1 y Sp3, que son FTs clave expresados de manera constitutiva y ubicua en las células. Contrario a lo que esperábamos, observamos una correlación positiva moderada entre los niveles de expresión de *ZBTB2* ($0.484; p < 0.05$) y *ZBTB38* ($r = 0.468; p < 0.05$) con los niveles de IL-10 en los pacientes VIH⁺. Debido a que la acción de los represores *ZBTB2*, *ZBTB4* y *ZBTB38* se realiza por competencia con el activador Sp1 por zonas metiladas del promotor de IL-10 y al ser Sp1 una proteína expresada de manera constitutiva, creemos que los niveles de expresión de estos represores transcripcionales, no están lo suficientemente incrementados como para observar una represión neta de la IL-10, o bien, que es probable la participación de otros factores moleculares que podrían estar determinando la unión de Sp1 sobre la de los represores *ZBTB2*, *ZBTB4* y *ZBTB38*. Sería de suma importancia realizar un diseño experimental que permita determinar con detalle el nivel de expresión necesario de estos FTs *ZBTB* para llevar a cabo la represión por competencia con Sp1 de citocinas como IL-10 ó bien, determinar qué factores podrían estar asociados a este comportamiento.



Adicionalmente, observamos una correlación positiva moderada entre los niveles de IL-17 y el gen *ZBTB17* ($r=0.485$; $p<0.05$) en los pacientes VIH⁺, la cual presentó mayor significancia en el grupo de pacientes naïve a TAR ($r = 0.90$; $p<0.01$). Esta citocina se ha reportado incrementada en las personas que viven con VIH, al igual que el IFN- γ (Maek-A-Nantawat, Buranapraditkun, Klaewsongkram, & Ruxrungthum, 2007). En nuestros resultados hubo una tendencia al incremento de los niveles de IL-17 en los CE y en el grupo con TAR, aunque sin significancia estadística. Cabe mencionar que en la infección por VIH, se produce un agotamiento profundo de las células Th17 que contribuye a la pérdida de la integridad intestinal, que a su vez lleva a un aumento de la translocación microbiana y por tanto a la activación inmune sistémica; sin embargo, eso no ocurre con los CE quienes tienen un control de la viremia y un sistema inmunológico más preservado (Caetano et al., 2020).

Diversos estudios han demostrado que tras el uso prolongado del TAR, el número y función de las células Th17 se ven restaurados, aunque no como al estado previo a la infección, lo que está asociado a un mejor pronóstico de la infección (Klatt & Brenchley, 2010). La IL-23 tiene un papel importante en la diferenciación de las células Th17, en nuestro trabajo encontramos niveles significativamente incrementados de IL-23 en CE, así como en pacientes con TAR; por lo que, esta citocina podría estar contribuyendo a la activación de la vía (IL-12R β /IL-23R)/JAK2/STAT3/IL-7A y por tanto a la diferenciación de células Th17 secretoras de IL-17. En cuanto a la expresión del gen *ZBTB17*, como se menciono anteriormente, en los CE se observó una sobreexpresión a un nivel similar que en los pacientes naïve a TAR, de hecho en un analisis *in silico* de células Th17 provenientes de CE y pacientes naïve a TAR se observó como el receptor de IL-23 (IL-23R) se encontraba incrementado en ambos grupos (Nunnari et al., 2015), por lo que seria interesante determinar si el represor ZBTB17 tiene algún efecto sobre la vía del IL-23R en las células Th17 secretoras de IL-17, y así poder dilucidar si existe una interacción entre el FT ZBTB17 e IL-17.



En resumen, los resultados obtenidos en este trabajo en conjunto con las fuentes bibliográficas consultadas nos llevan a proponer un posible modelo de interacción entre los FT ZBTB y el VIH-1 en los linfocitos T CD4⁺. En este modelo, los FT ZBTB participarían en la represión de la transcripción por unión directa al DNA proviral, así como, en el mantenimiento de los reservorios de vida media larga (LT CD4⁺_M). Por un lado, la unión de los FT dependientes de DNA metilado ZBTB2, ZBTB4 y ZBTB38 a las zonas CpGs de la región 5'LTR del VIH-1 podría reprimir el inicio de la transcripción; adicionalmente, ZBTB2 podría potenciar la represión a este mismo nivel al competir por el sitio de unión del activador Sp1 en la región 5'LTR. Mientras que, ZBTB7A que se une a la región IST del 5'LTR, llevaría a la interrupción de la transcripción a nivel de elongación (previamente reportado por Pessler *et al.*). Por otro lado, ZBTB7B y ZBTB17 podrían favorecer la persistencia de los reservorios virales; ZBTB7B por un lado al reprimir la transcripción de los genes *RUNX3* y *PRDM1* y por tanto, la producción de moléculas (*RUNX3* y *Blimp-1*) propias de las células efectoras de corta duración, estableciéndose así, una memoria efectiva y duradera (Ciucci *et al.*, 2019); mientras que por otro lado, ZBTB17 posiblemente regule positivamente la vía de señalización IL-7/IL-7R/STAT5/Bcl2 a través de la represión del gen *SOCS-1* (Möröy *et al.*, 2011), favoreciendo la supervivencia y la proliferación de los LT CD4⁺_M (Fig. 41), sin embargo, investigaciones más detalladas al respecto son necesarias.

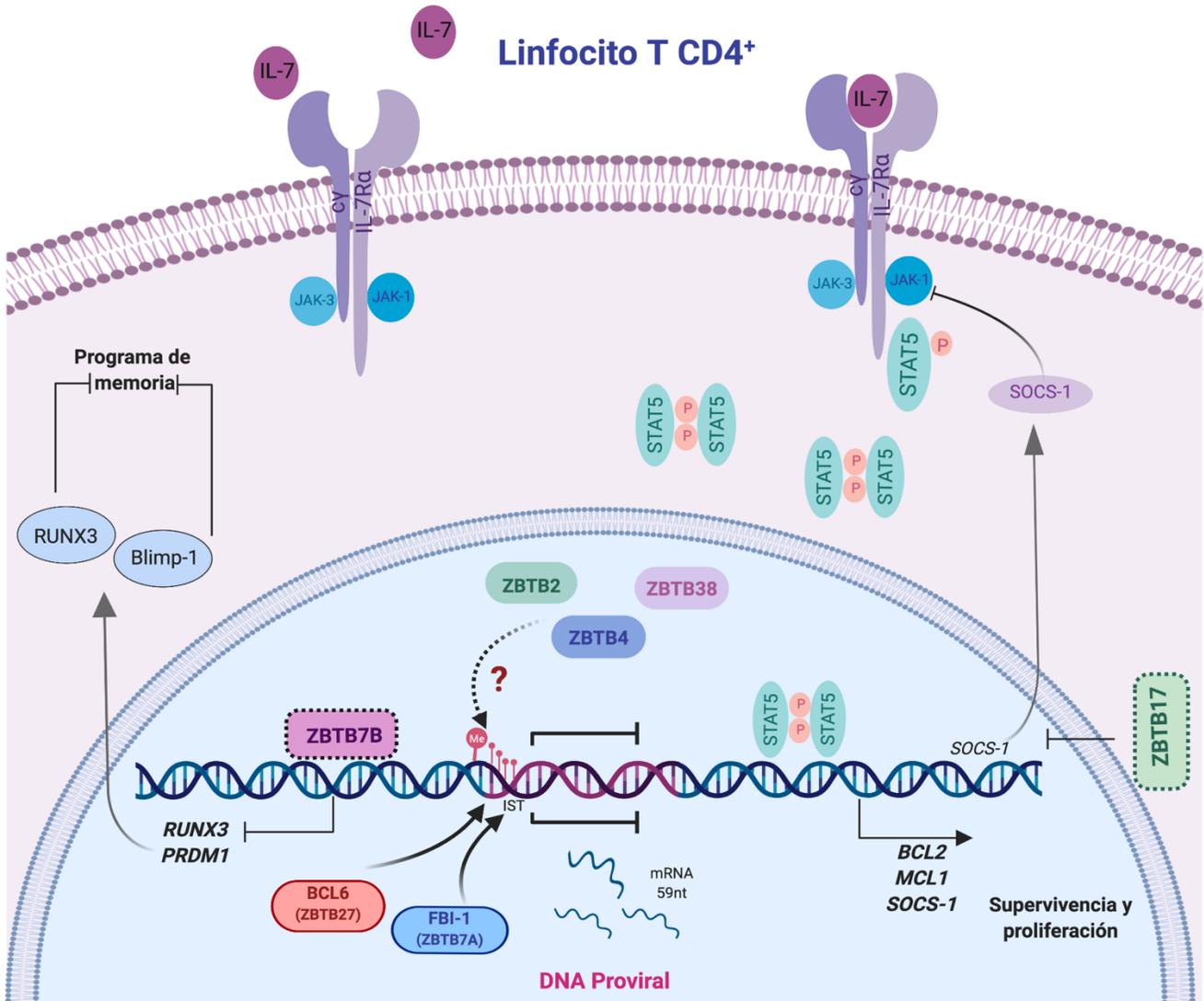


Figura 42. Modelo propuesto para ilustrar la interacción de los represores ZBTB y el VIH-1 en Linfocitos T CD4⁺.

De acuerdo al perfil de expresión de los genes *ZBTB* en los LT CD4⁺, se hipotetizan las siguientes interacciones. 1) El factor transcripcional ZBTB7A (FBI-1) y BCL6 se unen directamente al DNA proviral y reprimen su transcripción (Baron et al., 1997; Pessler et al., 1997). El mecanismo de ZBTB7A se encuentra bien descrito, este se une a una región del LTR del VIH, denominada inductor de transcritos cortos llevando a la interrupción de la elongación y generando transcritos de tan solo 59 nt. 2) Los represores transcripcionales dependientes de DNA metilado ZBTB2, ZBTB4 y ZBTB38 al estar sobreexpresados podrían interaccionar con la región 5'LTR del VIH, la cual se ha observado que se encuentra hipermetilado en el VIH en estado latente. 3) El represor ZBTB7B (ThPOK) favorece el fenotipo de células de memoria de vida larga, a través del silenciamiento de los genes *RUNX3* y *PRDM1* genes activos en las células efectoras de corta duración. 4) El factor transcripcional ZBTB17 regula positivamente la vía IL-7/IL-7R/STAT5/Bcl-2 al reprimir el gen *SOCS-1* favoreciendo la vía y la transcripción de moléculas antiapoptóticas y de proliferación.



CONCLUSIONES

El análisis *in silico* realizado mostró diversos genes *ZBTB* diferencialmente expresados en los diferentes grupos VIH⁺. Con base a estos resultados y a la bibliografía se determinó que los genes *ZBTB2*, *ZBTB4*, *ZBTB5*, *ZBTB7A*, *ZBTB7B*, *ZBTB16*, *ZBTB17*, *ZBTB27(BCL6)*, *ZBTB29 (HIC1)* y *ZBTB38* fueron los genes con una mayor asociación a la infección por VIH-1.

Al realizar la cuantificación de los genes *ZBTB* en los LT CD4⁺ se observó un comportamiento heterogéneo en los niveles de expresión, lo cual evidencia sus diferentes funciones y las diversas vías en las que participan.

Una mayor expresión de los genes *ZBTB4*, *ZBTB7B* y *ZBTB38*, así como una menor expresión del gen *ZBTB16* en pacientes VIH⁺ con respecto a las personas VIH⁻, sugiere su posible participación en la infección por VIH-1.

La comparación entre los grupos evidenció una mayor expresión de *ZBTB7A*, *ZBTB2*, *ZBTB4*, *ZBTB7B*, *ZBTB38* y *HIC1* en los controladores de élite con respecto a los otros grupos. Este grupo es caracterizado por controlar la viremia de manera espontánea, mientras que, los pacientes naïve a TAR tienen una replicación viral activa. Una mayor expresión de estos genes sugiere su posible participación en la represión de la transcripción del VIH, hecho que ya ha sido descrito para *ZBTB7A* y *HIC1*.

Los genes *ZBTB7B* y *ZBTB17* están asociados a funciones del mantenimiento de la memoria, supervivencia y proliferación de LT CD4⁺, los niveles incrementados en los grupos VIH⁺, sugiere que podrían estar contribuyendo a la persistencia del reservorio.

Los niveles de citocinas séricas proinflamatorias IL-1 β , IFN- γ , IL-23, IL-33 fueron mayores en los grupos de controladores de élite, seguido por los pacientes con TAR, esto podría estar relacionado a un mayor conteo de LT CD4⁺ productores de citocinas, a la activación del sistema inmune y por tanto a un mayor control de la infección, en comparación con los pacientes naïve a TAR con depleción de LT CD4⁺.



En conjunto, los resultados de nuestro estudio sugieren la existencia de un ambiente predominantemente represivo, debido al aumento en la expresión de los genes *ZBTB* en los LT CD4⁺, que podría estar contribuyendo al silenciamiento génico de la célula infectada y por tanto al del VIH-1, así como posiblemente, ser uno de los mecanismos por el cual los CE controlan la replicación viral.

Finalmente, este trabajo contribuye a fortalecer el conocimiento de la interacción VIH-1 y LT CD4⁺ y de manera particular, la posible participación de algunos miembros de la familia de genes *ZBTB* sobre la modulación de la expresión del DNA proviral del VIH, así como en la formación y mantenimiento de los reservorios virales. Esta información, podría ser la base para realizar proyectos de investigación que permitan el desarrollo de estrategias terapéuticas dirigidas a eliminar al virus latente y sus reservorios. Ya que, la clave para eliminar la infección por el VIH será la combinación de estrategias dirigidas a evitar la expansión del reservorio con VIH latente, así como la reactivación del virus para ser eliminado por la acción del sistema inmune y el tratamiento antirretroviral.

LIMITACIONES

Los controladores de élite representan <1% de la población infectada con VIH-1, por lo que este grupo representó una limitante para nuestro proyecto. Las comparaciones de los niveles de expresión de los genes *ZBTB* se realizaron con una n de 5 pacientes CE. Mientras que las comparaciones de los niveles de citocinas se realizaron con una n de 3.



PERSPECTIVAS

A partir de los estudios y discusiones presentados en esta tesis doctoral, las perspectivas de trabajos futuros se orientan a investigar a profundidad la participación de los FT ZBTB sobre la represión de la transcripción del VIH-1 y en la persistencia de los reservorios virales.

En un primer plano estarían los trabajos destinados a comprobar los resultados de expresión génica observados, ahora a nivel de proteínas en los diferentes grupos de estudio y de manera relevante en el grupo de CE. Estos resultados podrían fortalecer las bases para proponer a los genes *ZBTB7A*, *ZBTB38*, *ZBTB2*, *HIC1*, *ZBTB7B* y *ZBTB4*, cuyas expresiones se mostraron incrementadas en el grupo de CE como posibles biomarcadores predictores de un control virológico.

Adicionalmente, sería interesante la realización de cultivos *in vitro* de linfocitos T CD4⁺ para dilucidar si los FTs ZBTB2, ZBTB4 y ZBTB38 tienen la capacidad de unirse a las regiones metiladas del genoma del VIH-1 como mostraron nuestros resultados del análisis *in silico* y si estos tienen efecto sobre el remodelamiento de la cromatina y por tanto, en la represión transcripcional del VIH-1.

En un segundo plano, se propone la realización de ensayos en el contexto de la persistencia de los reservorios virales; en donde a través del desarrollo de un modelo celular de latencia viral se explore el efecto de la inhibición del FT ZBTB7B sobre los LT CD4⁺_M infectados con el VIH latente, y observar si conlleva a la generación de un fenotipo de células efectoras de vida corta; en ese sentido, investigar el FT ZBTB17 sobre el gen *SOCS-1* en la vía de IL-7/IL-7R y su efecto final en la supervivencia y proliferación homeostática de LT CD4⁺_M infectados con el VIH latente. Los resultados generados podrían contribuir a mejorar las actuales estrategias terapéuticas dirigidas a disminuir el tamaño del reservorio viral.

Finalmente, se propone la realización de técnicas más especializadas como la determinación del transcriptoma y proteoma en los LT CD4⁺ de los diferentes grupos de estudio, esto nos permitiría entender mejor las funciones de los FT ZBTB y sus posibles interacciones en la infección por VIH, información que actualmente es escasa tanto en el contexto VIH y como no



VIH. Además permitiría estudiar a mayor profundidad, si los represores transcripcionales ZBTB tienen algún efecto sobre las citocinas específicas que regulan la transcripción del VIH-1.

Una mayor investigación de los factores transcripcionales ZBTB discutidos en este trabajo, podrían generar información relevante en la búsqueda de blancos terapéuticos cuya inhibición podría contribuir a la reactivación de la transcripción del virus (estrategia de cura *shock and kill*), o a mantener estados de latencia viral profunda (estrategia de cura *block and lock*). De comprobarse estas hipótesis, este trabajo permitirá sentar las bases para el diseño de fármacos guiados hacia estos objetivos.



REFERENCIAS

- Alcamí, J., & Coiras, M. (2011). Inmunopatogenia de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(3), 216–226. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.01.006>
- Altfeld, M., Barmeyer, A., Behrens, G., Berzow, D., Boesecke, C., Braun, P., ... Wolf, E. (2015). *Hiv 2015/16*.
- An, P., & Winkler, C. A. (2010). Host genes associated with HIV / AIDS : advances in gene discovery, 119–131. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2010.01.002>
- Arima, M., Toyama, H., Ichii, H., Kojima, S., Okada, S., Hatano, M., ... Tokuhsa, T. (2014). A Putative Silencer Element in the IL-5 Gene Recognized by Bcl6. *The Journal of Immunology*, 169(2), 829–836. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.2.829>
- Babu, H., Ambikan, A. T., Gabriel, E. E., Svensson Akusjärvi, S., Palaniappan, A. N., Sundaraj, V., ... Neogi, U. (2019). Systemic Inflammation and the Increased Risk of Inflamm-Aging and Age-Associated Diseases in People Living With HIV on Long Term Suppressive Antiretroviral Therapy. *Frontiers in Immunology*, 10(August), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01965>
- Baron, B. W., Desai, M., Julia Baber, L., Paras, L., Zhang, Q., Sadhu, A., ... Zeleznik-Le, N. (1997). BCL6 can repress transcription from the human immunodeficiency virus type I promoter/enhancer region. *Genes Chromosomes and Cancer*, 19(1), 14–21. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2264\(199705\)19:1<14::AID-GCC3>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2264(199705)19:1<14::AID-GCC3>3.0.CO;2-3)
- Bereshchenko, O. R., Gu, W., & Dalla-Favera, R. (2002). Acetylation inactivates the transcriptional repressor BCL6. *Nature Genetics*, 32(4), 606–613. <https://doi.org/10.1038/ng1018>
- Blankson, J. N. (2010). Effector mechanisms in HIV-1 infected elite controllers: Highly active immune responses? *Antiviral Research*, 85(1), 295–302. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.08.007>
- Blazkova, J., Trejbalova, K., Gondois-Rey, F., Halfon, P., Philibert, P., Guiguen, A., ... Hirsch, I. (2009). CpG methylation controls reactivation of HIV from latency. *PLoS Pathogens*, 5(8). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000554>
- Boulassel, M. R., Chomont, N., Pai, N. P., Gilmore, N., Sékaly, R. P., & Routy, J. P. (2012). CD4 T cell nadir independently predicts the magnitude of the HIV reservoir after prolonged suppressive antiretroviral therapy. *Journal of Clinical Virology*, 53(1), 29–32. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2011.09.018>
- Brenchley, J. M., Schacker, T. W., Ruff, L. E., Price, D. A., Taylor, J. H., Beilman, G. J., ... Douek, D. C. (2004). CD4⁺ T Cell Depletion during all Stages of HIV Disease Occurs Predominantly in the Gastrointestinal Tract. *The Journal of Experimental Medicine*, 200(6), 749–759. <https://doi.org/10.1084/jem.20040874>
- Caetano, D. G., de Paula, H. H. S., Bello, G., Hoagland, B., Villela, L. M., Grinsztejn, B., ... Côrtes, F. H. (2020). HIV-1 elite controllers present a high frequency of activated regulatory T and Th17 cells. *PLoS ONE*, 15(2), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228745>
- Cai, Y., Abdel-Mohsen, M., Tomescu, C., Xue, F., Wu, G., Howell, B. J., ... Montaner, L. J. (2018). BCL6 Inhibitor-mediated Downregulation of pSAMHD1 and T Cell Activation Are Associated with Decreased HIV Infection and Reactivation. *Journal of Virology*, (October). <https://doi.org/10.1128/JVI.01073-18>
- Cary, D. C., Fujinaga, K., & Peterlin, B. M. (2016). Molecular mechanisms of HIV latency. *Journal of Clinical Investigation*, 126(2), 448–454. <https://doi.org/10.1172/JCI80565>
- Ciucci, T., Vacchio, M. S., Gao, Y., Tomassoni Ardori, F., Candia, J., Mehta, M., ... Bosselut, R. (2019). The Emergence and Functional Fitness of Memory CD4⁺ T Cells Require the Transcription Factor Thpok. *Immunity*, 50(1), 91–105.e4. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.12.019>
- Colin, L., Vandenhoudt, N., de Walque, S., van Driessche, B., Bergamaschi, A., Martinelli, V., ... van Lint, C. (2011). The AP-1 binding sites located in the pol gene intragenic regulatory region of HIV-1 are important for viral replication. *PLoS ONE*, 6(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019084>



- Conway, J. M., & Perelson, A. S. (2016). Residual Viremia in Treated HIV+Individuals. *PLoS Computational Biology*, 12(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004677>
- Crowell, T. A., Gebo, K. A., Blankson, J. N., Korthuis, P. T., Yehia, B. R., Rutstein, R. M., ... Berry, S. A. (2015). Hospitalization rates and reasons among HIV elite controllers and persons with medically controlled HIV infection. *Journal of Infectious Diseases*, 211(11), 1692–1702. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu809>
- Crowell, T. A., & Hatano, H. (2015). Clinical outcomes and antiretroviral therapy in “elite” controllers: a review of the literature. *Journal of Virus Eradication*, 1(2), 72–77. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27123315>
- de Dieuleveult, M., & Miotto, B. (2018, November 1). DNA Methylation and Chromatin: Role(s) of Methyl-CpG-Binding Protein ZBTB38. *Epigenetics Insights*. SAGE Publications Ltd. <https://doi.org/10.1177/2516865718811117>
- Deeks, S. G. (2011). HIV Infection, Inflammation, Immunosenescence, and Aging. *Annual Review of Medicine*, 62(1), 141–155. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-042909-093756>
- Deeks, S. G., Overbaugh, J., Phillips, A., & Buchbinder, S. (2015). HIV infection. *Nature Reviews Disease Primers*, 1, 15035. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.35>
- Delgado, R. (2011). Características virológicas del VIH. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(1), 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2010.10.001>
- Deltour, S., Guerardel, C., & Leprince, D. (2002). Recruitment of SMRT/N-CoR-mSin3A-HDAC-repressing complexes is not a general mechanism for BTB/POZ transcriptional repressors: The case of HIC-1 and gamma FBP-B. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(26), 14831–14836. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.26.14831>
- Derived from Harrison’s Principles of Internal Medicine, 17th Edition. (2010). *Harroson’s Infectious Diseases. PhD Proposal* (Vol. 1). <https://doi.org/10.1073/pnas.0703993104>
- Duan, S., Cermak, L., Pagan, J. K., Rossi, M., Martinengo, C., di Celle, P. F., ... Pagano, M. (2012). FBXO11 targets BCL6 for degradation and is inactivated in diffuse large B-cell lymphomas. *Nature*, 481(7379), 90–93. <https://doi.org/10.1038/nature10688>
- Dunn, J., McCuaig, R., Tu, W. J., Hardy, K., & Rao, S. (2015). Multi-layered epigenetic mechanisms contribute to transcriptional memory in T lymphocytes. *BMC Immunology*, 16(1), 27. <https://doi.org/10.1186/s12865-015-0089-9>
- Duy, C., Yu, J. J., Nahar, R., Swaminathan, S., Kweon, S. M., Polo, J. M., ... Müschen, M. (2010). BCL6 is critical for the development of a diverse primary B cell repertoire. *Journal of Experimental Medicine*, 207(6), 1209–1221. <https://doi.org/10.1084/jem.20091299>
- Engelman, A., & Cherepanov, P. (2012). The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. *Nature Reviews. Microbiology*, 10(4), 279–290. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2747>
- Fernandes, J. R., Berthoud, T. K., Kumar, A., & Angel, J. B. (2017). IL-23 signaling in Th17 cells is inhibited by HIV infection and is not restored by HAART: Implications for persistent immune activation. *PLoS ONE*, 12(11), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186823>
- Filion, G. J. P., Zhenilo, S., Salozhin, S., Yamada, D., Prokhortchouk, E., & Defossez, P. (2006). A Family of Human Zinc Finger Proteins That Bind Methylated DNA and Repress Transcription A Family of Human Zinc Finger Proteins That Bind Methylated DNA and Repress Transcription. *Molecular and Cellular Biology*, 26(1), 169. <https://doi.org/10.1128/MCB.26.1.169>
- Freeman, M. L., Shive, C. L., Nguyen, T. P., Younes, S. A., Panigrahi, S., & Lederman, M. M. (2016). Cytokines and T-Cell Homeostasis in HIV Infection. *Journal of Infectious Diseases*, 214, S51–S57. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw287>
- Gaardbo, J. C., Hartling, H. J., Gerstoft, J., & Nielsen, S. D. (2012). Thirty Years with HIV Infection — Nonprogression Is Still Puzzling : Lessons to Be Learned from Controllers and Long-Term Nonprogressors, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/161584>



- Gonzalo-gil, E., Ikediobi, U., & Sutton, R. E. (2017). Mechanisms of Virologic Control and Clinical Characteristics of HIV + Elite / Viremic Controllers. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 90, 245–259.
- Goonetilleke, N., Clutton, G., Swanstrom, R., & Joseph, S. B. (2019). Blocking formation of the stable HIV reservoir: A new perspective for HIV-1 cure. *Frontiers in Immunology*, 10(AUG), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01966>
- He, S., Liu, F., Xie, Z., Zu, X., Xu, W., & Jiang, Y. (2010). P-Glycoprotein/MDR1 regulates pokemon gene transcription through p53 expression in human breast cancer cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(9), 3039–3051. <https://doi.org/10.3390/ijms11093039>
- Hodge, J. N., Srinivasula, S., Hu, Z., Read, S. W., Porter, B. O., Kim, I., ... Sereti, I. (2011). Decreases in IL-7 levels during antiretroviral treatment of HIV infection suggest a primary mechanism of receptor-mediated clearance. *Blood*, 118(12), 3244–3253. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-12-323600>
- Hokello, J., Sharma, A. L., Dimri, M., & Tyagi, M. (2019). Insights into the HIV Latency and the Role of Cytokines. *Pathogens*, 8(3), 137. <https://doi.org/10.3390/pathogens8030137>
- Hope, T. J. (2000). Structure , Expression , and Regulation of the HIV Genome HIV InSite Knowledge Base Chapter Viral Proteins and Their Functions Structural Proteins Gag The gag gene gives rise to the 55-kilodalton (kD) Gag precursor protein , also called p55 , which is e, (November).
- Ishida, T., Hamano, A., Koiwa, T., & Watanabe, T. (2006). 5' long terminal repeat (LTR)-selective methylation of latently infected HIV-1 provirus that is demethylated by reactivation signals. *Retrovirology*, 3, 1–7. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-3-69>
- Jeon, B. N., Choi, W. Il, Yu, M. Y., Yoon, A. R., Kim, M. H., Yun, C. O., & Hur, M. W. (2009a). ZBTB2, a novel master regulator of the p53 pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 284(27), 17935–17946. <https://doi.org/10.1074/jbc.M809559200>
- Jeon, B. N., Choi, W. Il, Yu, M. Y., Yoon, A. R., Kim, M. H., Yun, C. O., & Hur, M. W. (2009b). ZBTB2, a novel master regulator of the p53 pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 284(27), 17935–17946. <https://doi.org/10.1074/jbc.M809559200>
- Jiang, C., Lian, X., Gao, C., Sun, X., Einkauf, K. B., Chevalier, J. M., ... Yu, X. G. (2020). Distinct viral reservoirs in individuals with spontaneous control of HIV-1. *Nature*, (October 2019). <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2651-8>
- Karemaker, I. D., & Vermeulen, M. (2018). ZBTB 2 reads unmethylated CpG island promoters and regulates embryonic stem cell differentiation . *EMBO Reports*, 19(4). <https://doi.org/10.15252/embr.201744993>
- Karn, J. and Stotzfus, CM. (2012). {Transcriptional and Posttranscriptional Regulation of HIV-1 Gene Expression}. *Cold Spring Harb Perspect Med.*, 2(2), a006916.
- Kedzierska, K., & Crowe, S. M. (2001). Cytokines and HIV-1: Interactions and clinical implications. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*. International Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.1177/095632020101200301>
- Kedzierska, Katherine, & Crowe, S. M. (2001). Review Cytokines and HIV-1: interactions and clinical implications. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*, 12(3), 133–150.
- Kemnic, T. R., & Gulick, P. G. (2019). *HIV Antiretroviral Therapy*. *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Kilareski, E. M., Shah, S., Nonnemacher, M. R., & Wigdahl, B. (2009). Regulation of HIV-1 transcription in cells of the monocyte-macrophage lineage. *Retrovirology*, 6, 118. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-6-118>
- Kim, D. Y., Kwon, E., Hartley, P. D., Crosby, D. C., Mann, S., Krogan, N. J., & Gross, J. D. (2013). CBF β Stabilizes HIV Vif to Counteract APOBEC3 at the Expense of RUNX1 Target Gene Expression. *Molecular Cell*, 49(4), 632–644. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.12.012>
- Kim, J. K., Samaranayake, M., & Pradhan, S. (2009, February). Epigenetic mechanisms in mammals. *Cellular and Molecular Life Sciences*. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8432-4>
- Klatt, N. R., & Brenchley, J. M. (2010). Th17 cell dynamics in HIV infection. *Current Opinion in HIV and AIDS*,



5(2), 135–140. <https://doi.org/10.1097/COH.0b013e3283364846>

- Klaver, B., & Berkhout, B. (1994). Comparison of 5' and 3' long terminal repeat promoter function in human immunodeficiency virus. *Journal of Virology*, 68(6), 3830–3840. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8189520>
- Knosp, C. A., & Johnston, J. A. (2012). Regulation of CD4+ T-cell polarization by suppressor of cytokine signalling proteins. *Immunology*, 135(2), 101–111. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2011.03520.x>
- Kogan, M., & Rappaport, J. (2011). HIV-1 accessory protein Vpr: relevance in the pathogenesis of HIV and potential for therapeutic intervention. *Retrovirology*, 8, 25. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-8-25>
- Koh, D. I., Choi, W. Il, Jeon, B. N., Lee, C. E., Yun, C. O., & Hur, M. W. (2009). A novel POK family transcription factor, ZBTB5, represses transcription of p21CIP1 gene. *Journal of Biological Chemistry*, 284(30), 19856–19866. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.025817>
- Kosan, C., Saba, I., Godmann, M., Herold, S., Herkert, B., Eilers, M., & Möry, T. (2010). Transcription Factor Miz-1 Is Required to Regulate Interleukin-7 Receptor Signaling at Early Commitment Stages of B Cell Differentiation. *Immunity*, 33(6), 917–928. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.11.028>
- Kulpa, D. A., & Chomont, N. (2015). HIV persistence in the setting of antiretroviral therapy: when, where and how does HIV hide? *Journal of Virus Eradication*, 1(2), 59–66. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26448966> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4593515>
- Lange, U. C., Verdikt, R., Ait-Ammar, A., & Van Lint, C. (2020). Epigenetic crosstalk in chronic infection with HIV-1. *Seminars in Immunopathology*, 42(2), 187–200. <https://doi.org/10.1007/s00281-020-00783-3>
- Le Douce, V., Forouzanfar, F., Eilebrecht, S., Van Driessche, B., Ait-Ammar, A., Verdikt, R., ... Schwartz, C. (2016). HIC1 controls cellular- and HIV-1- gene transcription via interactions with CTIP2 and HMGA1. *Scientific Reports*, 6(September), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep34920>
- Le Saout, C., Lane, H. C., & Catalfamo, M. (2012). The Role of Cytokines in the Pathogenesis and treatment of HIV Infection. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 23(0), 207–214. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2012.05.007>.The
- Lee, S. U., & Maeda, T. (2012). POK/ZBTB proteins: An emerging family of proteins that regulate lymphoid development and function. *Immunological Reviews*, 247(1), 107–119. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2012.01116.x>
- Leimbach, A., Hacker, J., & Dobrindt, U. (2013). Intradermal Rabies Vaccination: The Evolution and Future of Pre- and Post-exposure Prophylaxis. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 358(January), 3–32. <https://doi.org/10.1007/82>
- Leon, A., Perez, I., Ruiz-Mateos, E., Benito, J. M., Leal, M., Lopez-Galindez, C., ... Garcia, F. (2016). Rate and predictors of progression in elite and viremic HIV-1 controllers. *Aids*, 30(8), 1209–1220. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000001050>
- Li, G., Piampongsant, S., Faria, N. R., Voet, A., Pineda-Peña, A.-C., Khouri, R., ... Theys, K. (2015). An integrated map of HIV genome-wide variation from a population perspective. *Retrovirology*, 12(1), 18. <https://doi.org/10.1186/s12977-015-0148-6>
- Li, Y., Yao, M., Wu, T., Zhang, L., Wang, Y., Chen, L., ... Wang, J. (2019). Loss of hypermethylated in cancer 1 (HIC1) promotes lung cancer progression. *Cellular Signalling*, 53, 162–169. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2018.10.006>
- Lin, H. C., Ching, Y. H., Huang, C. C., Pao, P. C., Lee, Y. H., Chang, W. C., ... Lee, Y. C. (2019). Promyelocytic leukemia zinc finger is involved in the formation of deep layer cortical neurons. *Journal of Biomedical Science*, 26(1). <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0519-8>
- Liszewski, M. K., Yu, J. J., & Doherty, U. O. (2009). Detecting HIV-1 integration by repetitive-sampling Alu-gag PCR. *Methods*, 47(4), 254–260. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2009.01.002>



- Liu, L. L., Zhao, H., Ma, T. F., Ge, F., Chen, C. S., & Zhang, Y. P. (2015). Identification of valid reference genes for the normalization of RT-qPCR expression studies in human breast cancer cell lines treated with and without transient transfection. *PLoS ONE*, *10*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117058>
- Luckheeram, R. V., Zhou, R., Verma, A. D., & Xia, B. (2012). CD4 +T cells: Differentiation and functions. *Clinical and Developmental Immunology*, *2012*. <https://doi.org/10.1155/2012/925135>
- Madec, Y., Boufassa, F., Avettand-fenoel, V., Hendou, S., Melard, A., Boucherit, S., ... Rouzioux, C. (2009). Early Control of HIV-1 Infection in Long-Term Nonprogressors Followed Since Diagnosis in the ANRS SEROCO / HEMOCO Cohort, *50*(1), 25–28.
- Maeda, T. (2016a). Erratum to: Regulation of hematopoietic development by ZBTB transcription factors (Int J Hematol, 10.1007/s12185-016-2035-x). *International Journal of Hematology*, *104*(3), 408. <https://doi.org/10.1007/s12185-016-2059-2>
- Maeda, T. (2016b). Regulation of hematopoietic development by ZBTB transcription factors Linker region. <https://doi.org/10.1007/s12185-016-2035-x>
- Majerowicz, D., Alves-Bezerra, M., Logullo, R., Fonseca-De-Souza, A. L., Meyer-Fernandes, J. R., Braz, G. R. C., & Gondim, K. C. (2011). Looking for reference genes for real-time quantitative PCR experiments in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). *Insect Molecular Biology*, *20*(6), 713–722. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2011.01101.x>
- Mbonye, U., & Karn, J. (2017). The Molecular Basis for Human Immunodeficiency Virus Latency, (July), 1–25.
- McKinney, E. F., & Smith, K. G. C. (2016). T-cell exhaustion: Understanding the interface of chronic viral and autoinflammatory diseases. *Immunology and Cell Biology*, *94*(10), 935–942. <https://doi.org/10.1038/icb.2016.81>
- Mehraj, V., Ponte, R., & Routy, J. P. (2016). The Dynamic Role of the IL-33/ST2 Axis in Chronic Viral-infections: Alarming and Adjuvanting the Immune Response. *EBioMedicine*, *9*, 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.06.047>
- Michaela, M. (2013). HIV-associated chronic immune activation, *254*, 78–101.
- Mondal, A., Sawant, D., & Dent, A. L. (2010). Transcriptional Repressor BCL6 Controls Th17 Responses by Controlling Gene Expression in Both T Cells and Macrophages. *The Journal of Immunology*, *184*(8), 4123–4132. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901242>
- Monel, B., Mckeon, A., Lamothe-Molina, P., Jones, R. B., Le Gall, S., Correspondence, B. D. W., ... Walker, B. D. (2019). HIV Controllers Exhibit Effective CD8+ T Cell Recognition of HIV-1-Infected Non-activated CD4+ T Cells. *CellReports*, *27*, 142-153.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.03.016>
- Montoya Guarín, C. J., Moreno Fernandez, M. E., & Rugeles López, M. T. (2006). Reacciones y alteraciones del sistema inmune durante la infección por el VIH-1. *Asociación Colombiana De Infectología*, 250–265.
- Möröy, T., Saba, I., & Kosan, C. (2011). The role of the transcription factor Miz-1 in lymphocyte development and lymphomagenesis-Binding Myc makes the difference. *Seminars in Immunology*, *23*(5), 379–387. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2011.09.001>
- Mosser, D. M., & Zhang, X. (2008, December). Interleukin-10: New perspectives on an old cytokine. *Immunological Reviews*. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00706.x>
- Murray, A. J., Kwon, K. J., Farber, D. L., & Siliciano, R. F. (2016). The Latent Reservoir for HIV-1: How Immunologic Memory and Clonal Expansion Contribute to HIV-1 Persistence. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *197*(2), 407–417. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600343>
- Niu, H., Ye, B. H., & Dalla-Favera, R. (1998). Antigen receptor signaling induces MAP kinase-mediated phosphorylation and degradation of the BCL-6 transcription factor. *Genes and Development*, *12*(13), 1953–1961. <https://doi.org/10.1101/gad.12.13.1953>
- Nunnari, G., Malaguarnera, L., Lazzara, F., Cambria, D., Distefano, G., Longo, A., ... Rosa, M. Di. (2015). Th17 common genes in CD4 T-cells of HIV-1-infected naïve patients and elite controllers, *1*(2), 1–8.



- Ochoa-Hernández, A. B., Ramos-Solano, M., Meza-Canales, I. D., García-Castro, B., Rosales-Reynoso, M. A., Rosales-Aviña, J. A., ... Aguilar-Lemarroy, A. (2012). Peripheral T-lymphocytes express WNT7A and its restoration in leukemia-derived lymphoblasts inhibits cell proliferation. *BMC Cancer*, *12*(1), 60. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-60>
- Okulicz, J. F., & Lambotte, O. (2011). Epidemiology and clinical characteristics of elite controllers. *Current Opinion in HIV and AIDS*, *6*(3), 163–168. <https://doi.org/10.1097/COH.0b013e328344f35e>
- Osuji, F. N., Onyenekwe, C. C., Ahaneku, J. E., & Ukibe, N. R. (2018). The effects of highly active antiretroviral therapy on the serum levels of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in HIV infected subjects. *11 Medical and Health Sciences 1103 Clinical Sciences 11 Medical and Health Sciences 1107 Immunology. Journal of Biomedical Science*, *25*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12929-018-0490-9>
- Palacios, J. A., Perez-Pinar, T., Toro, C., Sanz-Minguela, B., Moreno, V., Valencia, E., ... Rodes, B. (2012). Long-Term Nonprogressor and Elite Controller Patients Who Control Viremia Have a Higher Percentage of Methylation in Their HIV-1 Proviral Promoters than Aviremic Patients Receiving Highly Active Antiretroviral Therapy. *Journal of Virology*, *86*(23), 13081–13084. <https://doi.org/10.1128/jvi.01741-12>
- Palmer, D. C., & Restifo, N. P. (2009). Suppressors of cytokine signaling (SOCS) in T cell differentiation, maturation, and function. *Trends in Immunology*, *30*(12), 592–602. <https://doi.org/10.1016/j.it.2009.09.009>
- Patel, J. H., & McMahon, S. B. (2007). BCL2 is a downstream effector of MIZ-1 essential for blocking c-MYC-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(1), 5–13. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609138200>
- Pereyra, F., Palmer, S., Miura, T., Block, B. L., Wiegand, A., Rothchild, A. C., ... Walker, B. D. (2013). relationship to immunologic parameters, *200*(February 2008), 984–990. <https://doi.org/10.1086/605446.Persistent>
- Pernas, M., Tarancón-Diez, L., Rodríguez-Gallego, E., Gómez, J., Prado, J. G., Casado, C., ... Ruiz-Mateos, E. (2017). Factors Leading to the Loss of Natural Elite Control of HIV-1 Infection. *Journal of Virology*, *2*(December), JVI.01805-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.01805-17>
- Pessler, F., & Hernandez, N. (2003). Flexible DNA binding of the BTB/POZ-domain protein FBI-1. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(31), 29327–29335. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302980200>
- Pessler, F., Pendergrast, P. S., Spring, C., & Hughes, H. (1997). Purification and Characterization of FBI-1 , a Cellular Factor That Binds to the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Inducer of Short Transcripts, *17*(7), 3786–3798.
- Plantier, J.-C., Plantier, J.-C., Leoz, M., Leoz, M., Dickerson, J. E., Dickerson, J. E., ... Simon, F. (2009). A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nature Medicine*, *15*(8), 871–872. <https://doi.org/10.1038/nm.2016>
- Raberger, J., Schebesta, A., Sakaguchi, S., Boucheron, N., Blomberg, K. E. M., Berglöf, A., ... Ellmeier, W. (2008). The transcriptional regulator PLZF induces the development of CD44 high memory phenotype T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(46), 17919–17924. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805733105>
- Rawlings, J. S., Rosler, K. M., & Harrison, D. A. (2004). The JAK/STAT signaling pathway. *Journal of Cell Science*, *117*(8), 1281–1283. <https://doi.org/10.1242/jcs.00963>
- Reuter, M. A., Pombo, C., & Betts, M. R. (2012). Lessons for development of therapeutics and vaccines. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, *23*(0), 181–191. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2012.05.005.Cytokine>
- Roff, S. R., Noon-Song, E. N., & Yamamoto, J. K. (2013). The significance of interferon- γ in HIV-1 pathogenesis, therapy, and prophylaxis. *Frontiers in Immunology*, *4*(DEC), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00498>
- Roh, H., Lee, M., Jeon, B., Choi, W., Kim, J., Yu, M., & Hur, M. (2007). Cellular Physiology Biochemistry and Biochemistry Regulation of Pokemon 1 Activity by Sumoylation. *Cellular Physiology and Biochemistry*, *752*.



- Ruelas, D. S., & Greene, W. C. (2013). Leading Edge Review An Integrated Overview of HIV-1 Latency. *Cell*, 155, 519–529. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.044>
- Saba, I., Kosan, C., Vassen, L., & Mo, T. (2011). IL-7R – dependent survival and differentiation of early T-lineage progenitors is regulated by the BTB / POZ domain transcription factor Miz-1, 117(12), 3370–3381. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-09-310680>.The
- Schiralli Lester, G. M., & Henderson, A. J. (2012). Mechanisms of HIV Transcriptional Regulation and Their Contribution to Latency. *Molecular Biology International*, 2012, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2012/614120>
- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3, 1101.
- Seki, Y., Yang, J., Okamoto, M., Tanaka, S., Goitsuka, R., Farrar, M. A., & Kubo, M. (2007). IL-7/STAT5 Cytokine Signaling Pathway Is Essential but Insufficient for Maintenance of Naive CD4 T Cell Survival in Peripheral Lymphoid Organs. *The Journal of Immunology*, 178(1), 262–270. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.1.262>
- Sharp, P. M., & Hahn, B. H. (2011). Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 1(1), 1–22. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006841>
- Sheldon, M., Ratnasabapathy, R., & Hernandez, N. (1993). Characterization of the inducer of short transcripts, a human immunodeficiency virus type 1 transcriptional element that activates the synthesis of short RNAs. *Molecular and Cellular Biology*, 13(2), 1251–1263.
- Shuai, K., & Liu, B. (2003). Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 3(11), 900–911. <https://doi.org/10.1038/nri1226>
- Siggs, O. M., & Beutler, B. (2012, September). The BTB-ZF transcription factors. *Cell Cycle*. Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.4161/cc.21277>
- Siliciano, R. F., & Greene, W. C. (2011). HIV Latency, 1–19.
- Stopak, K., De Noronha, C., Yonemoto, W., & Greene, W. C. (2003). HIV-1 Vif blocks the antiviral activity of APOBEC3G by impairing both its translation and intracellular stability. *Molecular Cell*, 12(3), 591–601. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00353-8](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00353-8)
- Takeshi Tokuhisa Okada, and, Hatano, M., Sakamoto, A., Kohno Nobue Takeda, Y., Arima, M., & Tsuruoka, N. (2003). Gene IL-18 Bcl6 Is a Transcriptional Repressor for the. *J Immunol References*, 171, 426–431. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.1.426>
- Tanaka, T., Narazaki, M., & Kishimoto, T. (2014). Il-6 in inflammation, Immunity, And disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(10). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016295>
- Tone, M., Powell, M. J., Tone, Y., Thompson, S. A. J., & Waldmann, H. (2000). IL-10 Gene Expression Is Controlled by the Transcription Factors Sp1 and Sp3. *The Journal of Immunology*, 165(1), 286–291. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.1.286>
- Turner, A. M. W., & Margolis, D. M. (2017). Chromatin regulation and the histone code in HIV latency. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 90(2), 229–243.
- Vacchio, M. S., Wang, L., Bouladoux, N., Carpenter, A. C., Xiong, Y., Williams, L. C., ... Bosselut, R. (2014). A ThPOK-LRF transcriptional node maintains the integrity and effector potential of post-thymic CD4+ T cells. *Nature Immunology*, 15(10), 947–956. <https://doi.org/10.1038/ni.2960>
- Vandergeeten, C., Fromentin, R., & Chomont, N. (2012). The role of cytokines in the establishment, persistence and eradication of the HIV reservoir. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 23(4–5), 143–149. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2012.05.001>
- Verma, M. (2014). Cancer epigenetics: Risk assessment, diagnosis, treatment, and prognosis. *Cancer Epigenetics: Risk Assessment, Diagnosis, Treatment, and Prognosis*, 1238, 1–799. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1804-1>
- Wen, W., Chen, S., Cao, Y., Zhu, Y., & Yamamoto, Y. (2005). HIV-1 infection initiates changes in the expression



- of a wide array of genes in U937 promonocytes and HUT78 T cells. *Virus Research*, 113(1), 26–35. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2005.04.002>
- Whitney, J. B., Hill, A. L., Sanisetty, S., Penalzoa-macmaster, P., Liu, J., Shetty, M., ... Barouch, D. H. (2014). viraemia in rhesus monkeys. *Nature*, 512(7512), 74–77. <https://doi.org/10.1038/nature13594>
- Wildt, K. F., Sun, G., Grueter, B., Fischer, M., Zamisch, M., Ehlers, M., & Bosselut, R. (2007). The transcription factor Zbtb7b promotes CD4 expression by antagonizing Runx-mediated activation of the CD4 silencer. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 179(7), 4405–4414. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.7.4405>
- Williams, S. A. F., & Greene, W. C. (2005). Host factors regulating post-integration latency of HIV. *Trends in Microbiology*, 13(4), 137–139. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2005.02.006>
- Yamada, D., Pérez-Torrado, R., Filion, G., Caly, M., Jammart, B., Devignot, V., ... Defossez, P. A. (2009). The human protein kinase HIPK2 phosphorylates and downregulates the methyl-binding transcription factor ZBTB4. *Oncogene*, 28(27), 2535–2544. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.109>
- Yang, W. S., Chadalapaka, G., Cho, S. G., Lee, S. ook, Jin, U. H., Jutooru, I., ... Kim, K. (2014). The Transcriptional Repressor ZBTB4 Regulates EZH2 Through a MicroRNA-ZBTB4-Specificity Protein Signaling Axis. *Neoplasia (United States)*, 16(12), 1059–1069. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2014.09.011>
- Yu, Y., Shang, R., Chen, Y., Li, J., Liang, Z., Hu, J., ... Chen, C. (2018). Tumor suppressive ZBTB4 inhibits cell growth by regulating cell cycle progression and apoptosis in Ewing sarcoma. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 100(December 2017), 108–115. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.01.132>
- Zhang, M., Zhang, J., Rui, J., & Liu, X. (2010). p300-Mediated Acetylation Stabilizes the Th-Inducing POK Factor. *The Journal of Immunology*, 185(7), 3960–3969. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001462>
- Zhang, S., Laouar, A., Denzin, L. K., & Sant'Angelo, D. B. (2015). Zbtb16 (PLZF) is stably suppressed and not inducible in non-innate T cells via T cell receptor-mediated signaling. *Scientific Reports*, 5. <https://doi.org/10.1038/srep12113>
- Zhu, J., & Paul, W. E. (2008). CD4 T cells: Fates, functions, and faults. *Blood*, 112(5), 1557–1569. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-05-078154>



ANEXOS

Anexo I. Consentimiento informado del InVIH

**HOSPITAL CIVIL DE GUADALAJARA "FRAY ANTONIO ALCALDE"
UNIDAD DE VIH**

FORMA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO
Para la preservación de muestras biológicas en el biobanco de la unidad de VIH

Mediante este consentimiento informado, confirmo que he hablado directamente con _____, quien me ha explicado en qué consiste que yo acepte participar en la donación de muestras de plasma, suero, saliva, orina, líquido cefalorraquídeo, sangre, células y/o tejido, ha respondido a mi satisfacción todas mis preguntas y mis dudas han sido aclaradas. Sé también que mis muestras serán guardadas por un tiempo indefinido y que podrán ser utilizadas y estudiadas en el futuro en el marco de proyectos de investigación sobre la infección por VIH.

Doy mi consentimiento de participación y se bien que puedo cancelarla en cualquier momento sin que esto me genere problemas con mi atención como paciente de esta institución.

Autorizo la revelación de mis registros médicos a las instituciones nacionales o internacionales, así como al comité de ética de esta institución (Hospital Civil de Guadalajara "Fray Antonio Alcalde"), en el caso de que sean requeridos. He comprendido que no seré identificado en el caso de que los resultados que se obtengan en el estudio de mi sangre o mis tejidos se publiquen en reuniones o revistas científicas nacionales o internacionales.

Al firmar este consentimiento no renuncio a alguno de mis derechos legales a los que tendría como paciente en un estudio de investigación.

LA PARTICIPACIÓN EN INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA ES VOLUNTARIA

Me he quedado con una copia de este documento y el contacto para cualquier otra duda o pregunta es el Dr. Jaime Andrade Villanueva, tel: 36147586.

Nombre completo (persona que participa en el estudio): _____

Dirección: _____

Firma: _____ Fecha: _____

Nombre completo del testigo No. 1: _____

Dirección: _____

Firma: _____ Fecha: _____

Nombre completo del testigo No. 2: _____

Dirección: _____

Firma: _____ Fecha: _____

Nombre, fecha y firma de quien obtiene el consentimiento: _____

Consentimiento informado BIOBANCO-UVIHI V.1.0 UVIHI/COFAA 12/Julio/2011





Anexo II. Carta de aprobación del comité de ética local del Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde”.



OPD Hospital Civil de Guadalajara
Unidad Hospitalaria Fray Antonio Alcalde

Servicio: Unidad de V.I.H.
Oficio No.: HCG/CEI-0479/17
Fecha: 19, Mayo de 2017
Registro de Investigación: 128/17

DR. JAIME FEDERICO ANDRADE VILLANUEVA
INVESTIGADOR PRINCIPAL
Presente:

Ref.: “Determinación de la familia de represores transcripcionales ZBTB y su asociación al estado de latencia del VIH en linfocitos CD4”.

Con relación al protocolo arriba mencionado, le informo que ha sido revisada y aprobada por el **Comité de Ética en Investigación** del Antiguo Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde”, la siguiente documentación:

- Protocolo: “Determinación de la familia de represores transcripcionales ZBTB y su asociación al estado de latencia del VIH en linfocitos CD4”.
- Forma de Consentimiento Informado del protocolo: versión 1.0

Por lo anterior, queda Usted autorizado a realizar el mencionado estudio en las instalaciones del Antiguo Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde” como investigador responsable.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente
“LA SALUD DEL PUEBLO ES LA SUPREMA LEY”
“2017, AÑO DEL CENTENARIO DE LA PROMULGACIÓN DE LA CONSTITUCIÓN POLÍTICA DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS, DE LA CONSTITUCIÓN POLÍTICA DEL ESTADO LIBRE Y SOBERANO DE JALISCO Y DEL NATALICIO DE JUAN RULFO”.

DR. JUAN LUÍS SOTO MANCILLA
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE ÉTICA
EN INVESTIGACIÓN.



cp. Archivo.
*blfr.

OPD Hospital Civil de Guadalajara Unidad Hospitalaria Fray Antonio Alcalde
Hospital No. 278, Guadalajara, Jalisco, México
C.P. 44280 Tel./Fax: (33) 36147748 - 36146988 www.hcg.udg.mx





Anexo III. Dictamen de evaluación y aprobación del Comité de Ética y Bioseguridad del CUCS



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS DE LA SALUD/
SECRETARÍA ACADÉMICA / COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN

CUCS/CINV/0215/17

DICTAMEN DE EVALUACIÓN

En la ciudad de Guadalajara, Jalisco a los veintiocho días del mes de septiembre de dos mil diecisiete, en las instalaciones del Centro Universitario de Ciencias de la Salud de la Universidad de Guadalajara, se reunieron los miembros de los Comités de Ética, Investigación y Bioseguridad para dictaminar sobre las evaluaciones emitidas por sus pares respecto del proyecto con número de dictamen **CI4317** "Evaluación de la expresión de la familia de represores transcripcionales BTB-ZF en linfocitos T CD4+ y su asociación al estado de latencia del VIH-1" del cual es responsable el *Dr. en C. Moises Ramos Solano*.

Los miembros de los Comités acordaron que de acuerdo a las evaluaciones emitidas por sus pares, el proyecto presenta los requisitos necesarios en cuanto a su presentación, calidad y contenido por lo que se **APRUEBA** para su realización.

ATENTAMENTE

COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN


Dra. Martha Escobar Fariás
Presidente


Dr. en C. Noé Alfaro Alfaro
Secretario

COMITÉ DE INVESTIGACIÓN


Dr. en C. Jorge R Padilla Gutiérrez
Presidente


Dr. en C. Andrés Palomera Chávez
Secretario

COMITÉ DE BIOSEGURIDAD


Dr. Ma. de la Luz Galván Ramírez
Presidente


Dra. Celia Guerrero Velázquez
Secretario


Vo. Bo.
Dra. en C. Bertha Vizmanos Lamotte
Coordinadora de Investigación



Anexo IV. Historia Clínica aplicada a cada una de las personas VIH- posterior

HISTORIA CLINICA

Fecha ___/___/___

Hora _____

FICHA DE IDENTIFICACION

Nombre _____ Fecha de nacimiento ___/___/___

Edad _____ Sexo _____ Religión _____ Estado civil _____ Escolaridad _____

Ocupación _____ Domicilio _____ Colonia _____

Lugar de origen _____ Lugar de residencia _____

Fecha de ingreso ___/___/___ Servicio _____ Cama _____ Piso _____

Familiar responsable _____

MOTIVO DE CONSULTA

PRINCIPIO Y EVOLUCION DEL PADECIMIENTO ACTUAL



Anexo V. Separación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)

1. Tomar dos tubos de 10 mL de sangre periférica con EDTA
2. Mezclar la sangre con PBS 0.01M + EDTA 2mM hasta un volumen de 35mL en un tubo cónico de 50mL.
3. En otro tubo de 50mL colocar un volumen de 15mL de Lymphoprep
4. Añadir la sangre con PBS al tubo con Lymphoprep, teniendo cuidado de no romper el gradiente
5. Centrifugar a 1800 rpm por 30 minutos (con una aceleración y desaceleración menores al 50%)
6. Extraer el anillo formado por PBMCs sin romper el gradiente de densidad y colocar en un tubo nuevo de 50 mL.
7. Realizar dos lavados de células con PBS sin EDTA, con centrifugaciones a 1500 rpm durante 15 minutos.
8. Resuspender y contar los PBMCs extraídos con cámara de Neubauer para su posterior separación o congelación a -170°C .

Anexo VI. Aislamiento de Linfocitos T CD4⁺ a partir de PBMC

1^{er} paso:

1. Realizar la separación de CD14⁺ (marcador de monocitos) que también son positivos a CD4, utilizando 10 μL de anticuerpo anti-humano CD14 biotinilado
2. Incubar 15 min en hielo para permitir la unión del receptor al anticuerpo
3. Agregar 10 μL de nano perlas magnéticas unidas a estreptavidina con afinidad por la biotina
4. Incubar 15 min en hielo
5. Resuspender en 2 mL de buffer mojosort 1X y poner el tubo en el magneto Mojosort durante 5 minutos.
6. Recolectar las células que no se unieron al magneto en un tubo limpio.

2^{do} paso

7. Añadir 10 μL de nano perlas magnéticas conjugadas con anti-CD4 al tubo con las células recolectadas
8. Incubar 15 min en hielo
9. Agregar 2 mL de buffer mojosort 1X
10. Colocar el tubo en el magneto por 5 minutos y decantar el sobrenadante
11. Repetir el paso 9 y 10
12. Sacar el tubo del magneto y resuspender en PBS, estos son los LT CD4⁺

Nota: El volumen de 10 μL contiene la concentración recomendada por el fabricante, la cual no es especificada en el protocolo.



Anexo VII. Determinación de la pureza de linfocitos T CD4⁺ aislados

La citometría de flujo es una técnica multiparamétrica que permite la caracterización de subpoblaciones celulares a través del uso de características como el tamaño, complejidad y la unión específica a anticuerpos unidos a fluorocromos. Las células pasan a través de un haz de láser y el impacto de cada célula produce señales que ayudaran a determinar las diferentes subpoblaciones.

1. Pipetear 100µL de sangre total a un tubo de 2mL
2. Adicionar en el tubo 3µL de anti-CD3-PerCP, 3uL de anti-CD4-FITC y anti-CD14- APC
3. Mezclar con vortex suave
4. Incubar 20 min a temperatura ambiente en oscuridad
5. Agregar 900 µL de solución de lisis al 1x (BD FACS Lysing Solution) y mezclar con vortex suave
6. Incubar 15 min a temperatura ambiente en oscuridad
7. Centrifugar a 300g y decantar
8. Pipetear 2mL de PBS y dar vortex suave
9. Centrifugar a 300g y decantar
10. Resuspender en 1mL de PBS
11. Leer en el clitómetro de flujo

Anexo VIII. Extracción de RNA

La técnica de Tiocianato de guanidina-fenol-cloroformo con el reactivo TRIzol™, se fundamenta en el uso de una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina que permite la obtención de moléculas de RNA de tamaño variado. El reactivo de TRIzol™ mantiene la integridad del RNA al inhibir la actividad RNAsa al momento de romper y homogenizar las células/tejidos. Después de homogenizar la muestra, se añade cloroformo, lo que permite la separación de una fase acuosa superior (RNA), una fase intermedia (DNA) y una fase inferior orgánica de color roja (proteínas). El RNA se precipita de la fase acuosa con isopropanol.

1. Depositar en un tubo cónico de 1.5mL los LT CD4⁺ aislados previamente
2. Realizar 2 lavados con PBS y centrifugar a 400g/7min a T^a
3. Adicionar 500µL del reactivo TRIzol™
4. Homogeneizar con disruptor durante 15 min e incubar 4°C/5min
5. Adicionar 100µL de cloroformo y dar vortex/20s e incubar 4°C/ 5min
6. Centrifugar 12000g/18min a 4°C
7. Separar la fase acuosa y depositarla en un tubo cónico de 1.5mL estéril
8. Adicionar un volumen equivalente de isopropanol frío
9. Incubar a -20°C durante mínimo 20min y centrifugar a 12000g/18 min a 4°C
10. Retirar el sobrenadante quedando un precipitado blanco en el fondo del tubo



-
11. Resuspender en 500 μ L de etanol frío al 75%
 12. Dar vortex/20s y centrifugar a 7500g/10min a 4°C y decantar
 13. Realizar los pasos 11 y 12
 14. Retirar el sobrenadante con pipeta, dejar secar 10 min
 15. Calentar a 65°C durante no más de 3 min
 16. Resuspender en agua libre de nucleasas
 17. Agregar 3 μ L (4U/ μ L) de DNAsa I
 18. Incubar a 37°C/30min e inactivar DNAsa I a 65°C/10 min
 19. Almacenar a -80°C



Anexo IX. Diseño de primers ZBTB

NOMBRE	SIMBOLO	PRIMER FOWARD 5'-3'	PRIMER REVERSE 5'-3'	REFERENCIA
<i>Homo sapiens zinc finger and BTB domain containing 1</i>	ZBTB1	TTTGTTCAGCACAGTCCT	AAAACCCATTCTCTTTGGTTG	*
<i>Homo sapiens zinc finger and BTB domain containing 2</i>	ZBTB2	AATATGACTCCCTCAGACCCC	GCGACTTTCCTCTGGCTA	*
<i>Homo sapiens zinc finger and BTB domain containing 3</i>	ZBTB3	TCTTACACACTACGGCGACA	TTCTGAGCTGCCATCTAAGGA	*
<i>Homo sapiens zinc finger and BTB domain containing 4</i>	ZBTB4	TATCCCATCTCCCAGTGCA	ACCAGGGTTAACTAGTGCAA	*
<i>Homo sapiens zinc finger and BTB domain containing 5</i>	ZBTB5	GCCGAGAAGATAGACCTCA	CTCTGGACTCAACAAATAGGGG	*
<i>Homo sapiens zinc finger and BTB domain containing 6</i>	ZBTB6	TTACCCAGCATAATGACT	ATCTCAAATGACTCTCGCTA	*
<i>Homo sapiens zinc finger and BTB domain containing 7A</i>	ZBTB7A	GAAGCCCTACGAGTGCAACATC	GTGGTTCTCAGGTCGTAGTTGTG	*
<i>Homo sapiens zinc finger and BTB domain containing 7B</i>	ZBTB7B	TCCCAGAGCCCTCATTCCAA	TAGAAACCCGCATAGCCGAAG	*
<i>Homo sapiens zinc finger and BTB domain containing 7C</i>	ZBTB7C	CGCCCTCCACCTCAAACACA	AAGCTCCCTGATGACCTG	*
<i>Homo sapiens zinc finger and BTB domain containing 8A</i>	ZBTB8A	CTCCTGTTACTCACGGTGCTT	CCATTAGGCAGTACTAGCCGTA	*
<i>Homo sapiens zinc finger and BTB domain containing 8B</i>	ZBTB8B	AGTCTACCTTCGCCCACT	ACCTGTCTAATGCTTTGGCTA	*
<i>Homo sapiens zinc finger and BTB domain containing 9</i>	ZBTB9	CATGGATCTGTAAATCATGCCAA	AGACGGAAATAAACATTTACCAC	*
<i>Homo sapiens zinc finger and BTB domain containing 10</i>	ZBTB10	ACAGATATAATCCCTTTGGTGCT	TGCCCAACTAATTTCTACCAG	*
<i>Homo sapiens zinc finger and BTB domain containing 11</i>	ZBTB11	CACATGAACAAACATCTTGGT	GCACTCAAATGGCTTAACTCC	*
<i>Homo sapiens zinc finger and BTB domain containing 12</i>	ZBTB12	AAGTCCACCCTTCAGACCAC	ACGTTAATCTCGGCCACACT	*
<i>Homo sapiens zinc finger and BTB domain containing 14</i>	ZBTB14	ATTAATGTTGCCAGTAAGCAC	ACTCACCAATTTCTGCGTCT	*
<i>Homo sapiens zinc finger and BTB domain containing 16</i>	ZBTB16	ACTACTCGGCCATGATCAAGC	GCCTCCCTCACACATAGCAC	*
<i>Homo sapiens zinc finger and BTB domain containing 17</i>	ZBTB17	AGAAGACCCCAACTCACA	GCCCACTGCTGATAGAAGTCC	*
<i>Homo sapiens zinc finger and BTB domain containing 18</i>	ZBTB18	TTTAATGACCAGCACGCAAG	CCATTGATATCTTAAGCACA	*
<i>Homo sapiens POZ/BTB and AT hook containing zinc finger1</i>	PATZ1	ATCTTAACCGGCACAAGCTG	ACCTGCTTGATATGTCGGTTC	*
<i>Homo sapiens zinc finger and BTB domain containing 20</i>	ZBTB20	CCATTAATCACTCAGGCACGA	AACTGGGTTCCAGACACTAGC	*
<i>Homo sapiens zinc finger and BTB domain containing 21</i>	ZBTB21	TGAGCCCAACAAGTAAACCAC	TTCTTTGCTAGGACCCGCTTC	*
<i>Homo sapiens zinc finger and BTB domain containing 22</i>	ZBTB22	CCGCCCATCTACTACTCAACCC	CITTCAGGCACAGACTACAACCAC	*
<i>Homo sapiens GDNF inducible zinc finger protein 1</i>	GZF1	TACATCCAGAGGAGACCGAAC	ATGAAATAAAGGCTTATGGACCC	*
<i>Homo sapiens zinc finger and BTB domain containing 24</i>	ZBTB24	AAGCCAACAACATTTGAACAC	CTCACAAAGTAGGCTCCGAT	*
<i>Homo sapiens zinc finger and BTB domain containing 25</i>	ZBTB25	GAACCACAATGGCACTGCC	AGTTAGAAAAAGCAGCAAGCAC	*
<i>Homo sapiens zinc finger and BTB domain containing 26</i>	ZBTB26	ATAGACCAGGCAACTTACCAC	AGGAATAATCAATAGGCAACCAG	*
<i>Homo sapiens B-cell CLL/lymphoma 6</i>	BCL6	GCCAGTCCCTGGTGAGTACAG	TGCATATCACTTCGTGCCTCTT	*
<i>Homo sapiens B-cell CLL/lymphoma 6B</i>	BCL6B	TTTGGCTCTGCTGTATCCATC	ACATTCAAACCCATATGCCTC	*
<i>Homo sapiens HIC ZBTB transcriptional repressor 1</i>	HIC1	CGTTGCTGTGCGACCTTGC	GTCGTGCGACAAGAGCTACAA	*
<i>Homo sapiens HIC ZBTB transcriptional repressor 2</i>	HIC2	AGTGCTTTCTCTGTAGTTTCCA	TGCCAGTCAACAACATATCGT	*
<i>Homo sapiens myoneurin</i>	MYNN	CAACAACACTTTCCGGTCCC	ACTGTGGTTCTGAATACCCAT	*
<i>Homo sapiens zinc finger and BTB domain containing 33</i>	ZBTB33	ACCATTGTAAACTAACCCCT	CATCCGTATCATTACATCGGTA	*
<i>Homo sapiens zinc finger and BTB domain containing 34</i>	ZBTB34	TTTCCCTTAGCCAGACCAT	ATTTAACAATAACGAGGACAACA	*
<i>Homo sapiens zinc finger protein 131</i>	ZNF131	CAAACGTTCTTGCTACCCCA	ACATTGCTCCTTACAACACA	*
<i>Homo sapiens zinc finger and BTB domain containing 37</i>	ZBTB37	TCTGAGCCATCTAAACCAGT	TGAATGCCCTCCAGGATCTGT	*
<i>Homo sapiens zinc finger and BTB domain containing 38</i>	ZBTB38	TGAAGCCTAGTGCTATCCGTA	TCTCCCATTTGGTACCCCTC	*
<i>Homo sapiens zinc finger and BTB domain containing 39</i>	ZBTB39	ACATGTCAAGCCCTTAAGCAA	GTCATTGTTCCCTCAACC	*
<i>Homo sapiens zinc finger and BTB domain containing 40</i>	ZBTB40	CAAAATGGCACTGAATATCCC	TTACAGCCCTCTTATTCCG	*
<i>Homo sapiens zinc finger and BTB domain containing 41</i>	ZBTB41	AAGGTATTACTTTAGGGTT	TACTGACCATGTGAGCTTA	*
<i>Homo sapiens zinc finger and BTB domain containing 42</i>	ZBTB42	AGAGCGTGCAATTATGACCACA	CCCAGAGGCTTCTAGACC	*
<i>Homo sapiens zinc finger and BTB domain containing 43</i>	ZBTB43	CTACCACTTCTTTATGAGCAC	TAACCCAGTACGATTGTGGA	*
<i>Homo sapiens zinc finger and BTB domain containing 44</i>	ZBTB44	CTAGGCGAAACTGTACACC	CATTTCTCCCTGCATCACC	*
<i>Homo sapiens zinc finger and BTB domain containing 45</i>	ZBTB45	ACTCTGAGATCCGTGTGCCT	CGTGCACTGCTGATAACTGTCT	*
<i>Homo sapiens zinc finger and BTB domain containing 46</i>	ZBTB46	AAATACAGTCCATTGGGGAT	TAAGAGTCGCACATGTACAG	*
<i>Homo sapiens zinc finger and BTB domain containing 47</i>	ZBTB47	CCTGTGTCCTGGTGCTAA	CCAACAGGCTGAGAAGTCCA	*
<i>Homo sapiens zinc finger and BTB domain containing 48</i>	ZBTB48	GGTCAATGCCCCACATGTCA	GCAATTCGGGCTTCATGCTC	*
<i>Homo sapiens zinc finger and BTB domain containing 49</i>	ZBTB49	ACAAACGGTCTCATACAGG	AAGTTACTAAACCCCTCGACCA	*



Anexo X. Síntesis de cDNA

Una vez extraído el RNA total se realiza una retrotranscripción para obtener el DNA complementario del RNA mensajero (mRNA) por lo que se utiliza el *primer* oligo dT, que es una secuencia de Timinas que se une a la cola de poli A que sólo contienen los RNA mensajeros. La técnica con el *kit SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System* de *Invitrogen* consiste en dos reacciones:

1^{era} reacción: alineamiento del oligo dT al mRNA:

1. Adicionar en un tubo cónico de 200 μ L el volumen previamente cuantificado de RNA de la muestra (10 pg-5 μ g), además de 1 μ L del *primer* Oligo dT, 1 μ L de dNTPs (10nM) y agua libre de nucleasas para llevar a un volumen total de 13 μ L.
2. Calentar el mix 65°C/5 min e incubar en hielo al menos 1 min.

2^{da} reacción: retrotranscripción para la síntesis del cDNA:

3. Mezclar los siguientes componentes en un mix: 5x *SuperScript IV buffer*, 100mM DDT, Inhibidor de RNAsas y la enzima transcriptasa reversa.
4. Agregar al tubo de la primera reacción para obtener un volumen total de 20 μ L
5. Dar vortex e incubar a 65°C/10 min
6. Inactivar la reacción por incubación a 80°C/10 min.
7. Una vez obtenido el cDNA realizar el tratamiento con RNAsa H a 37°C/20 min.

Anexo XI. PCR en tiempo real (qPCR)

1. Realizar diluciones de trabajo de las muestras de cDNA a una concentración de 10 ng/ μ L.
2. Preparar y pipetear el mix según la siguiente tabla.

Reactivo	Concentración inicial	Volumen	Concentración final
Supermix SsoAdvanced Bio-Rad	2x	5 μ L	1x
Primers (forward/reverse)	5 μ M	1 μ L	250 nM c/u
cDNA	10 ng/ μ L	1 μ L	10 ng en 10 μ L
H ₂ O	---	3 μ L	---
Total	---	10 μ L	---

3. Centrifugar brevemente la placa o tubos
4. Utilizar las siguientes condiciones en el termociclador: 95°C/3min para la activación de la polimerasa. Posteriormente, se realizan 40 ciclos de amplificación de: 95°C/30s (para desnaturalización del DNA), Tm/30s (Tm óptima de cada *primer*; alineamiento), 72°C/30s (extensión). Finalmente, se realiza un análisis de Curva *Melt* para comprobar la generación de productos específicos en la qPCR. Adicionalmente, se corren geles de agarosa para comprobar especificidad del fragmento mediante el tamaño del amplicón.



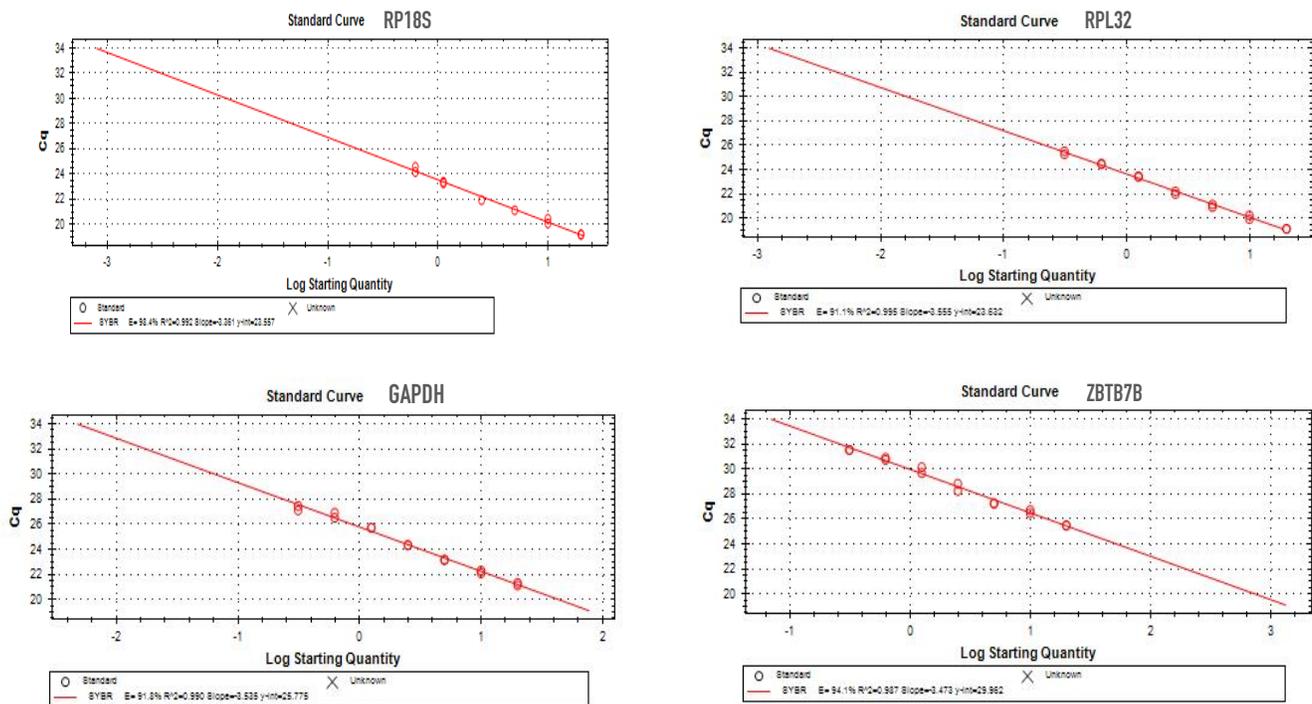
Anexo XII. Análisis de expresión génica

El análisis de expresión relativa fue realizado utilizando el método de cuantificación relativa ΔCq con la fórmula:

$$\Delta Cq = (Cq_{\text{gen ZBTB}} - Cq_{\text{gen RPL32}})$$

Además de realizar de utilizar el método de *Livak* cuantificación relativa $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (Schmittgen & Livak, 2008). Las curvas de amplificación que fueron realizadas con base a diluciones seriadas con factor 2 (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32).

Curva de eficiencia de genes de referencia y de interes:



Se realizó una revisión de la literatura para la elección de los genes de referencia y se se realizaron curvas de eficiencia donde se observó que los genes de referencia RPL32, RP18S y GAPDH tenían eficiencias de amplificación similares a los genes de interés.

qPCR	bp	R ²	Ecuación	Pendiente	Eficiencia
RP18S		0.992	-3.361x + 23.557	-3.361	98.4%
GAPDH		0.990	-3.535x + 25.775	-3.535	91.8%
RPL32		0.995	-3.555x + 23.632	-3.555	91.1%



Anexo XIII. Cuantificación de citocinas

Los paneles LEGENDplex son inmunoensayos basados en perlas que utilizan el mismo principio de inmunoensayos de tipo sándwich. Las perlas se diferencian de acuerdo con su tamaño y a la intensidad de fluorescencia interna. Cada perla esta conjugada en su superficie con un anticuerpo específico y así cada una captura un analito en particular. Después de los lavados, se añade un coctel de anticuerpos biotinilados, los cuales se unen de manera específica a cada perla, formando un sándwich de perla-analito-anticuerpo biotinilado. Enseguida se agrega estreptavidina-ficoeritrina (Streptavidin-Phycoerythrin, SA-PE), el cual se une al anticuerpo biotinilado, proveyendo la señal de fluorescencia de diferente intensidad, en proporcional a la cantidad de analito unido. Se separan las poblaciones de las perlas por citometría de flujo por la cuantificación de la señal de fluorescencia de PE. La concentración de un analito en particular es determinada a partir de la comparación de la fluorescencia con una curva de estándares. Las perlas se identifican con ID específicos y tienen una concentración establecida en la siguiente tabla.

Identificación y concentración de las perlas del PLEX.

Citocina	ID perlas	Concentración máxima del estándar (ng/mL)
IL-1 β	A4	10
IFN- α	A5	10
IFN- γ	A6	10
TNF- α	A7	10
MCP-1	A8	10
IL-6	A10	10
IL-8	B2	10
IL-10	B3	10
IL-12p70	B4	10
IL-17A	B5	10
IL-18	B6	10
IL-23	B7	10
IL-33	B9	50

Los reactivos y estándares se prepararán de acuerdo con las instrucciones del fabricante, las muestras de suero se diluirán 1:2. Todas las soluciones se manejarán a temperatura ambiente. La curva de estándares se preparará de la siguiente manera:

ID estándar	Dilución	Buffer de ensayo (μ L)	Estándar (μ L)	Concentración final (pg/mL)	Concentración final IL-33 (pg/mL)
C7	--	--	--	10,000	50,000
C6	1:4	75	25 de C7	2,500	12,500
C5	1:16	75	25 de C6	625	3,125
C4	1:64	75	25 de C5	156.3	781.3
C3	1:256	75	25 de C4	39.1	195.3
C2	1:1024	75	25 de C3	9.8	48.8
C1	1:4096	75	25 de C2	2.4	12.2
C0	--	75	--	0	0



Procedimiento:

1. Agregar 25µL del reactivo Matrix B a los tubos de la curva de estándares y 25µL del buffer de ensayo a los de muestra
2. Añadir 25µL de la curva de estándares
3. Pipetear 25µL de la dilución de la muestra de suero
4. Agregar 25µL de la mezcla de perlas a todos los tubos. Mezclar la mezcla de perlas entre el pipeteo de cada tubo.
5. Adicionar 25µL del anticuerpo de detección.
6. El volumen final del tubo debe ser de 100uL.
7. Cubrir con papel aluminio todos los tubos para protegerlos de la luz. Agitar a 1000 rpm por 2 horas a temperatura ambiente.
8. Sin hacer lavados previos, añadir 25µL de SA-PE a cada tubo
9. Cubrir con papel aluminio todos los tubos para protegerlos de la luz. Agitar a 1000 rpm por 30 min a temperatura ambiente.
10. Centrifugar los tubos a 1,000g por 5 minutos.
11. Remover el sobrenadante.
12. Pipetear 200µL de buffer de lavado 1X a cada tubo; resuspender las perlas con vortex. Centrifugar a 1,000g por 5 minutos. Remover el sobrenadante
13. Agregar 200µL de buffer de lavado 1X a cada tubo; resuspender las perlas con vortex.

Tabla de resultados de las citocinas.

Citocina	VIH- (pg/mL)	VIH+ naïve TAR (pg/mL)	VIH- con TAR (pg/mL)	Controladores de élite (pg/mL)
IL-1β	26.00	39.02	51.37	108.20
IFN-α	19.84	23.96	39.88	30.60
IFN-γ	93.59	102.24	253.56	336.63
TNF-α	1.69	1.80	1.80	2.75
MCP-1	380.24	136.82	193.09	123.35
IL-6	20.24	24.30	51.53	38.29
IL-8	53.42	54.39	60.15	94.06
IL-10	24.17	32.54	26.85	53.43
IL-12p70	11.23	17.66	19.65	37.59
IL-17A	106.40	141.89	195.47	240.53
IL-18	175.06	137.36	182.44	231.11
IL-23	217.83	497.54	923.21	1237.97
IL-33	82.64	98.03	1237.97	393.75



Anexo XIV. Difusión de resultados

Presentación de trabajo libre en cartel en el XXI Congreso Internacional Avances en Medicina 2019 del Hospital Civil de Guadalajara. Obtención del 3er lugar en la categoría de Investigación Básica.

The certificate is a white document with a purple border. At the top left, there are two crests. In the center, there is a logo for the XXI International Congress on Advances in Medicine, Hospital Civil de Guadalajara. To the right, there is a logo for VIII CIENF, Hospital Civil de Guadalajara, Congreso Internacional de Enfermería. The text in the center reads: 'OPD Hospital Civil de Guadalajara, Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de Ciencias de la Salud otorgan la presente CONSTANCIA'. Below this, it lists the authors: 'A: De Arcos-Jiménez Judith Carolina, Loza-Salazar Aldo Daniel, González-Hernández Luz Alicia, Andrade-Villanueva Jaime, Vega-Magaña Alejandra Natali, Ramos-Solano Moisés'. It states they received the 'TERCER LUGAR' in the 'INVESTIGACIÓN BÁSICA' category of the 'XVIII CONCURSO DE TRABAJOS LIBRES EN CARTEL'. The title of the work is 'Comparación de los niveles de expresión génica de represores transcripcionales ZBTB en linfocitos T CD4+ entre pacientes VIH+ y controles sanos'. The event took place in Guadalajara, Jalisco, Mexico, from February 21 to 23, 2019. At the bottom, there are three signatures and their corresponding titles: Dr. Héctor Raúl Pérez Gómez (Director General), Dr. Jaime Federico Andrade Villanueva (Rector), and Dr. José Martín Gómez Lara (Presidente Ejecutivo).

   **XXI** CONGRESO INTERNACIONAL AVANCES EN MEDICINA HOSPITAL CIVIL DE GUADALAJARA  **VIII CIENF** HOSPITAL CIVIL DE GUADALAJARA CONGRESO INTERNACIONAL DE ENFERMERÍA

OPD Hospital Civil de Guadalajara
Universidad de Guadalajara
Centro Universitario de Ciencias de la Salud
otorgan la presente

CONSTANCIA

A: De Arcos-Jiménez Judith Carolina, Loza-Salazar Aldo Daniel, González-Hernández Luz Alicia, Andrade-Villanueva Jaime, Vega-Magaña Alejandra Natali, Ramos-Solano Moisés

Por haber obtenido el **TERCER LUGAR** en la categoría de **INVESTIGACIÓN BÁSICA** del **XVIII CONCURSO DE TRABAJOS LIBRES EN CARTEL**

Por el trabajo titulado:
Comparación de los niveles de expresión génica de represores transcripcionales ZBTB en linfocitos T CD4+ entre pacientes VIH+ y controles sanos

Guadalajara, Jalisco, México, 21 al 23 de Febrero de 2019


Dr. Héctor Raúl Pérez Gómez
Director General
OPD Hospital Civil de Guadalajara


Dr. Jaime Federico Andrade Villanueva
Rector
Centro Universitario de Ciencias de la Salud


Dr. José Martín Gómez Lara
Presidente Ejecutivo
XXI Congreso Internacional Avances en Medicina
Hospital Civil de Guadalajara, CIAM 2019


Dr. Francisco M. Preciado Figueroa
Director
Nuevo Hospital Civil de Guadalajara
"Dr. Juan I. Menchaca"


Dr. Benjamín Becerra Rodríguez
Director
Antiguo Hospital Civil de Guadalajara
"Fray Antonio Alcalde"



Presentación de trabajo libre en cartel en el STI & HIV 2019 World Congress / Joint Meeting of the 23rd ISSTD & 20th IUSTI en Vancouver, Canadá



STI & HIV 2019 WORLD CONGRESS
Joint Meeting of the **23rd ISSTD & 20th IUSTI**
JULY 14 - 17, 2019 VANCOUVER, CANADA



ISSTD **IUSTI**

The Evolving Landscape of STI and HIV Eliminationwww.stihiv2019vancouver.com[f](#) [t](#) @ISSTD IUSTI2019 #ISSTD2019 #IUSTIWorld2019

Certificate of Presentation

This is to certify that

Judith De Arcos Jimenez

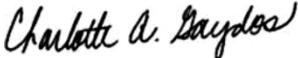
Presented a poster titled “Zbtbs gene expression in CD4+ T cells and systemic pro-inflammatory cytokines in naïve and treated HIV patients”

**at the STI & HIV 2019 World Congress
Joint Meeting of the 23rd ISSTD & 20th IUSTI**

Which took place on July 14 - 17, 2019
at the Vancouver Convention Centre, East Building in Vancouver, BC, Canada



Dr. Caroline E. Cameron
ISSTD President/ Congress Chair



Dr. Charlotte A. Gaydos
IUSTI President/ Congress Co-Chair



Presentación de trabajo libre en cartel en el 10th International Conference on HIV (IAS 2019), CDMX, México.





Presentación de trabajo libre en cartel en el XXII Congreso Internacional Avances en Medicina 2020 del Hospital Civil de Guadalajara.



HOSPITAL CIVIL DE GUADALAJARA
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS DE LA SALUD

Otorgan la presente

CONSTANCIA

JUDITH CAROLINA DE ARCOS JIMÉNEZ

Ratkovich González Sarah, Ruiz Briseño Mariana del Rocío, Andrade Villanueva Jaime F., González Hernández Luz A., Vega Magaña Alejandra N., Ramos Solano Moisés,

Por su participación en el XIX Concurso de trabajos en cartel en la categoría Investigación Básica con el trabajo titulado:

PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS REPRESORES TRANSCRIPCIONALES ZBTB EN PACIENTES VIH+ CON REPLICACIÓN VIRAL ACTIVA Y CONTROLADA

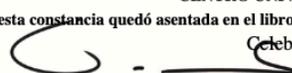
"Fortalecer las Buenas Prácticas Asistenciales"

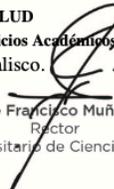
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS DE LA SALUD

esta constancia quedó asentada en el libro 09, foja 136 de la Coordinación de Servicios Académicos con 24 Horas.

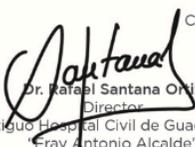
Celebrado en la Ciudad de Guadalajara, Jalisco.

27 al 29 de Febrero de 2020


Dr. Jaime Federico Andrade Villanueva
Director General
Hospital Civil de Guadalajara


Dr. José Francisco Muñoz Valle
Rector
Centro Universitario de Ciencias de la Salud


Dr. Benjamín Sederra Rodríguez
Director
Nuevo Hospital Civil de Guadalajara
"Dr. Juan I. Menchaca"


Dr. Rafael Santana Ortiz
Director
Antiguo Hospital Civil de Guadalajara
"Fray Antonio Alcalde"


Dra. Martha Patricia Sánchez Muñoz
Presidente Ejecutivo
XXII Congreso Internacional Avances en Medicina



Envío de artículo a revista indexada con factor de impacto: 2.2
 Estatus: Respuesta de observaciones realizada por revisores.

Archives of Virology Editorial Manager

HOME • LOGOUT • HELP • REGISTER • UPDATE MY INFORMATION • JOURNAL OVERVIEW
 MAIN MENU • CONTACT US • SUBMIT A MANUSCRIPT • INSTRUCTIONS FOR AUTHORS • PRIVACY

Role: Author Username: Moykos

Submissions Being Processed for Author Moises Ramos-Solano, Ph. D.

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
Action Links	ARVI-D-20-00444	ZBTB genes are upregulated in HIV elite controllers: A possible new molecular mechanisms of viral control	09 May 2020	09 May 2020	Submitted to Journal

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

<< Author Main Menu

Archives of Virology

ZBTB genes are upregulated in HIV elite controllers: A possible new molecular mechanisms of viral control

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:					
Full Title:	ZBTB genes are upregulated in HIV elite controllers: A possible new molecular mechanisms of viral control				
Article Type:	Original Article				
Corresponding Author:	Moises Ramos-Solano, Ph. D. University of Guadalajara Guadalajara, Jalisco MEXICO				
Corresponding Author Secondary Information:					
Corresponding Author's Institution:	University of Guadalajara				
Corresponding Author's Secondary Institution:					
First Author:	Judith Carolina De Arcos-Jiménez, B. Sc.				
First Author Secondary Information:					
Order of Authors:	Judith Carolina De Arcos-Jiménez, B. Sc. Luz A González-Hernández, Ph. D. Sarah Ratkovich-González, M. Sc. Karina Sanchez-Reyes, Ph. D. Montserrat Alvarez-Zavala, Ph. D. Mariana del Rocio Ruiz-Briseño, M. Sc. José Luis Mosqueda-Gómez, Ph.D. Santiago Avila-Rios, Ph. D. Moises Ramos-Solano, Ph. D. Jaime F Andrade-Villanueva, M. Sc.				
Order of Authors Secondary Information:					
Funding Information:	<table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <td>University of Guadalajara (PROSNI 2017-2019)</td> <td>Dr. Moises Ramos-Solano Dr. Jaime F Andrade-Villanueva</td> </tr> <tr> <td>University of Guadalajara (PROINPEP 2017-2019)</td> <td>Dr. Moises Ramos-Solano</td> </tr> </table>	University of Guadalajara (PROSNI 2017-2019)	Dr. Moises Ramos-Solano Dr. Jaime F Andrade-Villanueva	University of Guadalajara (PROINPEP 2017-2019)	Dr. Moises Ramos-Solano
University of Guadalajara (PROSNI 2017-2019)	Dr. Moises Ramos-Solano Dr. Jaime F Andrade-Villanueva				
University of Guadalajara (PROINPEP 2017-2019)	Dr. Moises Ramos-Solano				